

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diversidad de la microalga endolítica del género *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis*, implementando dos métodos de secuenciación (Amplicon-seq/RNA-seq), en condiciones hidrotermales en el Golfo de California, México

Trabajo de graduación presentado por

María Fernanda Acevedo Ramos

para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala,

2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diversidad de la microalga endolítica del género *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis*, implementando dos métodos de secuenciación (Amplicon-seq/RNA-seq), en condiciones hidrotermales en el Golfo de California, México

Trabajo de graduación presentado por

María Fernanda Acevedo Ramos

para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala,

2022

Vo. Bo.:

(f) 

Ph.D. David Arturo Paz García

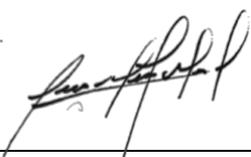
Tribunal examinador

(f) 

Ph.D. David Arturo Paz García

(f) 

Ph.D. Ana Hacothen Domené

(f) 

M.Sc. José Miguel Morales

Fecha de aprobación: Guatemala, 24 de junio del 2022

PREFACIO

Agradezco a Ph.D. Michael E. Hellberg y al equipo de High Performance Computing (HPC) de Louisiana State University por facilitarme acceso al servidor SUPERMIC, en donde me fue posible realizar análisis indispensables para la realización del trabajo.

A mi asesor principal, Ph.D. David Arturo Paz García, por abrirme las puertas a su laboratorio Marine BioGenomics. Esta oportunidad ha sido sumamente enriquecedora, he aprendido mucho gracias a todos los recursos y herramientas que me ha compartido. Además, por brindarme acceso a las librerías de las muestras utilizadas en el presente trabajo, por su paciencia y consejos durante cada fase de esta etapa.

A Ph.D. Alicia Reigel, por su cordial disposición para colaborar con este trabajo. Y especialmente, por toda su paciencia, consejos y tiempo invertido para transmitirme los conocimientos necesarios para aprender a ejecutar los distintos programas y códigos implementados en el presente trabajo. Su apoyo fue indispensable para el desarrollo de la fase de análisis de datos y la calidad de investigadora que representa me sirvió de mucha inspiración para mejorar cada día.

A mi asesora secundaria, Ph.D. Ana Hacoheh Domené, por sus consejos desde etapas temprana de la carrera, y por ser quien me puso en contacto con en el Dr. Paz. Su mentoría me ha sido de gran ayuda para mi crecimiento profesional.

A MSc. José Miguel Morales, por aceptar formar parte de mi comité evaluador. Y por creer en mi desde que inicié esta etapa académica.

A mi directora de carrera, MSc. Gabriela Alfaro, y a la secretaria del Departamento de Biología, Ericka Santos, por brindar todo su apoyo durante los procesos burocráticos para la tramitación del presente trabajo. Y por siempre brindar soluciones cuando se presentaba algún obstáculo.

A mis amigas, Adriana, Inés y Valeria, por siempre creer en mí; incluso cuando más me cuestionaba. Sus palabras me dieron mucha fuerza.

A mis compañeros del laboratorio Marine BioGenomics. Por su apoyo y consejos y por ser una constante fuente de inspiración durante todo el proceso de realización del trabajo. Especialmente, a Erick Bolaños y Ricardo Mijaíl, por usar su experiencia para brindarme consejos y apoyo constructivo para mejorar como científica.

A los incontables investigadores que comparten su conocimiento en fuentes de divulgación científica. Por resolver dudas de la manera más simple y entendible posible, sus aportes han ayudado a muchos nuevos investigadores, incluyéndome, durante momentos de mucha incertidumbre.

A Kim, por acompañarme durante este y otros procesos paralelos que surgieron durante los últimos meses. Su apoyo emocional fue fundamental para mi salud en todo sentido.

A mis perritos, por ser mi fuente principal de tranquilidad y felicidad. Porque sin necesidad de decir una sola palabra, me dieron la paz que necesitaba durante los momentos más difíciles.

Finalmente, gracias infinitas a mi familia. Quienes me han apoyado con todo lo que necesité y más. Por su cariño y paciencia, esto no hubiera sido posible sin ustedes. Gracias, por tanto.

ÍNDICE

PREFACIO	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	5
III. OBJETIVOS	7
A. General	7
B. Específicos	7
IV. HIPÓTESIS	8
V. MARCO TEÓRICO	9
A. Ecosistemas arrecifales	9
B. Tipos de ambientes arrecifales	10
C. Ambientes marginales	12
1. Sistemas hidrotermales	14
2. Arrecifes asociados a sistemas hidrotermales	15
D. Estrategias adaptativas en corales	16
E. Endolito fotosintético <i>Ostreobium</i> spp. en corales escleractinios	18
1. Estudios genéticos de <i>Ostreobium</i> spp.	19
F. Corales del género <i>Porites</i>	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
A. Sitio de estudio	24
1. La Ventila	24
B. Obtención de datos	25
C. Extracción de ADN y ARN y preparación de librerías	26
1. Amplicon-seq	26
2. RNA-seq	27
D. Extracción de secuencias de <i>Ostreobium</i>	27
E. Asignación taxonómica preliminar	27
F. Filtración por agrupamiento filogenético	28

G.	Alineamiento de secuencias	29
H.	Análisis filogenético	29
I.	Determinación de linajes de <i>Ostreobium</i>	30
J.	Generación de mapas de distribución de clados	30
K.	Análisis de composición de ASVs por tipo de librería y muestra	30
VII.	RESULTADOS	32
A.	Procesamiento de secuencias Amplicon-seq/RNA-seq	32
B.	Filtración taxonómica en QIIME	33
C.	Filtración filogenética	35
D.	Análisis filogenético	41
VIII.	DISCUSIÓN	43
A.	Composición de librerías Amplicon-seq/Rna-seq	43
B.	Clasificación taxonómica por base de datos SILVA	44
C.	Análisis de diversidad y comparación de métodos	46
D.	Análisis filogenético	47
IX.	CONCLUSIONES	50
X.	RECOMENDACIONES	52
XI.	LITERATURA CITADA	53
XII.	APÉNDICE	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de sitio de recolecta	24
Figura 3. Composición taxonómica de ASVs designada por base de datos SILVA tras filtrado inicial en QIIME.....	34
Figura 4. Representación visual del filtrado según agrupamiento filogenético A: 1,800 secuencias, B: 1,739, C: 1,686, D: 799 secuencias	36
Figura 5. Índices de diversidad alfa (A: Riqueza observada, B: Shannon) de los ASVs obtenidos según su método de secuenciación. Se incluyen sus respectivos valores de significancia y La distribución de los datos se visualiza al lado derecho de cada gráfico de caja, representando la estructura de los datos crudos utilizados para el análisis.	37
Figura 7. Heatmap para la representación visual de las 100 ASVs más abundantes en las librerías analizadas. La línea roja divide las librerías de Amplicon-seq (izquierda) y RNA-seq (derecha)	39
Figura 8. Clasificación designada por la base de datos de SILVA para los ASVs presentes en las librerías RNA-seq (A), y Amplicon-seq (B).....	40
Figura 9. Análisis de máxima verosimilitud (1000 iteraciones) con ASVs filtrados (n=800) y secuencias de referencia de GenBank (n=30) y <i>Caulerpa racemosa</i> como grupo externo. El soporte se encuentra en los nodos de cada clado. Los clados más distintivos se agruparon y el número de coloración azul frente a cada clado representa la cantidad de secuencias agrupadas y la letra en color rojo en cada rama indica el. Los clados coloreados presentan las secuencias de referencia y se diferenciaron según del Campo et al. (2016). Amarillo: OST2, rosa: OST1, celeste: OST3	41
Figura 10. Distribución geográfica actualizada de la filogenia resuelta para el gen 16S de <i>Ostreobium</i>	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de datos por analizar	25
Cuadro 2. Tratamientos según las condiciones de muestras consideradas	26
Cuadro 3. Clasificación filogenética de ASVs más abundantes.	42
Cuadro 1A. . Conteo de lecturas por librería antes y después del proceso de mapeo en Bowtie2.....	79
Cuadro 2A. Estadísticos del proceso de calidad, revisión de quimeras y unificación de paired end (dada2) para las librerías Amplicon-seq.....	80

Cuadro 3A. Estadísticos del proceso de calidad, revisión de quimeras y unificación de paired end para las librerías RNA-seq.	81
Cuadro 4A. Conteo de ASVs antes y después de filtrado taxonómico en QIIME.	82
Cuadro 5A. Riqueza observada por librería.	83
Cuadro 6A. Conteo de ASVs post filtrado filogenético presentes en librerías de Amplicon-seq.	84
Cuadro 7A. Códigos de acceso de Genbank correspondientes a las secuencias de 16S de la filogenia resuleta para <i>Ostreobium</i>	85

RESUMEN

Los ecosistemas arrecifales son indispensables para la productividad y salud de los océanos. Dadas las crecientes problemáticas ambientales a nivel global, estos se han visto amenazados en diversos aspectos y se han generado desbalances a nivel ecosistémico. Particularmente, uno de los factores más amenazados son las interacciones simbióticas asociadas a corales constructores de arrecifes. Generalmente, estudios ecológicos enfatizan en las comunidades de zooxantelas y del microbioma para evaluar factores de respuesta ante estresores. Sin embargo, pasan por alto organismos endolíticos como *Ostreobium*. Este es un género de algas verdes que habita dentro del esqueleto de los corales. Posee diversas adaptaciones para sobrevivir en condiciones limitantes de oxígeno y luz; y su rol como simbionte ha sido cuestionado. El objetivo del presente trabajo fue explorar la diversidad de *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis* que habita en un ambiente hidrotermal somero de Bahía Concepción en el Golfo de California. El análisis incluyó información proveniente de librerías generadas por los tipos de secuenciación de amplicón y de ARN (Amplicon-seq y RNA-seq, respectivamente). Se incluyeron librerías correspondientes a once muestras recolectadas en una comunidad coralina en una ventila hidrotermal somera y se implementó un flujo bioinformático para su análisis. Se encontró la presencia de los clados 1 y 2, y la reconstrucción filogenética sugiere potencialmente siete nuevos clados adicionales a la diversidad de *Ostreobium* reportada para el gen 16S. Por otro lado, se resaltan diferencias contrastantes entre la composición de ASVs (Amplicon Sequence Variants) presentes en las librerías Amplicon-seq y RNA-seq. Se observó un mayor número de ASVs obtenidos de las librerías generadas por el método de secuenciación RNA-seq. Los ASVs detectados en las librerías generadas por el método Amplicon-seq fueron más abundantes, y se detectaron dos ASVs compartidos entre métodos de secuenciación.

ABSTRACT

Reef ecosystems are essential to ocean's health and productivity. Given the growing environmental problems globally, these ecosystems have been threatened in an array of forms and it has resulted in ecosystem imbalances. Particularly, one of the most threatened factors are symbiotic interactions associated to reef-building corals. Environmental surveys generally focus in zooxanthellates and bacterial communities to assess stress response factors. Therefore, endolithic organisms, such as *Ostreobium*, are often overlooked. *Ostreobium* is a genus of green algae that lives within corals CaCO₃ substrate. Its role as a symbiont has been disputed, but its ecology and biology have revealed that it has special adaptation which allow it to thrive in such a limited environment, specifically lacking sunlight and oxygen. The aim of this study was to explore the diversity of *Ostreobium* in the coral *Porites panamensis* which inhabits a shallow hydrothermal environment in Bahía Concepción, Gulf of California, México. The analysis included data from libraries generated from two different sequencing methods (Amplicon-seq and RNA-seq). It was implemented a new bioinformatic workflow to extract *Ostreobium* sequences. The libraries included corresponded to eleven samples collected in a coral reef within hydrothermal vents. The phylogenetic analysis found the presence of clades 1 and 2, regarding *Ostreobium's* reported 16S phylogeny, and it suggested the presence of potentially new strains distributed in 7 new clades. Additionally, it was found contrasting differences between Amplicon Sequence Variants (ASVs) composition between Amplicon-seq and RNA-seq libraries. There were more ASVs in RNA-seq libraries in comparison to the Amplicon-seq ones. Nevertheless, ASVs present in Amplicon-seq libraries were much more abundant. Despite those differences, both methods were able to retrieve the same results in terms of the diversity observed between vent and control samples.

I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos son constantemente amenazados y afectados por diversos factores inducidos por actividades antropogénicas que alteran procesos biológicos cruciales para el sustento de la vida marina (Halpern *et al.*, 2007). Los ecosistemas arrecifales son los ejemplares más representativos debido a que son reservorios de hábitats para la sobrevivencia de especies clave en términos ecológicos y comerciales. Albergan alrededor del 25% de la vida marina conocida y proporcionan servicios ecosistémicos como seguridad alimentaria, turismo, protección costera a millones de personas (Burke *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2017)

Una de las amenazas que afecta de manera masiva a los arrecifes coralinos es el incremento en la temperatura y la acidificación oceánica (Feely *et al.*, 2009; Sully *et al.*, 2019). Los organismos afectados de manera directa son aquellos que presentan estructuras externas de carbonato de calcio (CaCO_3) (Kroeker *et al.*, 2013). Entre estos, se encuentran los corales formadores de arrecifes (hermatípicos) pertenecientes al orden Scleractinia. Estos corales presentan interacciones simbióticas con diversos microorganismos (e.g. Bacteria, Fungi, Archaea, Clorophyta) a nivel tisular y esquelético, formando un sistema holobionte. Dichas interacciones proporcionan al coral hospedero protección contra patógenos, obtención de energía requerida a través de los productos de fotosíntesis y ciclaje de nutrientes, entre otros beneficios (Peixoto *et al.*, 2017).

Distintas especies de corales han demostrado una resiliencia ante estresores ambientales. La heterogeneidad ambiental es uno de los factores que favorecen la resiliencia de los organismos arrecifales, debido a que la complejidad estructural y fluctuación de factores bióticos/abióticos favorecen la plasticidad fenotípica y genética de los corales (Brown, 1997).

Los mecanismos de adaptación que se han generado particularmente para favorecer la tolerancia térmica se han observado en la flexibilidad de las asociaciones simbiote-coral, en donde algunos linajes del simbiote fotosintético endotermal (Symbiodiniaceae) presenta mayor tolerancia ante fluctuaciones de temperatura (Howells *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se han observado diferencias en la composición del microbioma entre corales sujetos a ambientes variables y corales expuestos a ambientes homogéneos (Ziegler *et al.*, 2017). Por ejemplo, los corales que ocurren en ambientes con temperaturas variables tienen menos probabilidad de ser sujetos a eventos de blanqueamiento (Safaie *et al.*, 2018). A nivel transcriptómico, se han observado diferencias marcadas en la expresión genética de corales expuestos a ambientes extremos (e.g., ventilas hidrotermales) (Savary *et al.*, 2021; Treviño, 2020).

A nivel del esqueleto, existen otros simbiontes (o endolitos) fotosintéticos con capacidad de bioerosión para colonizar el esqueleto de corales escleractíneos (Ricci *et al.*, 2019). El endolito más abundante en corales es *Ostreobium* (Reyes-Nivia *et al.*, 2013), un alga verde que se ha estudiado relativamente poco en comparación con las comunidades de Symbiodiniaceae y procariotas. Estas algas están adaptadas para realizar procesos fotosintéticos en condiciones limitadas de luz y oxígeno (Kühl *et al.*, 2008). Estudios han comprobado que estos endolitos aumentan su densidad y abundancia durante eventos de blanqueamiento debido que aumenta la irradiación de luz solar por la pérdida de los simbiontes del tejido (Diaz-Pulido & McCook, 2002; Fine *et al.*, 2006). Además, la colonización de endolitos fotosintéticos se favorece en condiciones de bajo pH (I. C. Enochs *et al.*, 2016). Consecuentemente, se ha sugerido que los productos de la fotosíntesis de *Ostreobium* brinda al coral una fuente de alimento alternativa durante eventos de recuperación de blanqueamiento (Fine & Loya, 2002).

A pesar del rol crucial que *Ostreobium* es capaz de impartir en el sistema holobionte, aún se desconoce mucho acerca de este género. En términos de diversidad, la morfología que presentan no hace posible su identificación taxonómica por lo que se recurre a herramientas moleculares para su identificación genética (Verbruggen, 2014). Las regiones

más utilizadas para su identificación son los marcadores de origen de cloroplasto *tufA*, *rbcL* y *16S*, de origen mitocondrial (Marcelino & Verbruggen, 2016; Sauvage *et al.*, 2016).

Un estudio previo ha identificado tres linajes genéticos principales distribuidos en el Caribe, Atlántico sur, Océano Índico, Pacífico Australiano y Sureste Asiático (del Campo *et al.*, 2017). Adicionalmente, un estudio realizó una caracterización en un gradiente de profundidad de 6 a 55 m donde se identificaron 7 linajes genéticos, presentando estructura conforme aumentaba la profundidad lo cual sugiere que las condiciones externas del coral influyen con la composición de las comunidades de *Ostreobium* (Gutner-Hoch & Fine, 2011). Estudios de microbioma han revelado la existencia de al menos 80 unidades taxonómicas operativas (OTUs). Esto sugiere que su diversidad ha sido subestimada y en consecuencia, futuros estudios podrían revelar información ecológica/genética que podría ser interpretada como indicadores de degradación de ecosistemas (Marcelino & Verbruggen, 2016; Sauvage *et al.*, 2016).

En este estudio se busca generar nueva información acerca de la diversidad del género de *Ostreobium* en un ambiente hidrotermal somero, el cual puede ser clave para conocer la contribución de este simbionte en la supervivencia de los corales constructores de arrecifes. Asimismo,

El principal objetivo de este estudio fue explorar la diversidad de *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis* en un ambiente hidrotermal somero del Golfo de California, partiendo de librerías generadas por dos métodos de secuenciación diferentes (Amplicon-seq y RNA-seq). Consecuentemente, se buscó comparar las diferencias en niveles de diversidad recuperados por cada método. Para esto, se utilizó una base de datos de secuencias del gen *16S* correspondientes a *Ostreobium* y se realizaron mapeos en cada librería para recuperar las secuencias que se alinearan con estas. Se siguió con un flujo de trabajo bioinformático para agrupar las secuencias en ASVs (Amplicon Sequence Variants) y proceder con su asignación taxonómica, la cual se realizó inicialmente partiendo de la base de datos SILVA. Posteriormente, se llevaron a cabo múltiples fases de filtrado obtener las secuencias correspondientes a ASVs. Por último, se realizó un análisis filogenético con las secuencias

recuperadas a partir de ambos métodos e incorporando secuencias de una resolución filogenética publicada para el gen 16S (del Campo *et al.*, 2017)

Este estudio permitió conocer la diversidad de linajes de *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis* en un ambiente hidrotermal somero del Golfo de California, expandiendo la distribución de dos de los tres clados conocidos para el gen 16S. Se reportan 7 clados potenciales adicionales. Asimismo, se hizo una comparación de los niveles de diversidad recuperados dependiendo de los métodos de secuenciación implementados (Amplicon-seq y RNA-seq). Se comprobó que RNA-seq recuperó mayor diversidad en términos de linajes genéticos. Sin embargo, ambos métodos fueron comparables para realizar comparaciones entre las muestras expuestas a condiciones hidrotermales y las muestras control.

II. JUSTIFICACIÓN

La microalga endolítica *Ostreobium* es uno de los integrantes del holobionte coral-simbiontes poco estudiados. Se ha propuesto que pueden proporcionar fotosintasas a los corales durante eventos de blanqueamiento cuando pierden gran parte de su simbionte principal (Symbiodiniaceae) (Fine & Loya, 2002). La ambigüedad que rodea a *Ostreobium* se debe a que distintos enfoques en estudios de lo han pasado por alto restringiendo los análisis a comunidades bacterianas o a Symbiodiniaceae (Cunning *et al.*, 2018; D'Angelo *et al.*, 2015; Grottoli *et al.*, 2018; LaJeunesse *et al.*, 2018).

La biomasa de *Ostreobium* incrementa bajo condiciones de calentamiento global y acidificación oceánica inducidas por acciones antropogénicas (Reyes-Nivia *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que esta alga presenta altos niveles de diversidad genotípica y se ha hipotetizado que dicha diversidad les confiere a su vez alta diversidad fisiológica (Verbruggen & Tribollet, 2011).

Las tendencias actuales de estas condiciones ponen en riesgo a comunidades arrecifales a nivel mundial (Burke *et al.*, 2011; Feely *et al.*, 2009; Guinotte & Fabry, 2008; Hubbard *et al.*, 2016). Sin embargo, existen ambientes como las ventilas hidrotermales someras que permiten estudiar las respuestas de los organismos arrecifales ante condiciones de alta temperatura, bajo pH y niveles considerables de toxicidad. Los corales expuestos a ambientes hidrotermales han desarrollado estrategias adaptativas para sobrevivir en condiciones adversas (Camp *et al.*, 2017; Palumbi *et al.*, 2014).

La prevalencia de poblaciones coralinas que viven en los límites de tolerancia de estresores ambientales es de extrema importancia puesto que demuestran alto potencial de sobrevivencia ante los efectos del cambio climático y por lo tanto representan importantes reservorios genéticos para poblaciones que no han sido expuestas a condiciones extremas (Camp *et al.*, 2018; Grottoli *et al.*, 2018; Morikawa & Palumbi, 2019).

La presente investigación aportará en la información genética y distribución geográfica de *Ostreobium*; y en la potencial respuesta de corales del género *Porites* bajo condiciones hidrotermales en el Golfo de California. Esta información no solo será de relevancia para la región de estudio, sino que generará nuevas interrogantes respecto respecto a las dinámicas de *Ostreobium* a nivel global.

III. OBJETIVOS

A. General

Explorar la diversidad de linajes del endolito *Ostreobium* en el coral *Porites panamensis* en un ambiente hidrotermal somero en Bahía Concepción, Golfo de California.

B. Específicos

Implementar un flujo de trabajo para el procesamiento de secuencias de *Ostreobium* partiendo de los métodos de secuenciación RNA-seq y Amplicon-seq

Comparar los niveles de diversidad recuperados de ambos tipos de secuenciación

Determinar la relación filogenética de los linajes de *Ostreobium* identificados respecto a la diversidad conocida actualmente

IV. HIPÓTESIS

El endolito fotosintético *Ostreobium* spp. se ha adaptado para sobrevivir en condiciones limitadas de luz y CO₂. Además, se ha demostrado que aumentan su biomasa bajo condiciones ácidas. Por lo tanto, se espera detectar una composición de linajes de *Ostreobium* diversa y diferente en un ambiente hidrotermal, característico por presentar pH ácido, elevadas temperaturas y eutrofización, con respecto a la diversidad conocida actualmente.

V. MARCO TEÓRICO

A. Ecosistemas arrecifales

Los arrecifes de coral son ecosistemas marinos someros definidos por estructuras físicas y organismos que los habitan. Están conformados principalmente por corales del orden Scleractinia, conocidos también como corales hermatípicos. Estos corales secretan un esqueleto de carbonato de calcio y forman estructuras coloniales masivas que permiten ser la base en la formación de ecosistemas arrecifales (Spalding *et al.*, 2001). Además, otros organismos importantes que contribuyen con la diversidad estructural de los arrecifes son los corales blandos, esponjas, macroalgas, equinodermos, moluscos, entre otros (Sheppard *et al.*, 2018).

El ambiente heterogéneo dado por la complejidad estructural de estos ecosistemas permite albergar entre 600,000 a más de 9 millones de especies de animales y plantas a nivel global. Sin embargo, no se conoce una cifra exacta respecto a su biodiversidad puesto que se estima que solo se han descrito el 10% de especies asociadas a arrecifes (Knowlton, 2001; Sheppard *et al.*, 2018). Esta amplia diversidad se debe a que los ecosistemas arrecifales proporcionan hábitats y microhábitats clave para la protección, crianza y fuente de alimento para distintas especies marinas (Gratwicke & Speight, 2005).

La distribución de estos ecosistemas se restringe a áreas tropicales y subtropicales someras debido a su dependencia con la luz solar (Sheppard *et al.*, 2018; Burke *et al.*, 2011). Se han definido 6 regiones mayores en donde se encuentran distribuidos ecosistemas arrecifales, siendo estas: Atlántico, Australia, Océano Indico, Medio Oriente, Pacífico y Suroeste Asiático. Se estima que el área total que abarcan estos ecosistemas a nivel global es de aproximadamente 250,000 km² (Burke *et al.*, 2011).

Los arrecifes son ecosistemas altamente vulnerables ante amenazas globales como calentamiento de océanos y acidificación oceánica. Estas amenazas son las principales causantes en provocar los fenómenos de blanqueamiento coralino, en donde los corales son expuestos a condiciones estresantes de alta temperatura y en consecuencia expulsan gran parte de sus simbiontes fotosintéticos (Camp *et al.*, 2018). Además, existen amenazas locales tales como desarrollo costero, contaminación agroquímica, contaminación por desechos sólidos y sobre pesca (Burke *et al.*, 2011). El incremento de la temperatura superficial oceánica se ha vuelto uno de los principales estresores para los corales escleractinios. Los aumentos de la temperatura superficial las regiones del océano Índico, sureste asiático y algunas partes del Pacífico están asociadas al fenómeno tropical El Niño (ENSO); lo cual ha aumentado los eventos de blanqueamiento coralino (Walker *et al.*, 2010)

B. Tipos de ambientes arrecifales

Desde la diversificación de los metazoos en el período Cámbrico, (540 m.a) distintos organismos han evolucionado características asociadas a formaciones arrecifales, lo cual ha provocado dificultad de caracterizar a dichos ecosistemas de manera universal (Wood, 1999). Sin embargo, las comunidades bénticas de los ecosistemas arrecifales generalmente definen los tipos de fondos determinados por la composición taxonómica de los organismos que los conforman (Hochberg *et al.*, 2003). En términos generales, las comunidades asociadas a arrecifes están dadas por interacciones entre corales, algas y sedimentos de carbonato (Kinsley, 1985, como se citó en Hochberg *et al.*, 2003).

1. Camas de rodolitos

Estos ambientes están constituidos por agregaciones extensas de nódulos de algas calcáreas no geniculadas en hábito de vida libre (Bosence, 1983; Foster, 2001). Las algas coralinas pertenecen a las algas rojas (Rhodophyta) y se caracterizan por presentar un tallo pétreo formado por depósitos de calcita en sus paredes celulares. Se pueden desarrollar en

hábitos epífitos, epizoicos y endófitos. Sin embargo, ante la ausencia de sustratos sólidos, las algas coralinas se desarrollan en forma de nódulos y colonizan el lecho marino sedimentario, creando camas o bancos de rodolitos (Littler & Littler, 2013). A nivel taxonómico, se han descrito alrededor 71 especies distribuidas en los 8 géneros más comunes de algas rojas coralinas formadoras de rodolitos (*Hydrolithon*, *Neogoniolithon*, *Lithophyllum*, *Sporolithon*, *Lithothamnion*, *Phymatolithon*, *Mesophyllum* y *Spongites*) (Harvey & Woelkerling, 2007).

Estas agregaciones imparten un rol crítico en la consolidación de los arrecifes coralinos tropicales debido a su alta capacidad de producción de materia calcárea (Björk *et al.*, 1995; Littler, 1972; Stanley, 2003). La distribución de dichos ecosistemas abarca desde regiones polares hasta los trópicos. Su abundancia predomina en el Mediterráneo, el noroeste del atlántico, la región del Caribe, el Golfo de California, la plataforma continental del este de Brasil, el sur de Japón y en el oeste de Australia (Foster, 2001).

Las camas de rodolitos son ambientes heterogéneos complejos que brindan hábitats que permiten albergar alta diversidad de comunidades bénticas (Steller *et al.*, 2003). Además, estudios han comprobado que estos ecosistemas también permiten el reclutamiento de invertebrados de alto valor comercial, especies de corales y equinodermos bajo protección y criptofauna (Foster, 2001; Riosmena-Rodríguez *et al.*, 2010; Riosmena-Rodríguez & Medina-López, 2010).

La asociación entre corales escleractinios y las agregaciones de rodolitos se considera beneficiosa en gran parte debido al rol que presentan en la cadena energética de arrecifes coralinos. La presencia de especies herbívoras coralinas promueven la eliminación de epífitas que reducen la cantidad de luz disponible (Littler & Littler, 2013). Por otra parte, se ha demostrado que larvas de coral son capaces de seleccionar especies de algas rojas coralinas como sitios de asentamiento por medio de señales químicas como una estrategia antiincrustante por motivos de competencia de espacio (Harrington *et al.*, 2004).

En el Golfo de California se ha reportado que la capacidad fotosintética y calcificante de los rodolitos disminuye durante el verano, lo cual sugiere que son ecosistemas vulnerables ante cambios drásticos de temperatura (Steller, 2007). Por lo tanto, su manejo debe ser considerado puesto que son hábitats cruciales para la recuperación de especies de importancia ecológica y económica (Hinojosa-Arango *et al.*, 2014).

La densidad de rodolitos, tanto en términos de especies como características de crecimiento (e.g. ramificaciones y volumen del talo) contribuyen con incrementos en la abundancia y riqueza de organismos. Esto se debe a que aumenta de espacio disponible y el sustrato es más estable ante perturbaciones de olas (Hinojosa Arango & Riosmena-Rodriguez, 2004; Steller *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que la abundancia de criptofauna en camas de rodolitos suele incrementar por acumulación a medida que crecen los rodolitos (Foster *et al.*, 2007).

C. Ambientes marginales

Los ambientes marginales son aquellos que presentan comunidades coralinas bajo condiciones que se acercan a los umbrales de tolerancia ambiental para el desarrollo y la sobrevivencia de corales. Estas pueden ser condiciones altas o bajas de temperatura, salinidad, concentración de nutrientes; o baja penetración de luz y saturación de aragonito (Kleypas *et al.*, 1999; Perry & Larcombe, 2003). Los ambientes marginales pueden propiciarse en áreas de elevada y baja altitud, zonas de flujo de nutrientes o afloramientos y áreas con alta turbidez (Benzoni *et al.*, 2003; Johannes *et al.*, 1983; Moyer *et al.*, 2003; Perry & Larcombe, 2003).

Algunos sistemas naturales presentan variaciones naturales de temperatura, como las pozas de marea en las Islas Samoa (Camp *et al.*, 2018). Estas pozas se han caracterizado por albergar altos niveles de diversidad de comunidades coralinas a pesar de presentar cambios térmicos y biogeoquímicos drásticos, por lo que han sido sujeto de estudio para comprender los regímenes de tolerancia térmica en corales escleractinio (Craig *et al.*, 2001; Koweek *et al.*, 2015; Oliver & Palumbi, 2011).

Entre otros ecosistemas que presentan comunidades coralinas en ambientes marginales son los arrecifes del Golfo Pérsico-Arábigo (PAG por sus siglas en inglés). Estos sitios experimentan las temperaturas oceánicas más altas conocidas durante la temporada de verano y elevadas concentraciones de salinidad ($> 41\text{kg/g}$) (Ibrahim *et al.*, 2020; B. M. Riegl *et al.*, 2011). Sin embargo, se han registrado alrededor de 60 especies de coral (B. Riegl & Purkis, 2011); lo cual ha despertado interés para estudiar los mecanismos que estos corales han desarrollado para sobrevivir y prosperar en condiciones que reflejan los escenarios futuros del cambio climático (E. F. Camp *et al.*, 2018).

Los arrecifes que se desarrollan en ambientes turbios y mesofóticos ($>30\text{ m}$) presentan limitaciones en la disponibilidad de luz solar (Kahng *et al.*, 2019; Morgan *et al.*, 2020). Esto generalmente se considera como un factor restrictivo en la distribución de los corales, puesto que los dinoflagelados simbiotes no pueden llevar a cabo los procesos fotosintéticos de efectivamente (Rogers, 1990). No obstante, los eventos de estrés térmico globales generan impactos negativos en los ecosistemas arrecifales someros cristalinos debido a la excesiva irradiación que experimentan (Ayoub *et al.*, 2006). Por lo tanto, se ha propuesto que los ambientes marginales turbios y mesofóticos pueden actuar como sitios potenciales de refugio para las especies de coral y otros organismos que dependen de ellos (Armstrong *et al.*, 2013; Cacciapaglia & van Woesik, 2015).

Las condiciones naturales de bajo pH y altas concentraciones de CO_2 generan ambientes marginales que reflejan los procesos que se observan durante eventos de acidificación oceánica inducida por factores antropogénicos (Aiuppa *et al.*, 2021). El océano absorbe el exceso del CO_2 atmosférico y debido al incremento de emisiones de gases de efecto invernadero los niveles de pH han disminuido drásticamente y esto resulta en una reducción en la saturación de los diferentes estados minerales del carbonato de calcio, como el aragonito (Feely *et al.*, 2009). Las consecuencias directas se observan en la integridad de organismos marinos calcificantes (Guinotte & Fabry, 2008; Kroeker *et al.*, 2013). Existen ambientes naturales que presentan estas condiciones y albergan biodiversidad clave; entre estos las ventilas hidrotermales y sitios de emanación de manantiales marinos (Camp *et al.*, 2018).

1. Sistemas hidrotermales

Las ventilas de filtración de CO₂ son sistemas submareales someros o profundos que surgen en dorsales medio-oceánicas, arcos insulares y en el mar epicontinental. Estos sistemas se caracterizan por presentar condiciones contrastantes respecto a otros ecosistemas marinos principalmente por elevadas temperaturas, enriquecimiento en compuestos reductores, gases y metales pesados. (Tarasov *et al.*, 2005). Para considerar una ventila como somera esta debe presentarse a profundidades menores de 212 m principalmente por diferencias en composición faunística y otros parámetros ambientales (e.g penetración de luz, presión) (Price & Giovannelli, 2017; Tarasov *et al.*, 2005).

Diferentes fenómenos geológicos conocidos han generado ventilas hidrotermales someras. Islandia presenta cerca de sus costas sobre la dorsal mid-Atlántica actividad hidrotermal, el rift Terceira ha dado lugar a las ventilas de Azores, los arcos volcánicos de Kermadec y las Antillas Menores, puntos calientes de Hawaii, Samoa e Islandia; en márgenes continentales sobre tectónicas extensionales del Pacífico Este y el Golfo de California (Dando, 2010).

Los fluidos hidrotermales de ventilas someras están enriquecidos con sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), cloro (Cl), óxido de silicio (IV) (SiO₂), sulfuro de hidrógeno (H₂S), dióxido de carbono (CO₂); y carecen de sulfatos (SO₄) y magnesio (Mg) respecto al agua marina circundante. La temperatura generalmente sobrepasa los 90°C, siendo la temperatura máxima reportada 135°C. La acidez puede llegar niveles de pH desde 5.7 hasta 1.9 (Price & Giovannelli, 2017; Prol-Ledesma *et al.*, 2004). El gas predominante emanado por estos sistemas es el CO₂, teniendo un promedio de 87±20.7 vol% a menores niveles hidrógeno (H₂), metano (CH₄) y H₂S (Aiuppa *et al.*, 2021).

Hasta la fecha, se han identificado 70 ventilas hidrotermales someras de origen volcánico (Price & Giovannelli, 2017). Sin embargo, no se han explorado todas y únicamente se ha generado información acerca de características geoquímicas y/o biológicas en 56 de ellas (Aiuppa *et al.*, 2021).

Las ventilas hidrotermales someras son capaces de albergar distintos tipos de fauna a nivel micro- y macroscópico (Dando, 2010). Los niveles de diversidad suelen ser bajos debido a los incrementos periódicos de temperatura y disminución de pH (Fricke *et al.*, 1989; Melwani & Kim, 2008). Sin embargo, un estudio en el sistema hidrotermal de la Isla de Milos, Mar Egeo registró elevados niveles de diversidad de especies epibénticas (Chlorophyta, Cnidaria, Mollusca, Annelida y Chordata). A partir de este descubrimiento surgieron 7 hipótesis complementarias que intentan explicar el fenómeno observado: (1) las ventilas presentan características de perturbación intermedia, lo cual induce la mortalidad de organismos y permite la coexistencia de varias especies; (2) la alta temperatura durante el verano favorece el desarrollo de las especies de aguas cálidas; (3) las emanaciones de la ventila generan alteraciones en la capa más profunda de agua, provocando rugosidad en el lecho marino y aumentando la heterogeneidad del hábitat; (4) la deposición de minerales aumenta la bioconstrucción con calcio y aumentan los sitios libres para habitar; (5) la emisión de fluidos induce mecanismos advectivos que favorecen el reclutamiento; (6) las ventilas emanan nutrientes que aumentan la productividad primaria; y (7) la quimiosíntesis bacteriana favorece la fotosíntesis y por lo tanto proporciona alta diversidad de fuentes de alimento para la fauna (Bianchi *et al.*, 2011).

2. Arrecifes asociados a sistemas hidrotermales

Los corales escleractinios son altamente susceptibles ante cambios de pH en el ambiente marino ya que su naturaleza sésil no les permite trasladarse a sitios con condiciones más favorables y su capacidad calcificante se disminuye (Goreau & Hayes, 1994; Jury *et al.*, 2019). Generalmente, especies formadoras de arrecifes desaparecen de ambientes ácidos y se reemplazan con especies resistentes a condiciones ácidas (e.g. *Porites* spp.) y corales suaves (Crook *et al.*, 2011; González-Delgado & Hernández, 2018).

Se han registrado comunidades coralinas en cercanías a ambientes hidrotermales en Papau, Nueva Guinea (Pichler, 1998; Pichler & Dix, 1996), Isquia, Italia (Hall-Spencer *et al.*, 2008); Islas Ryūkyū (Iwotoroshima y Taketomi), Japón (Inoue *et al.*, 2013;

Nakamura *et al.*, 2006), el norte de las Islas Marianas (I. Enochs *et al.*, 2015) y en Bahía Concepción, Baja California (Oporto-Guerrero *et al.*, 2018).

Los corales asociados al sistema hidrotermal de Bahía Concepción en el Golfo de California se presentan en parches monoespecíficos conformados por las especies *Porites panamensis* y *Porites sverdrupi* (Oporto-Guerrero *et al.*, 2018). La composición química del fluido hidrotermal está enriquecida con Ca, As, Hg, Mn, Ba, HCO₃, Li, Sr, B, I, Cs, Fe y Si. Además, presenta temperaturas variantes entre 72- 87°C y bajos niveles de pH 5.95-6.02 (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). La composición de los gases emanados por la ventila es de 44% CO₂, 54% N₂, 2.2% CH₄, 0.7% Ar, 0.04 He, 0.007% H₂ y 0.2% O₂ (Forrest *et al.*, 2005).

Dadas las características fisicoquímicas de estos ambientes, se considera que son sitios análogos naturales para estudiar el impacto de la acidificación oceánica (Aiuppa *et al.*, 2021). Múltiples especies arrecifales han demostrado gran capacidad de resiliencia ante condiciones poco favorables (E. Camp *et al.*, 2017; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2017; Porzio *et al.*, 2011); lo cual sugiere que las presiones ambientales a las que están expuestas les ha permitido desarrollar respuestas adaptativas (Calosi *et al.*, 2013).

D. Estrategias adaptativas en corales

Tras los múltiples eventos de blanqueamiento de coral que han surgido en los últimos 20 años, se han observado distintos tipos de respuestas en especies individuales y en poblaciones coralinas (Sully *et al.*, 2019). Según patrones de susceptibilidad observados en corales del Sureste de Asia, las especies que habitan en regiones sujetas a cambios en los regímenes de temperatura oceánica son más resistentes a estrés térmico en comparación con especies que habitan en ambientes poco variables (Guest *et al.*, 2012).

Investigaciones en los arrecifes del Golfo Pérsico-Arábigo han revelado mecanismos de adaptación desde niveles genéticos y metabólicos hasta rasgos fisiológicos (Camp *et al.*, 2018). Se han observado diferencias en expresión de genes en corales resilientes ante

estresores ambientales, lo cual sugiere que existen procesos regulatorios mediados por genes que permiten mantener la resiliencia fisiológica (Barshis *et al.*, 2013). A nivel genético, se han descubierto alrededor de 100 loci que potencialmente confieren tolerancia térmica y detectaron estos son más abundante en corales que están expuestos a condiciones microclimáticas más cálidas respecto a otros corales dentro de un mismo arrecife (Bay & Palumbi, 2014).

La sobrevivencia de los corales depende de su simbiosis con el dinoflagelado fotosintético perteneciente a la familia Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2018). No obstante, esta interacción es altamente vulnerable a múltiples amenazas ambientales ((Smith *et al.*, 2017). Se ha descubierto que algunos corales albergan simbiontes termo tolerantes (e.g. *Symbiodinium thermophilum*), lo cual los hace menos susceptibles a los incrementos de temperatura superficial oceánica (D'Angelo *et al.*, 2015). Asimismo, se ha sugerido que dichas interacciones simbióticas están conformadas según las condiciones a las que está expuesta el hospedero y que la composición de las mismas puede cambiar conforme se presentan cambios ambientales (Cunning *et al.*, 2018; Oliver & Palumbi, 2011).

Las comunidades bacterianas imparten roles funcionales para la fisiología de los corales incluyendo la fijación de nitrógeno, prevención ante infecciones patogénicas, digestión de nutrientes; entre otros (Rosenberg *et al.*, 2007). Se ha observado que la respuesta de comunidades bacterianas durante eventos de estrés térmico difiere entre corales que habitan ambientes cálidos con variaciones de temperatura y corales en ambientes templados. Esto sugiere que la estabilidad del microbioma de los corales está directamente relacionada con mecanismos de tolerancia térmica (Grottoli *et al.*, 2018; Ziegler *et al.*, 2017).

Los eventos de blanqueamiento dejan a los corales vulnerables ante diversos factores como enfermedades e inanición (Brandt & McManus, 2009). La falta de fuente energética una de las principales razones por la que los corales no sobreviven (Kannapiran *et al.*, 2012). El esqueleto de los corales está colonizado principalmente por un alga verde perteneciente al género *Ostreobium* (Shashar *et al.*, 1997). Actualmente sigue existiendo

disputa respecto a la función de este organismo en los corales. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que proporcionan una fuente alternativa de energía por medio de los productos de la fotosíntesis durante eventos de blanqueamiento (Fine & Loya, 2002).

E. Endolito fotosintético *Ostreobium* spp. en corales escleractinios

Ostreobium es un género de alga verde endolítica perteneciente al orden Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) (Verbruggen *et al.*, 2009; Zechman *et al.*, 1990). Su hábito endolítico se refiere a que vive dentro de un sustrato duro (esqueleto de coral) y disuelve cavidades pequeñas para establecerse. Además, son organismos fotótrofos, es decir, dependen de la luz para llevar a cabo reacciones fotosintéticas para obtener su alimento. Morfológicamente se distingue por presentar ramificaciones tubulares con células que contienen múltiples núcleos y cloroplastos (Verbruggen & Tribollet, 2011). La colonización de *Ostreobium* en esqueletos coralinos inicia justo después que las larvas se adhieren a un sustrato fijo y se multiplican conforme el esqueleto va creciendo (Massé *et al.*, 2018). La distribución geográfica de estos linajes no se restringe a latitudes tropicales, pues su naturaleza ‘extrema’ le permite sobrevivir en regiones de elevada altitud, profundidades someras o profundas (Gonzalez-Zapata *et al.*, 2018; Schlichter *et al.*, 1997) y en sitios con limitaciones de luz directa (Hoeksema, 2012).

Las comunidades endolíticas se pueden observar macroscópicamente como líneas de bandas verdes dentro del esqueleto de corales del género *Porites* spp. (Le Campion-Alsumard *et al.*, 1995 como se citó en Massé *et al.*, 2018). La biomasa de algas verdes endolíticas excede alrededor de 16 veces la biomasa de los simbiontes Symbiodiniaceae presentes en el tejido de los corales (Odum y Odum, 1955, como se citó en Marcelino *et al.*, 2017) Otros organismos fotosintéticos, el tejido y la capa superficial del esqueleto absorben gran parte de la luz solar irradiada, provocando que *Ostreobium* solo cuente con disponibilidad de menos del 1% de luz disponible (Halldal, 1968; Matthes *et al.*, 2001). El espectro de luz al que fotosintetizan se extiende hasta longitudes de onda roja lejanas (Magnusson *et al.*, 2007). Por lo tanto, han desarrollado mecanismos de limitaciones de recursos (R. Marcelino *et al.*, 2016).

La función de estos organismos ha sido debatida por algunos autores puesto que también contribuyen con la bioerosión de los esqueletos coralinos (Verbruggen & Tribollet, 2011). Dicha capacidad de bioerosión les confiere habilidad para dispersarse dentro del esqueleto coralino, provocando que presenten niveles de diversidad beta relativamente bajos en comparación con otros organismos que conforman el microbioma endolítico (e.g. procariotas) (Marcelino *et al.*, 2018). No obstante, se cree que su capacidad fotosintética puede facilitar la sobrevivencia de corales durante eventos de blanqueamiento, prolongando su tiempo de vida para aumentar las posibilidades de volver a obtener a sus simbiontes principales (Fine & Loya, 2002). Tras la expulsión de los simbiontes Symbiodiniaceae, la densidad de *Ostreobium* aumenta considerablemente debido al incremento en la penetración de incidencia de luz y al aumento en la disponibilidad de nitrógeno y CO₂ (Diaz-Pulido & McCook, 2002; Fine *et al.*, 2006; Iha *et al.*, 2021).

Por otro lado, se ha demostrado que la capacidad de bioerosión y la estructura de comunidades endolíticas, incluyendo algas verdes, bacterias y hongos; se ven afectadas bajo condiciones ácidas (bajo pH) y elevados niveles de materia orgánica (Carreiro-Silva *et al.*, 2009; Tribollet *et al.*, 2009).

1. Estudios genéticos de *Ostreobium* spp.

El endolito *Ostreobium* ha sido relativamente poco estudiado en comparación con organismos hospederos, dinoflagelados simbiontes y comunidades procariotas que habitan el microbioma de los corales (Cunning *et al.*, 2018; D'Angelo *et al.*, 2015; Grotoli *et al.*, 2018; LaJeunesse *et al.*, 2018).

La información molecular de *Ostreobium* se ha obtenido a partir de la secuenciación de amplicones de marcadores genéticos codificados por plastidios (e.g. 16S, 18S, tufA, rbcL, UPA) (Marcelino & Verbruggen, 2016, 2017; Sauvage *et al.*, 2016). La evidencia recopilada sugiere que se ha subestimado la diversidad de este género, pues estudios han reportado números variables de linajes genéticos diferentes y se cree que la diversidad de especies es mucho mayor a la reportada en literatura hasta la fecha (Gutner-Hoch & Fine, 2011). Adicionalmente, se han registrado linajes crípticos cuya resolución taxonómica aún

está por resolver; y se ha observado que existe una zonificación marcada de linajes genéticos según la profundidad. Este hallazgo sugiere que la dicha estructuración se debe a el contexto paisajístico de los arrecifes (Gonzalez-Zapata *et al.*, 2018).

El marcador molecular 16S es uno de los mejores representados para *Ostreobium* en bases de datos públicas debido a que se obtienen muestras de plastidios en estudios de microbioma de distintos organismos en el medio marino (del Campo *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha comprobado que se subestima grandemente la diversidad de algas al implementar únicamente los marcadores 16S y 18S (Marcelino & Verbruggen, 2016).

Según la reconstrucción filogenética del marcador 16S (Campo *et al.* 2017), *Ostreobium* pertenece a un grupo monofilético subdividido en 3 clados (nombrados como 1, 2 y 3) con soporte del 100%. Además, determinaron que los clados 3 y 4 están distribuidos principalmente en el Caribe y el Océano Sur Atlántico, mientras que el clado 1 es relativamente escaso en dichas regiones -pero aún presente- y cuenta con una distribución más global (Caribe, Pacífico -Mar del Coral, Mar de la China Meridional-, mar Mediterráneo y océano Sur Atlántico) presente en especies coralinas complejas de la familia Acroporidae, Poritidae Sidastrae; y en familias menos complejas como Caryophylliidae, Faviidae y Mussidae. La distribución de dichos clados presenta patrones similares a los de los simbiontes dominante de la familia Symbiodiniaceae, sugiriendo una posible co-evolución en el sistema holobionte (del Campo *et al.*, 2017).

El marcador de cloroplasto rbcL (subunidad grande de RubisCO) representa una región genética de carácter fisiológico que se caracteriza por estar involucrada en procesos de fijación de carbono, por lo que se ha propuesto su aplicación en estudios que evalúan cambios en la diversidad de mediados por factores ambientales (Kellogg & Juliano, 1997).

Por otro lado, *Ostreobium* cuenta con una sola copia del gen rbcL, lo cual indica que es una región genética apropiada para análisis filogenéticos. Utilizando dicho marcador, se ha demostrado estructura en la diversidad genotípica de 7 linajes de *Ostreobium* según estratos de profundidad. Este hallazgo sugiere que distintos linajes presentan diferentes rasgos

fisiológicos para adaptarse a las condiciones ambientales a las que están expuestos. Además, se implementó una nomenclatura diferente para la determinación de los clados identificados, en donde cada clado es representado por una letra del alfabeto y las agrupaciones dentro de cada clado se diferencian utilizando números (e.g. clado B, subtipo B1) (Gutner-Hoch & Fine, 2011)

Un estudio de microbioma endolítico implementó un análisis por medio de múltiples marcadores moleculares (*tufA*, 16S, 18S) y reveló la existencia de más de 80 unidades taxonómicas diferentes a nivel de especie del género *Ostreobium*; y varios linajes pertenecientes a familias aún no descritas. El análisis filogenético realizado en el mismo estudio sugirió que *Ostreobium* podría estar representado por un nuevo suborden llamado *Ostreobinidae* (Marcelino & Verbruggen, 2016). El marcador *tufA* (codificante para la cadena de proteínas de factor de elongación) presenta funciones altamente conservadas asociadas a los procesos de traducción de ARN en eubacterias, endosimbiontes eucariotas y organelos (particularmente en el cloroplasto). Se considera como uno de los mejores marcadores candidatos para estudios de códigos de barras de organismos fotosintéticos debido a su elevada tasa de amplificación. Además, presenta una alta tasa evolutiva en comparación con otros genes como *rbcL*, 16S, 18S, *UPA* e *ITS*; lo cual sugiere que es apto para su aplicación en filogenéticos (Saunders & Kucera, 2010).

Un estudio de comunidades endolíticas en corales masivos (*Porites* spp.) y ramificados (*Seriatopora hystrix* y *Pocillopora damicornis*) en ambientes con altas concentraciones de CO₂ demostró que dichas comunidades (incluyendo bacterias, hongos, archaeas y algas verdes) no cambian significativamente en su composición y estructura respecto a corales en condiciones control, sugiriendo que dichas comunidades son relativamente estables. Sin embargo, observaron diferencias en la composición de endolitos las especies ramificantes respecto a las masivas (Marcelino *et al.*, 2017).

El tamaño del genoma de cloroplasto de *Ostreobium* es relativamente reducido (81,997 nucleótidos) y se atribuye a las condiciones limitantes a las que está expuesto. Se cree que procesos de replicación y reparación de ADN en *Ostreobium* son menos frecuentes debido

a las poca irradiación solar a la que está expuesto y su consecuente lento metabolismo y crecimiento (Marcelino *et al.*, 2016).

El genoma mitocondrial de *Ostreobium queretii* está conformado por 241,739 pb y es considerado, hasta la fecha, el genoma más grande de las algas verdes. El tamaño del genoma mitocondrial contrastante respecto al genoma de cloroplasto sugiere que el tamaño efectivo poblacional y los procesos de recombinación/mutación influenciados por proteínas nucleares presenta dinámicas diferentes entre los genomas y por lo tanto la presión selectiva del ambiente limitante no actúa sobre la expansión del genoma mitocondrial de *Ostreobium*. Las implicaciones de esto sugieren que los organismos dentro de este orden presentan tamaños poblacionales efectivos (Repetti *et al.*, 2020).

En el año 2021 se publicó el primer genoma nuclear de *Ostreobium*. En este estudio se encontraron diferencias en la producción proteínas asociadas al almacenamiento de luz solar, sugiriendo adaptaciones genómicas a ambientes con condiciones de luz deficientes (Iha *et al.*, 2021).

F. Corales del género *Porites*

Porites es un género colonial de coral (Anthozoa: Sleractinia). Generalmente, su crecimiento colonial es masivo y por consiguiente son elementos dominantes para muchas regiones arrecifales. Algunas especies pueden presentar morfologías ramificantes e incrustantes, pero estas usualmente se restringen a sitios más aislados (Pichon, 2011). Uno de los factores más característicos que resaltan dentro de este género es que diversas especies han demostrado altos niveles de tolerancia y resiliencia ante condiciones estresoras de origen natural y antropogénico (Carilli *et al.*, 2017; O'Brien *et al.*, 2018; Visram & Douglas, 2007).

El esquema de formación de su esqueleto proporciona información sobre otros aspectos de su desarrollo e historia ecológica, como la tasa de crecimiento colonial y condiciones ambientales pasadas (Knutson *et al.*, 1972; McGregor & Gagan, 2003). Por lo tanto, es

ampliamente utilizado en estudios ecológicos, geológicos, evolutivos; entre otros (Pichon, 2011).

Porites sverdrupi es una especie endémica del Golfo de California asociada a camas de rodolitos (López-Pérez *et al.*, 2003; Reyes-Bonilla & Fosters, 1997). Está catalogada como vulnerable según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, por sus siglas en inglés) debido a múltiples amenazas, entre estas distribución limitada y fragmentación de hábitat (Chiriboga *et al.*, 2008). Además, se ha sugerido que *P. sverdrupi* presenta niveles de tolerancia térmica bastante limitados en contraste con otras especies congénéricas (Paz-García & Balart, 2015).

Porites panamensis es una especie de crecimiento masivo endémica del Pacífico Oriental. Su estado de conservación según la UICN es de preocupación menor (Guzmán & Cortés, 2008), puesto que es una de las especies del género con mayor distribución latitudinal en el Pacífico Este y capacidad por tolerar condiciones poro favorables (Halfar *et al.*, 2005; Zapata & Lozano-Cortés, 2015) . Su capacidad de tolerancia se ha demostrado por no presentar cambios significativos en sus tasas de calcificación al estar expuestos a concentraciones altas de CO₂ (Fabricius *et al.*, 2011) Durante la última década se reportó la existencia de esta especie en cercanías de una ventila hidrotermal en el Golfo de California. Las condiciones reportadas variaron según la posición de la fuente hidrotermal, presentando un promedio de pH de 6.69. Colonias de *P. panamensis* fueron reportadas bajo temperaturas de 30->48°C y bajo pH de 6.4 (Oporto-Guerrero *et al.*, 2018).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Sitio de estudio

Bahía Concepción se encuentra ubicada en la costa occidental del Golfo de California (Figura 1). Presenta variaciones hidrográficas espacio-temporales debido a factores como radiación solar, afloramientos, estratificación de la columna de agua y Corrientes de viento. Durante la temporada de invierno presenta un ambiente homogéneo y frío, mientras que en verano se genera un ambiente estratificado y cálido (Obeso-Nieblas *et al.*, 2012).

1. La Ventila

El sistema hidrotermal contemplado en el presente estudio se encuentra en las cercanías de Punta Bárbara (Figura 1) Se caracteriza por presentar flujos hidrotermales de temperaturas que varían desde 50°C a 87°C. El agua circundante está enriquecida con Ca, As, Hg, Mn, Ba, HCO₃, Li, Sr, B, I, Cs, Fe y Si (Prol-Ledesma *et al.*, 2004). El pH del agua puede descender hasta 7.09 (Treviño, 2020).

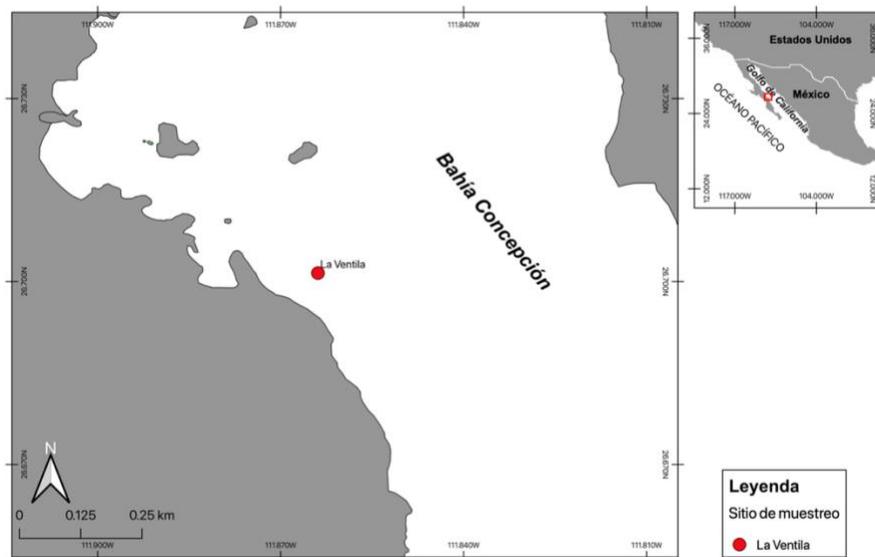


Figura 1. Ubicación geográfica de sitio de recolecta

B. Obtención de datos

Las muestras se obtuvieron en recolectas realizadas en febrero del 2018 en la localidad descrita anteriormente, referida como como La Ventila. La recolecta se llevó a cabo por medio de una inmersión SCUBA en un transecto de 50 metros atravesando un arco de ventilas hidrotermales a profundidad somera (~4-5 m). Las colonias muestreadas se ubicaban a ≥ 1 m respecto a la línea del transecto. Se tomó la temperatura correspondiente a cada punto de toma de muestra a lo largo del transecto. Las muestras que se encontraban a $>25^{\circ}\text{C}$ se consideraron como “on-vent” y las que se encontraban a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ se consideraron como “off-vent”.

Los fragmentos se extrajeron de colonias de *P. panamensis* utilizando un cincel y fueron almacenados en bolsas previamente identificadas. Posteriormente, dichos fragmentos se trasladaron a tubos estériles con RNA-later y se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento. Los organismos de interés de donde se obtuvieron los fragmentos se encontraban a un estrato de profundidad somero (~4-5 m). Las muestras recolectadas fueron almacenadas para su posterior extracción y secuenciación de ARN (de aquí en adelante referido como RNA-seq); y para la extracción de ADN por medio del método de secuenciación de amplicón de la región V4 del gen 16S (método referido como Amplicon-seq).

Cuadro 1. Descripción de datos por analizar

Localidad	Tratamiento	Profundidad	Librerías Amplicon- seq	Librerías RNA-seq
La Ventila	<i>On-vent</i> (8)/ <i>Off-vent</i> (3)	~4-5 m	11	11

Cuadro 2. Tratamientos según las condiciones de muestras consideradas

Tratamiento	ID Muestra
<i>Ventila</i>	553
	554
	555
	556
	557
	559
	560
	561
<i>Control</i>	549
	552
	558

C. Extracción de ADN y ARN y preparación de librerías

1. Amplicon-seq

Las muestras se sometieron a un drenaje del exceso de etanol y se aclararon tres veces con agua estéril. Cada muestra se trituró con un mortero de polipropileno esterilizado. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN microbiano se llevó a cabo utilizando el kit Qiagen DNEasy PowerSoil, siguiendo el protocolo del fabricante. Las concentraciones de ADN extraído se midieron a través de un Floirometro Qubit2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se almacenaron a -20°C.

Las muestras de ADN se enviaron a la división de Preparación y Secuenciación de Muestras Ambientales (Environmental Sample Preparation and Sequencing Facility [ESPSF]) del Laboratorio Nacional Argonne para la preparación de librerías y correspondiente secuenciación. Se amplificó la región V4 del gen 16S ARNr con protocolos optimizados por (Reigel *et al.*, 2020).

2. RNA-seq

La extracción y purificación de ARN total se llevó a cabo utilizando el kit RNeasy® Plus Minikit (QIAGEN). Las librerías se prepararon utilizando un kit NEBNext® Ultra™ Directional Library Prep para Illumina siguiendo el flujo de trabajo del fabricante. Las librerías se enviaron al laboratorio de Genomics Facility del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Louisiana (LSU por sus siglas en inglés) para control de calidad, utilizando un ensayo de alta sensibilidad. Por último, las librerías se enviaron a Oklahoma Medical Research Foundation NGS Core y NOVOGENE, California para la secuenciación respectiva para cada set de muestras por medio de la plataforma Illumina-HiSeq3000/4000.

D. Extracción de secuencias de *Ostreobium*

Para la obtención de secuencias de *Ostreobium* de las librerías RNA-seq y Amplicon-seq, se realizó un mapeo de lecturas de por medio de la herramienta Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). Se utilizaron los parámetros --local -D 20 -R 3 -L 3 -N 1 -p 8 --gbar 1 --mp 3 (Nicholls, 2016). Para esto, se generó un índice con 507 secuencias de *Ostreobium* en formato FASTA publicadas en GenBank (Anexo A). Las secuencias mencionadas pertenecen a diversos estudios enfocados en comunidades microbianas, cuya identidad se confirmó como *Ostreobium* debido a un análisis filogenético realizado por del Campo *et al.* (2016).

E. Asignación taxonómica preliminar

Se utilizó el programa Qiime2-2020.6 (Bolyen *et al.*, 2019) para cuantificar los grupos taxonómicos presentes en las librerías de RNA-seq y Amplicon-Seq. Las secuencias crudas de cada librería fueron importadas a dicho programa y fueron procesadas para el control de calidad. En el caso de las secuencias de las librerías de RNA-seq, estas ya habían sido procesadas en el programa TimGalore v0.6.2 descartando secuencias de baja calidad y poco informativas ($Q > 30$, > 80 pb) (Treviño, 2020). Se utilizó el visualizador en línea de QIIME2 para realizar el control de calidad de las secuencias y posteriores funciones gráficas

(<https://view.qiime2.org/>). Se utilizó el paquete DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) para llevar a cabo el proceso de control de calidad con el método “denoise-paired”, el método consenso para la eliminación de secuencias quiméricas y el subsecuente agrupamiento de lecturas en ASVs (Amplicon Sequence Variant, por sus siglas en inglés). Las secuencias provenientes de las librerías Amplicon-seq se truncaron en la posición 230, tanto para la secuencia forward como la reverse, para mantener el parámetro Q superior a 30.

Los datos de cada librería se unificaron utilizando la función *merge/merge-seqs* en QIIME2 para realizar la asignación taxonómica a partir de un mismo set de datos. Para esto último, se implementó la búsqueda con el algoritmo clasificador Naïve-Bayes (NBC) utilizando la base de datos silva-138-99-nb (Bokulich *et al.*, 2018, 2021).

Se realizó un filtrado taxonómico para llevar a cabo el posterior análisis filogenético con secuencias potencialmente pertenecientes a *Ostreobium* sp. Dado que la aplicación de la base de datos de SILVA no es estrictamente para clasificar a *Ostreobium*, se incluyeron las ASVs denominadas bajo Eukaryota y Cloroplasto. Se optó por conservar dichos niveles taxonómicos ya que (1) *Ostreobium* pertenece al dominio Eucariota y (2) se ha reportado que la designación taxonómica de *Ostreobium* se encuentra erróneamente clasificada en la base de datos SILVA bajo el filo Cianobacteria (Reigel *et al.*, 2021). Para reducir la incidencia de eucariotas conocidos, se excluyó de manera específica todos los ASVs que incluyeran en su asignación taxonómica alguno de los siguientes filos: Cnidaria, Porífera, Artrópoda, Dinoflagellata, Ascomycota, Basidiomycota, Phragmoplastophyta, Ciliophora, Cercozoa y Retaria. Finalmente, los datos fueron exportados para su posterior análisis de diversidad. Dichos datos fueron: tabla de frecuencia de ASVs, archivo de asignación taxonómica, archivo .fasta con secuencias nucleotídicas correspondientes a cada ASV.

F. Filtración por agrupamiento filogenético

Debido a que se obtuvieron ASVs clasificadas en niveles ambiguos/generales (i.e. Cloroplasto, Eukaryota), se procedió a un proceso de exclusión de secuencias según su agrupamiento filogenético y consecuente confirmación de identidad en BLAST. A

continuación, se describe el proceso que se llevó a cabo múltiples veces hasta llegar al set de datos curado para secuencias de *Ostreobium*.

G. Alineamiento de secuencias

Las secuencias correspondientes a cada ASV se importaron al servidor web Galaxy v22.01 (<https://usegalaxy.org/>) para realizar los análisis filogenéticos posteriores (Afgan *et al.*, 2018). Para esto, se llevó a cabo un alineamiento múltiple utilizando MAFFT v7.489 (Kato & Standley, 2013) con el algoritmo --auto. Para verificar la calidad del alineamiento se utilizó software AliView v1.26 (Larsson, 2014) y los gaps fueron considerados como información faltante (missing data).

H. Análisis filogenético

Para determinar la relación filogenética de los linajes de *Ostreobium* presentes en las librerías analizadas, se obtuvo el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó al set de datos. Para esto, se utilizó la herramienta de ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) por medio del programa IQTREE v2.1.2 (Nguyen *et al.*, 2015). Se consideró el criterio BIC para establecer el mejor modelo.

Se utilizó el programa FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018) y el software iTOL (Letunic & Bork, 2021) para la visualización y edición de árboles filogenéticos. Cada árbol se exportó en formato PDF y se procedió a hacer los análisis correspondientes de agrupamiento filogenético. A su vez, se realizaron búsquedas en BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para corroborar la identidad de las ASVs desconocidas. Se generaron archivos con los encabezados de las secuencias a eliminar del archivo fasta general. Para esto, se utilizó la herramienta Filter FASTA por medio de usegalaxy.org.

El proceso anterior se llevó a cabo las veces necesarias hasta el descarte de todas las ASVs que no eran de interés. A partir de esto se continuó con un análisis más a detalle respecto al agrupamiento filogenético de los ASVs filtrados.

I. Determinación de linajes de *Ostreobium*

Para determinar los posibles linajes de *Ostreobium* presentes en las librerías analizadas, se realizó un análisis filogenético con las secuencias de ASVs filtradas en el proceso mencionado anteriormente y se adicionaron 30 secuencias de referencia para considerar la filogenia definida por del Campo *et al.* (2016). Se consideró a la macroalga *Caulerpa racemosa* (Bryopsidales: Caulerpaceae) como grupo externo.

J. Generación de mapas de distribución de clados

Se generó un mapa actualizado de la distribución de linajes de *Ostreobium* utilizando QGIS-LTRv3.16.10-Hannover (QGIS.org, 2022). Se utilizó el plug-in QuickMapServices (NextGIS, 2022) para el mapa base. Se generó una lista con los clados resueltos de la filogenia conocida y sus puntos geográficos correspondientes, información obtenida de la información suplementaria de del Campo *et al.*, (2017); adicionando los puntos de las muestras utilizadas en el presente trabajo y su designación filogenética correspondiente.

K. Análisis de composición de ASVs por tipo de librería y muestra

Se realizó un análisis exploratorio inicial para analizar la composición de ASVs por tipo de librería y por tipo de muestra. Para esto, se tomaron en cuenta los ASVs filtrados según los parámetros de QIIME2 y los agrupamientos filogenéticos descritos anteriormente. Se llevó un control de cuantificación de lecturas desde las librerías pre-mapeadas, utilizando el comando `zcat _ | echo $((`wc -l`/4))`. Asimismo, se tabularon los datos resultantes del proceso de control de calidad en QIIME2. El análisis de diversidad alfa se llevó a cabo en R v4.0.3, por medio de los paquetes phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), vegan (Oksanen *et al.*, 2020) y ggplot2 (Wickham, 2009). Se estimaron los parámetros riqueza observada, Chao1, Shannon, InvSimpson. Los datos se sometieron a la prueba Shapiro-Wilk para comprobar su normalidad ($p > 0.05$), dependiendo del valor p, se realizaron los análisis de significancia correspondientes (Wilcoxon y T de Student).

Adicionalmente, realizaron gráficos de barra y de dona en Microsoft Excel para visualizar la proporción de ASVs según la clasificación taxonómica designada por QIIME2 antes y después del filtrado filogenético.

VII. RESULTADOS

A. Procesamiento de secuencias Amplicon-seq/RNA-seq

Las librerías Amplicon-seq contaron con un promedio de 741,558 lecturas, a partir de las cuales se recuperaron 165,259 lecturas (22.3%) por muestra tras el mapeo en Bowtie2. Las librerías RNA-seq contaron en promedio con 29,627,341 lecturas por muestra, a partir de las cuales se mapearon en promedio 28,943 lecturas (0.098%). Las librerías 561 y 552 presentaron el conteo de lecturas mapeadas más bajo, teniendo 2,403 y 2,750, respectivamente (Cuadro 1A).

Las lecturas de las librerías Amplicon-seq contaron con fragmentos de longitud promedio de 253 nt (nucleótidos), longitud mínima de 251 nt y máxima 320 nt. Tomando en cuenta el control de calidad de las lecturas de Amplicon-seq, se conservó entre el 73.64% hasta el 92.95% de secuencias combinadas (Figura 2C-D, Cuadro 2A).

Las lecturas de las librerías RNA-seq estaban conformadas por fragmentos de longitud promedio de 187 nt, longitud mínima de 80 nt y máxima de 288 nt. Asimismo, representaron mayor pérdida durante el proceso de control de calidad, conservando entre el 22.15% al 59.73% de lecturas combinadas (Cuadro 3A)

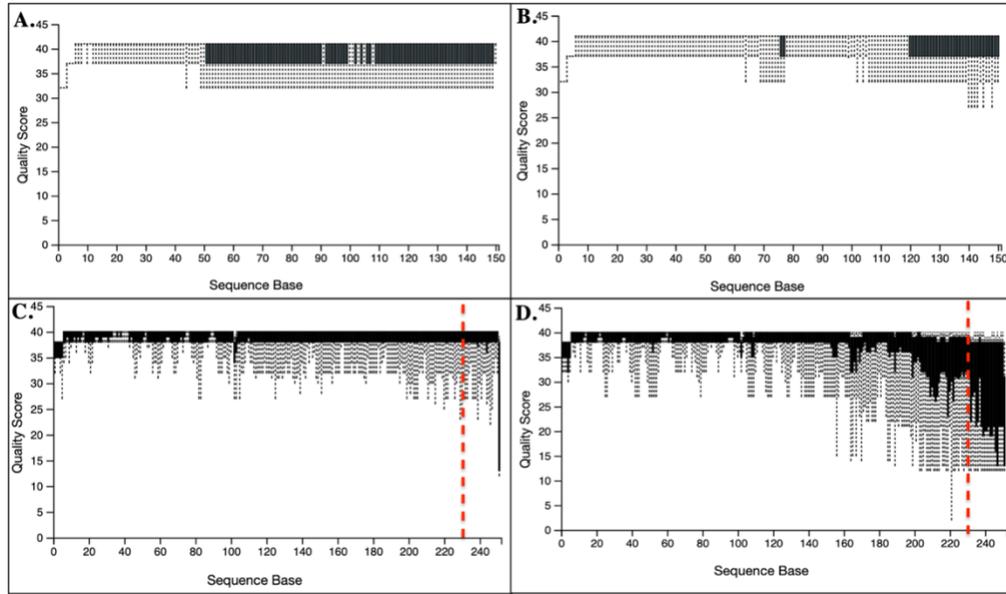


Figura 2. Perfiles de calidad de secuencias por tipo de librería. RNA-seq: A y B corresponden a secuencias forward y reverse, respectivamente. Amplicon-seq: C y D corresponden a secuencias forward y reverse, respectivamente. La línea punteada roja señala la posición en donde se truncaron las secuencias de las librerías Amplicon-seq

B. Filtración taxonómica en QIIME

A partir de la combinación de set de datos de RNA-seq y Amplicon-seq, se realizaron conteos de ASVs obtenidos a partir de la clasificación taxonómica con la base de datos SILVA. Tras el filtrado taxonómico realizado, en el cual se incluyeron los ASVs clasificados bajo Eukaryota y Cloroplasto, el set de datos contó inicialmente con 10,231 ASVs únicos distribuidos en todas las librerías. Seguidamente, se excluyeron específicamente los filos Cnidaria, Porífera, Artrópoda, Dinoflagellata, Ascomycota, Basidiomycota, Phragmoplastophyta, Ciliophora, Cercozoa y Retaria. El conteo filtrado fue de 1,815 ASVs únicos.

En términos de frecuencia de ASVs por librería, en promedio las de RNA-seq presentaron 15,670 ASVs y las de Amplicon-seq 137,637. El conteo de ASVs únicos seguido el filtrado mencionado resultó en promedio 4,172 para las librerías de RNA-seq y 61,675 para las librerías Amplicon-seq (Cuadro 4A).

En la Figura 3. se puede observar un gráfico representando la composición taxonómica de cada set de datos tras el flujo de trabajo de QIIME2. El set de datos de Amplicon-seq recuperó 124 ASVs, a partir del cual el 69.6% corresponde a la clasificación de Cloroplasto y 16.8% a *Ostreobium* sp. y *Ostreobium quekettii*. Las librerías de RNA-seq recuperaron 1,691 ASVs. En dicho set de datos, la clasificación taxonómica predominante corresponde a Eukaryota (70.3%), seguido por Cloroplasto (16.7%) y *Ostreobium* sp./*Ostreobium quekettii* (14.3%).

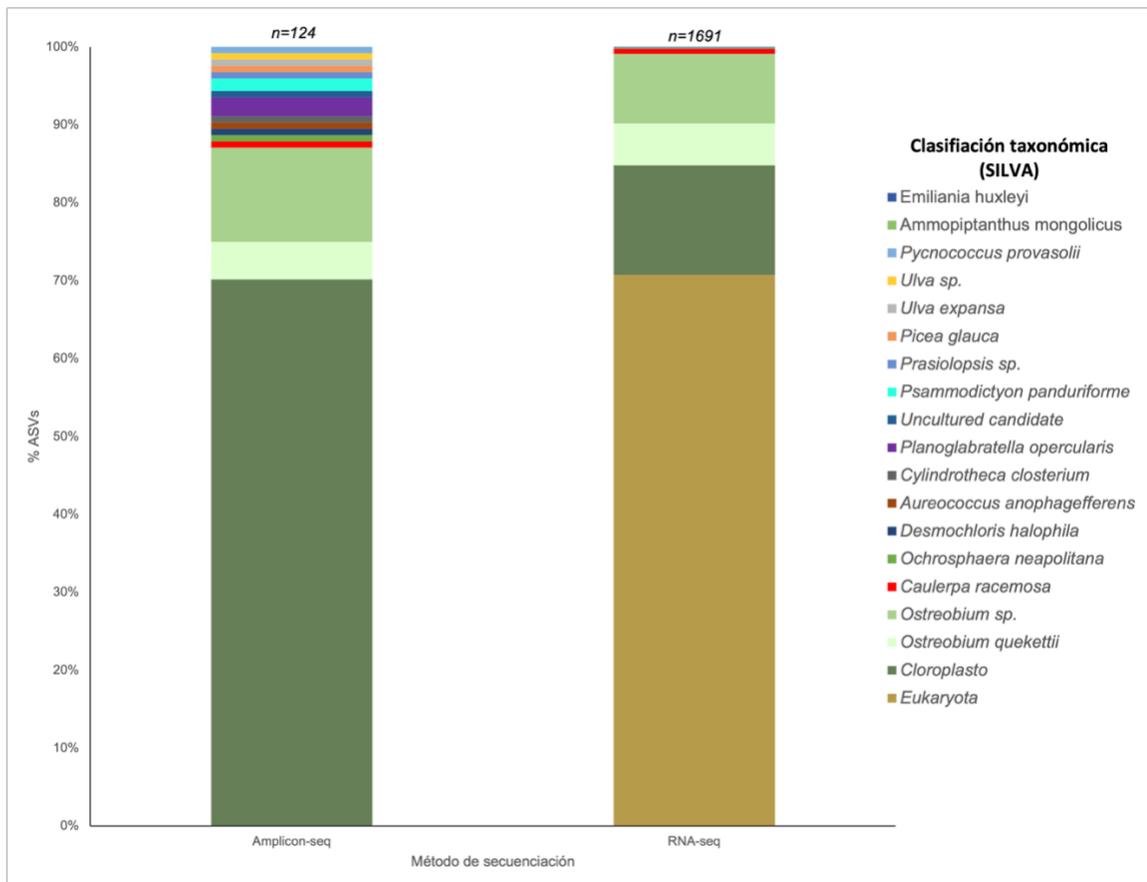


Figura 2. Composición taxonómica de ASVs designada por base de datos SILVA tras filtrado inicial en QIIME.

C. Filtración filogenética

Considerando la representación de ASVs clasificadas como Eukaryota y Cloroplasto, se evaluó el agrupamiento filogenético de las secuencias obtenidas para descartar las más distantes a las que se clasificaron como *Ostreobium* sp. y corroboradas en búsquedas blast. En el primer proceso de filtrado, se descartaron 61 secuencias clasificadas originalmente como Eukaryota. En este caso se realizó un escaneo general, tomando en cuenta los ASVs que se agruparon en los clados más lejanos respecto a los ASVs clasificados como *Ostreobium* (Figura 4A). Las búsquedas de Blast verificaron que las secuencias excluidas presentaron mayor similitud con organismos pertenecientes a Cnidaria, Porifera, Amoebozoa, Basidiomycetes y Bacteria, con porcentajes de identidad >90-100%.

Partiendo del primer set filtrado (1,739 secuencias, Fig. 6B), el agrupamiento filogenético para la segunda fase de filtrado permitió descartar 54 secuencias clasificadas inicialmente como Eukaryota. En este caso, se observó la formación de un clado definido al inicio del árbol. Las secuencias seleccionadas para descarte fueron sometidas a búsquedas en blast y coincidieron con organismos pertenecientes al filo Bacteria, en su mayoría no cultivadas.

El segundo set filtrado (1,686 secuencias, Fig. 6C) demostró una resolución filogenética con clados más definidos. Se descartó un total de 883 secuencias, de las cuales 546 fueron clasificadas originalmente como Eukaryota y 337 como Cloroplasto. Las búsquedas en blast revelaron que pertenecían a bacterias no cultivadas, Ulvophyceae, Amoebozoa, Cnidaria y algunos géneros específicos de bacteria, tales como: *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Caulobacter*, *Leuconostoc*; entre otros. Finalmente, se realizó un análisis filogenético con el último set de datos filtrado, que corresponde a 799 secuencias (Figura 4D).

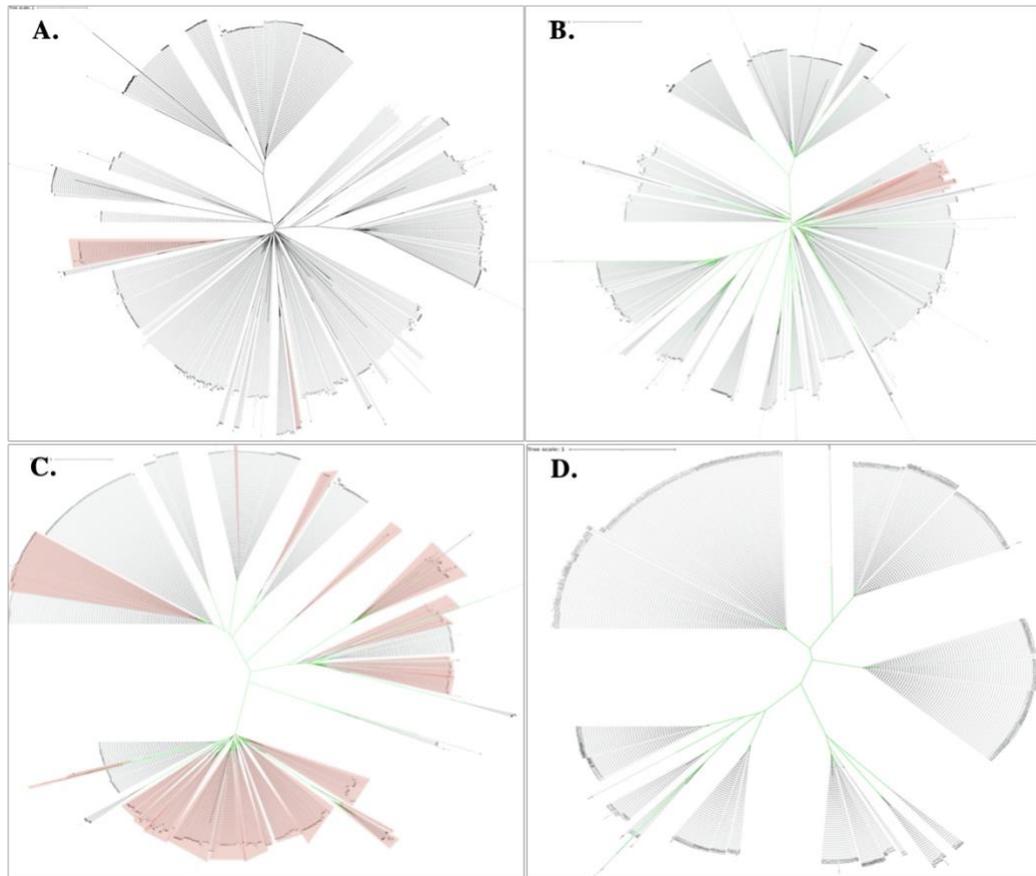


Figura 3. Representación visual del filtrado según agrupamiento filogenético A: 1,800 secuencias, B: 1,739, C: 1,686, D: 799 secuencias

Las librerías Amplicon-seq demostraron mayor abundancia por ASV, pero menor cantidad de ASVs en general, teniendo una presencia total de 21 ASVs con un rango de abundancia total entre 15 a 555,710 conteos (Cuadro 6A). Las librerías de RNA-seq revelaron mayor presencia de ASVs distribuidas en cada muestra, teniendo un total de 778 ASVs con rango de abundancia desde 1 a 2,072. Se detectaron dos ASVs compartidas entre las librerías Amplicon-seq/RNA-seq (ASV 486 y ASV 855).

Los datos de RNA-seq demostraron mayor riqueza absoluta por librería, contando con un máximo de 254 ASVs únicos en la muestra 557. Las librerías de Amplicon-seq rondaron entre 2 a 7 ASVs únicos por librería (Cuadro 5A). Se observaron diferencias significativas

considerando la cantidad de ASVs observados por muestra y el índice de Shannon entre los métodos de secuenciación (Amplicon-seq/RNA-seq) (Wilcoxon: $p < 0.05$) (Figura 5).

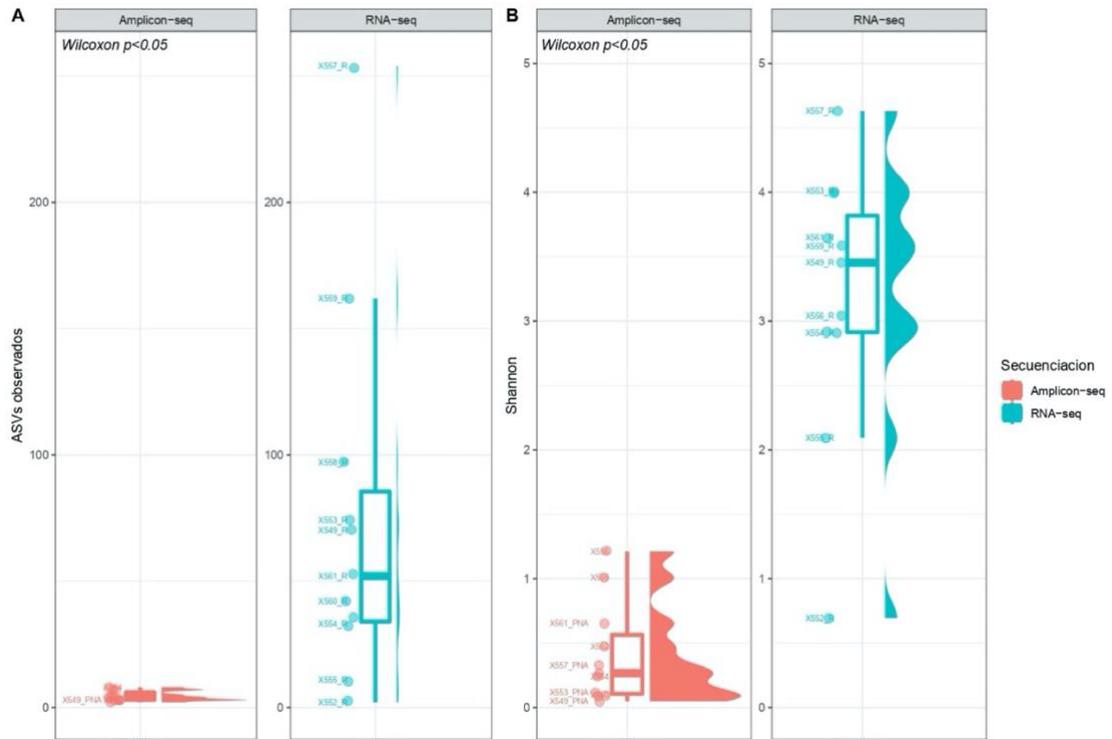


Figura 4. Índices de diversidad alfa (A: Riqueza observada, B: Shannon) de los ASVs obtenidos según según su método de secuenciación. Se incluyen sus respectivos valores de significancia y La distribución de los datos se visualiza al lado derecho de cada gráfico de caja, representando la estructura de los datos crudos utilizados para el análisis.

Consistentemente, los índices de diversidad obtenidos de las librerías RNA-seq con mayores -numéricamente- en general a los obtenidos de las librerías Amplicon-seq. No obstante, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras más cercanas a las ventilas hidrotermales y las muestras control, independientemente del método de secuenciación (Figura 6).

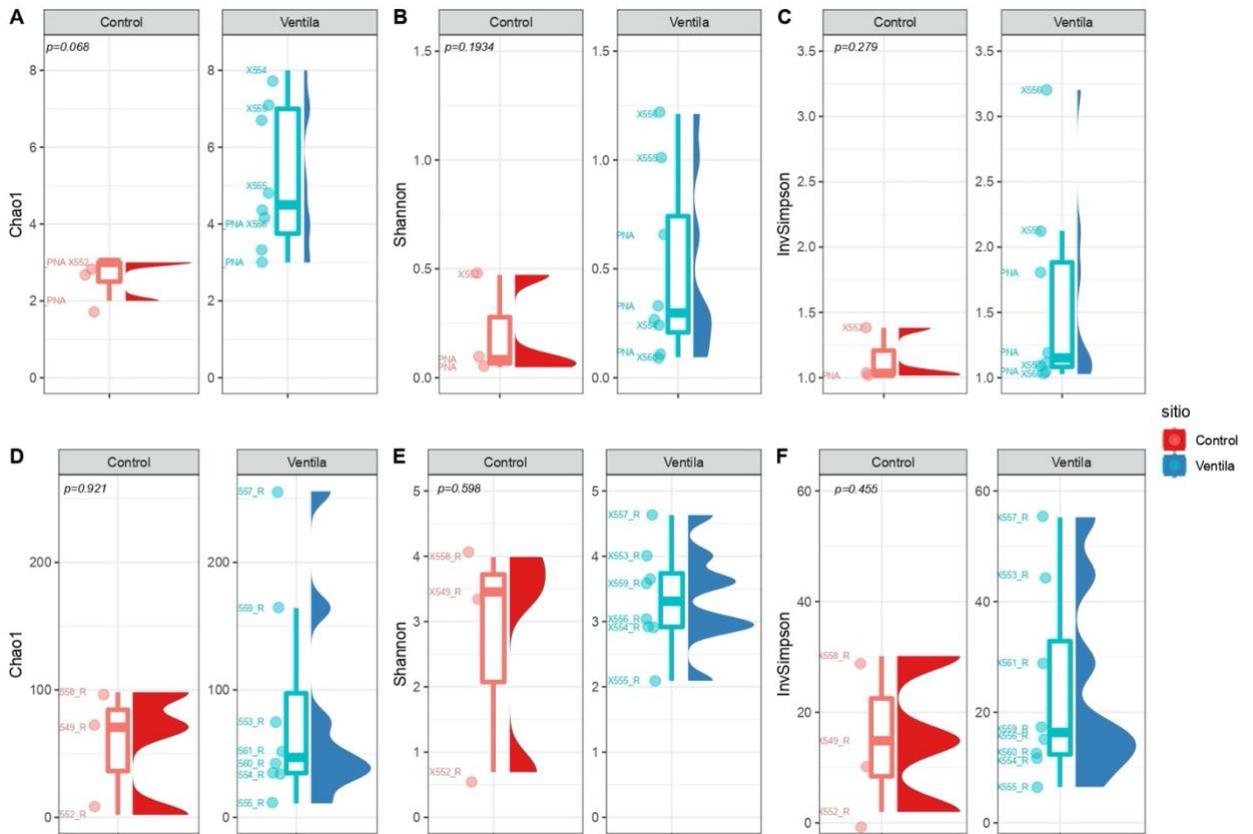


Figura 6. Índices de diversidad alfa (Chao1, InvSimpson y Shannon) de ASVs recuperadas correspondientes a *Ostreobium* sp. según tratamiento (control/ventila) con sus respectivos valores p ($p < 0.05$ para significancia). Los gráficos A-C corresponden a los ASVs obtenidos a partir de las librerías Amplicon-seq y D-F a las librerías RNA-seq. La distribución de los datos se visualiza al lado derecho de cada gráfico de caja, representando la estructura de los datos crudos utilizados para el análisis.

En la Figura 7 se puede observar la diferencia de información recuperada de ambos tipos de librerías. Todas las librerías de Amplicon-seq poseen menos ASVs pero las presentes cuentan con más abundancia (Cuadro 6A). En el caso de las librerías de RNA-seq, se observa mayor cantidad de ASVs en menor abundancia distribuidas en todas las librerías.

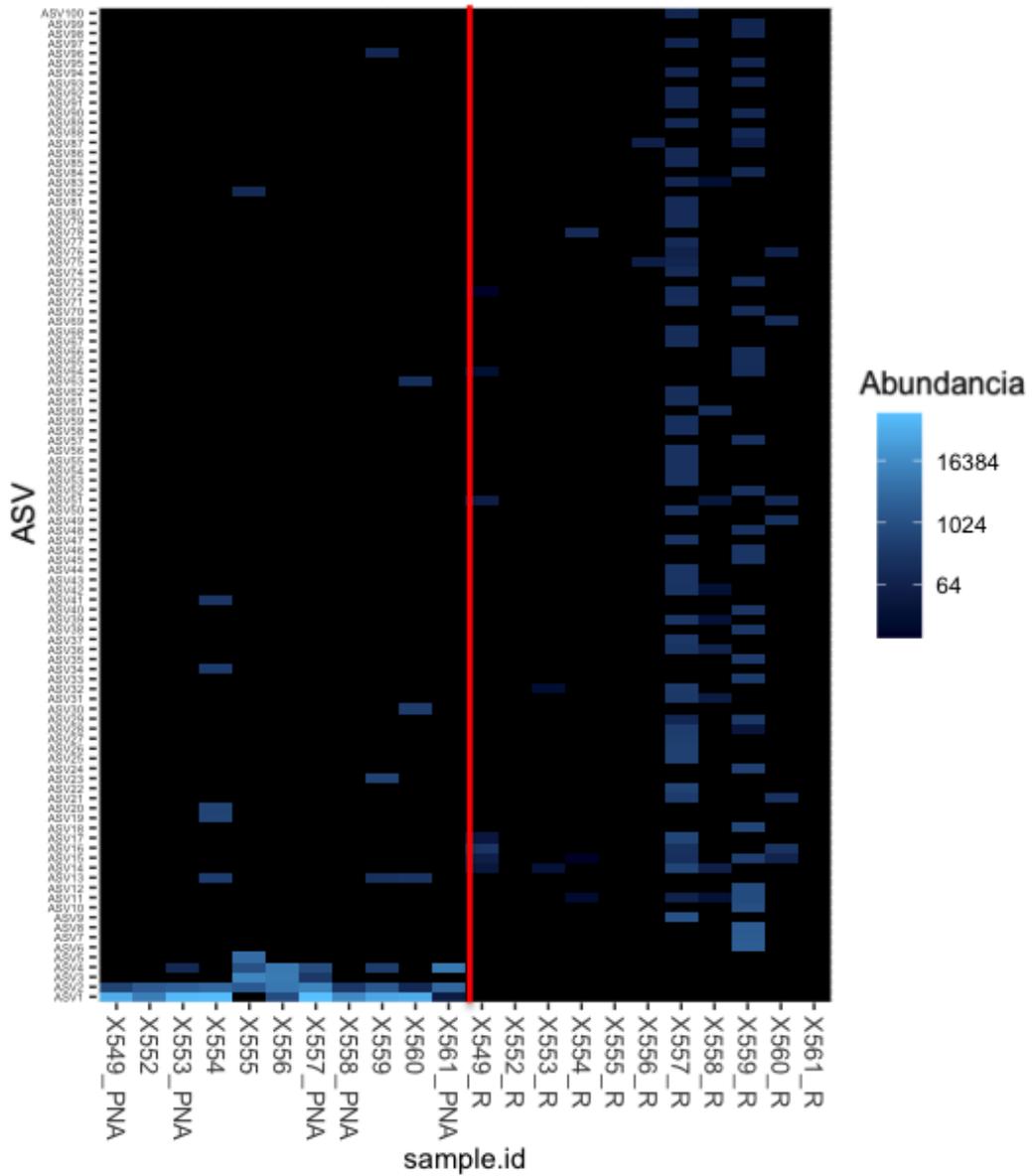


Figura 5. Heatmap para la representación visual de las 100 ASVs más abundantes en las librerías analizadas. La línea roja divide las librerías de Amplicon-seq (izquierda) y RNA-seq (derecha)

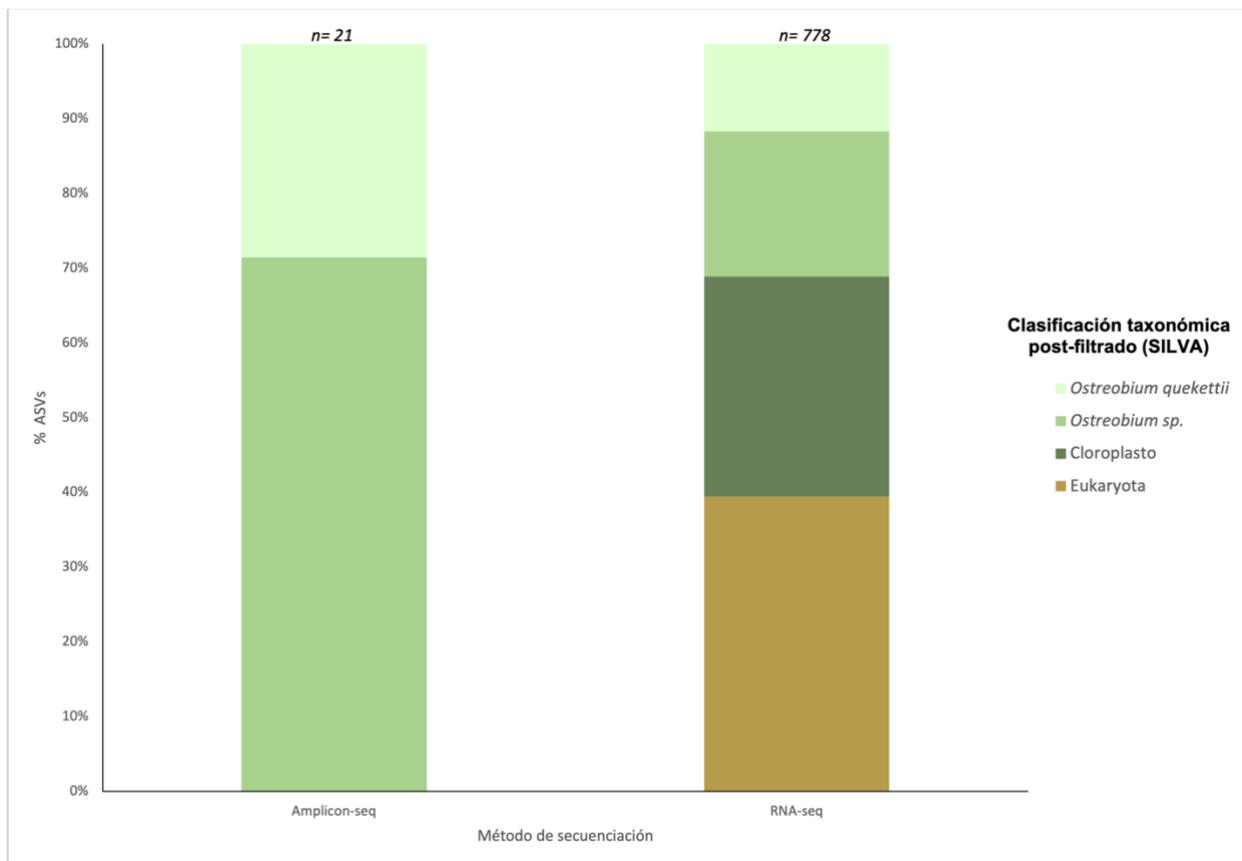


Figura 6. Clasificación designada por la base de datos de SILVA para los ASVs presentes en las librerías RNA-seq (A), y Amplicon-seq (B)

En la Figura 8. se puede observar la composición de ASVs clasificadas bajo las categorías designadas por la base de datos SILVA. Dicha información se obtuvo a partir de los respectivos procesos de filtración en QIIME y por análisis filogenéticos. Las librerías de RNA-seq presentaron el 69% de ASVs bajo clasificaciones generales/ambiguas, siendo estas Eukaryota y Cloroplasto. Muchas de estas secuencias podrían corresponder a *Ostreobium*, sin embargo, debido a su falta de representación en bases de datos públicas, se optó por conservarlas y corroborar su identidad en análisis posteriores (filogenético y BLAST). Los ASVs clasificados como *Ostreobium* conformaron un 41% según la base de datos de SILVA. En el caso de las librerías de Amplicon-seq, las ASVs filtradas correspondieron a clasificaciones designadas como *Ostreobium* sp. y *O. quekettii*.

D. Análisis filogenético

El mejor modelo de sustitución seleccionado según el modelo BIC fue: HKY+F+G4. En la Figura 9 se observa la resolución filogenética basada en un análisis de máxima verosimilitud con 1000 iteraciones. Las franjas resaltadas representan el agrupamiento de las secuencias de referencia con su clasificación taxonómica correspondiente. En la Figura 9, se observa el mismo análisis filogenético, pero con los clados más distintivos colapsados. En general, 142 ASVs se agruparon al clado OST2 y 71 al clado OST1. No se generó agrupamiento de ningún ASV al clado OST3. Es importante resaltar los 5 agrupamientos generados cercanos a OST2. Dichos clados se separan de OST2 con 100% iteraciones de soporte y presentan soportes internos entre 92-100%

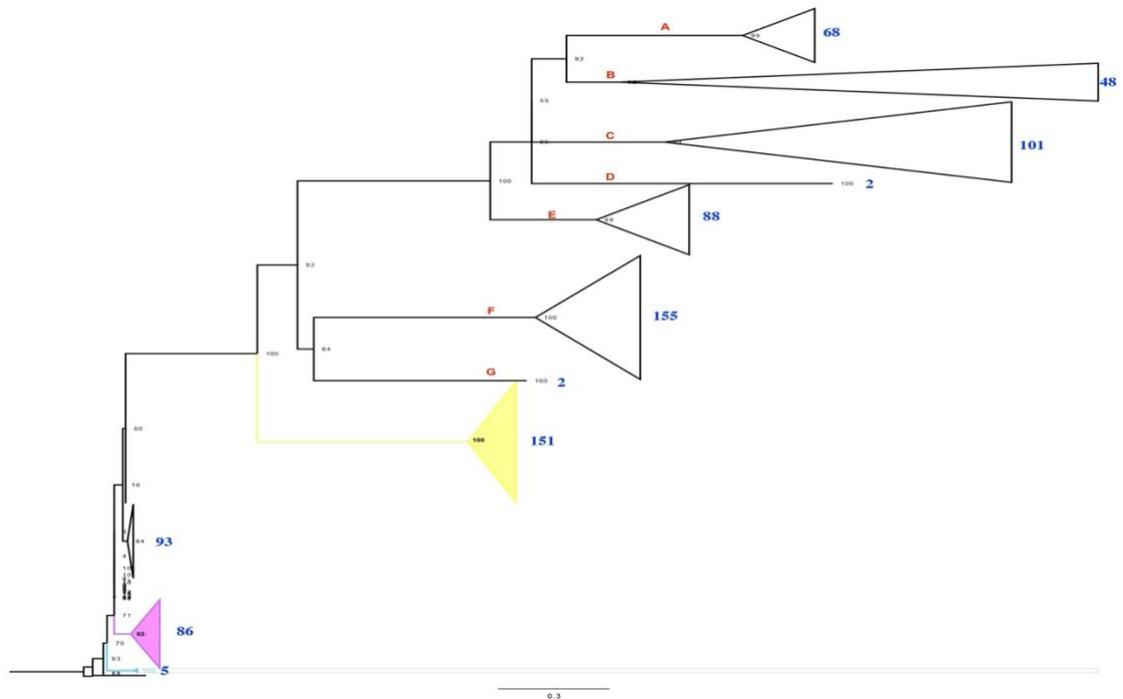


Figura 7. Análisis de máxima verosimilitud (1000 iteraciones) con ASVs filtrados ($n=800$) y secuencias de referencia de GenBank ($n=30$) y *Caulerpa racemosa* como grupo externo. El soporte se encuentra en los nodos de cada clado. Los clados más distintivos se agruparon y el número de coloración azul frente a cada clado representa la cantidad de secuencias agrupadas y la letra en color rojo en cada rama indica el clado. Los clados coloreados presentan las secuencias de referencia y se diferenciaron según del Campo *et al.* (2016). Amarillo: OST2, rosa: OST1, celeste: OST3

En el Cuadro 3. se presentan ejemplos de ASVs clasificados en clados específicos según la resolución filogenética dada. En general, los ASVs obtenidos de las librerías Amplicon-seq se agruparon estrictamente en el clado 2. Los ASVs obtenidos de las librerías RNA-seq se distribuyen en todos los clados salvo el 3. Los cinco ASVs más abundantes se agruparon en el clado 2, así como los ASVs compartidos entre librerías. Los siguiente cinco ASVs más abundantes se agruparon en los nuevos clados E, C y D.

Cuadro 3. Clasificación filogenética de ASVs más abundantes.

ASV	Método	Clado
ASV_1464	Amplicon-seq	2
ASV_167	Amplicon-seq	2
ASV_70	Amplicon-seq	2
ASV_226	Amplicon-seq	2
ASV_1800	Amplicon-seq	2
ASV_1016	RNA-seq	*E
ASV_274	RNA-seq	*C
ASV_462	RNA-seq	*C
ASV_1370	RNA-seq	*E
ASV_1400	RNA-seq	*D
ASV_486	Amplicon-seq/RNA-seq	2
ASV_855	Amplicon-seq/RNA-seq	2
ASV_202	RNA-seq	1
ASV_1060	RNA-seq	1

*Nota: Los clados nombrados con letras corresponden a las nuevas agrupaciones filogenéticas observadas en el presente trabajo

En la Figura 10. se observa la distribución actualizada de los clados conocidos de *Ostreobium*, basado en análisis filogenéticos del gen 16S. Se denota la ampliación de distribución de los clados 1 y 2 al Pacífico Oriental, así como la presencia de nuevos linajes genotípicos respecto a la diversidad conocida previamente.



Mapa elaborado por: María Fernanda Acevedo

Figura 8. Distribución geográfica actualizada de la filogenia resuelta para el gen 16S de *Ostreobium*.

VIII. DISCUSIÓN

A. Composición de librerías Amplicon-seq/Rna-seq

Se observaron diferencias distintivas en la composición de lecturas de cada librería dependiendo del método de secuenciación. Inicialmente, las librerías de RNA-seq contaron con más lecturas (29,627,341) en comparación con las de Amplicon-seq (741,558). Sin embargo, al someter cada una al proceso de alineamiento en Bowtie2, se mapeó el 22.3% de lecturas de Amplicon-seq y el 0.098% de lecturas de RNA-seq. El set de datos procesados en QIIME recuperó mayor cantidad de ASVs de las librerías de RNA-seq (Figura 3). Sin embargo, las librerías Amplicon-seq fueron más informativas en términos de abundancia por cada ASV (Figura 7).

Estas diferencias se podrían atribuir principalmente a las características inherentes de cada método de secuenciación, principalmente a la profundidad y cobertura. En términos generales, RNA-seq es una herramienta poderosa en términos de cantidad de información recuperada, ya que abarca el transcriptoma completo. Sin embargo, la proporción de lecturas correspondientes a una identidad determinada puede ser variable, ya que son lecturas de lo que se estaba expresando en dicho transcriptoma. En este caso, se trata de lecturas que corresponden al hospedero (*Porites panamensis*) y a la complejidad de organismos presentes en su microbioma.

En contraste, Amplicon-seq es un método dirigido. En este estudio específicamente para la región V4 16S rADN (Reigel *et al.*, 2021), lo cual implica que existe una delimitación a partir de la reacción de polimerasa (PCR) para la amplificación de dicha región. A pesar de que los cebadores que amplifican para el gen 16S se han comprobado funcionales para detectar algas verdes (Marcelino & Verbruggen, 2016).

Asimismo, los cebadores implementados para la generación del set de datos analizado se especializan más en la amplificación de ADN de origen bacteriano (Fischer *et al.*, 2016). A pesar de que se han comprobado funcionales para recuperar secuencias correspondientes a algas verdes (Marcelino & Verbruggen, 2016), estudios han recuperado organismos fotosintéticos en proporciones relativamente bajas en comparación con organismos heterótrofos (Eiler *et al.*, 2013).

En cuanto a las diferencias en términos de abundancia, es importante considerar la variación de cantidad de copias del gen 16S por organismo. En estudios de composición de comunidades bacterianas, se cree que puede ser un factor de sesgo puesto a que se desconoce la variación y el número de copias presentes en diferentes taxones, implicando distorsiones en las estimaciones de abundancia relativa (Farrelly *et al.*, 1995; Větrovský & Baldrian, 2013). En el caso de *Ostreobium*, se hipotetiza que los niveles de abundancia podrían estar sesgados puesto a que cuenta con múltiples cloroplastos por individuo (A. M. Reigel *et al.*, 2021; Verbruggen & Tribollet, 2011). Por otro lado, los bajos niveles de abundancia observados en los ASVs detectados por RNA-seq no necesariamente reflejan la abundancia real de dichas lecturas, ya que los conteos obtenidos dependen de los niveles de expresión genética del organismo (Schneider *et al.*, 2021).

B. Clasificación taxonómica por base de datos SILVA

Para cumplir con los objetivos establecidos, se buscaba recuperar la mayor cantidad posible de ASVs correspondientes a *Ostreobium* de ambos tipos de librería (Amplicon-seq/RNA-seq). En este caso, debido a que se trabajó con una base de datos cuyo uso es principalmente para describir procariotas (Cole *et al.*, 2014; DeSantis *et al.*, 2006), fue esperado obtener varios ASVs con clasificación ambigua (e.g. Eukaryota/Cloroplasto) o errónea para la clasificación de *Ostreobium*.

La composición taxonómica designada por la base de datos SILVA difirió entre librerías principalmente por la presencia y prevalencia de ASVs clasificadas como Cloroplasto y Eukaryota. La clasificación predominante en las librerías RNA-seq corresponde a Eukaryota y para Amplicon-seq a Cloroplasto (Figura 8). Durante el proceso de filtrado, se

confirmó que los ASVs con clasificación específica a género/especie correspondiente a *Ostreobium* sp./*Ostreobium quekettii*, se encontraban erróneamente clasificados como Cloroplasto a partir del nivel taxonómico orden y bajo el dominio Bacteria y filo Cyanobacteria (e.g. d__Bacteria; p__Cyanobacteria; c__Cyanobacteriia; o__Chloroplast; f__Chloroplast; g__Chloroplast; s__*Ostreobium*_sp.).

La base de datos SILVA es una herramienta ampliamente usada en estudios de microbioma. Dicha base de datos contiene información taxonómica correspondiente a los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya. Esta cuenta con curación constante y en actualización manual, por medio de relaciones filogenéticas (Quast *et al.*, 2013). Sin embargo, se han llevado a cabo estudios que comprueban errores en la clasificación taxonómica en bases de datos ampliamente utilizadas que sugieren conclusiones potencialmente erróneas en estudios precedentes a dichos hallazgos (Edgar, 2018; Lydon & Lipp, 2018).

A pesar de los criterios de filtración aplicados en QIIME, el set de datos filtrado presentó ASVs con clasificaciones taxonómicas correspondientes a algas verdes (e.g. *Ulva* sp. *Prasiolopsis* sp. *Caulerpa* sp.), foraminíferos (*Planoglabratella opercularis*), diatomea (*Cylindrotheca closterium*); entre otros. Posteriormente, búsquedas blast detectaron inconsistencias taxonómicas bajo las clasificaciones ambiguas que se conservaron en el set de datos (Eukaryota y Cloroplasto). Esto se debe a que alrededor del 72% de las secuencias únicas presentes en la base de datos SILVA corresponde a organismos no-cultivados, no identificados, y no conocidos (uncultured, unidentified, unknown) (Ii *et al.*, 2021).

Esto abre varias interrogantes en términos de el efecto que puede llegar a tener la clasificación taxonómica designada por bases de datos públicas ampliamente utilizadas en estudios ecológicos y clínicos. Es indiscutible que las bases de datos de libre acceso, así como los procesos bioinformáticos para la clasificación taxonómica de organismos han contribuido de manera beneficiosa a la comunidad científica (Glöckner *et al.*, 2017; Malla *et al.*, 2018). Sin embargo, se debe cuestionar críticamente el tipo de base de datos a

implementar según los datos a analizar y los objetivos propuestos (Balvočiūtė & Huson, 2017).

La poca representación y especificidad de resolución taxonómica de determinados organismos en bases de datos ampliamente utilizadas contribuye a pasar por alto organismos con funciones importantes, como *Ostreobium*, que potencialmente podrían revelar información relevante sobre dinámicas ecológicas que actualmente son interrogantes (Bik, 2021; Pernice *et al.*, 2020). Esto sugiere que existe una cantidad considerable de diversidad críptica que está pendiente de resolver. Asimismo, se recalca la importancia de bases de datos curadas para el estudio de grupos específicos, como es el caso de *Ostreobium*.

C. Análisis de diversidad y comparación de métodos

Tras los procesos de filtración de ASVs correspondientes, se comprobó mayor presencia de diferentes ASVs pertenecientes a *Ostreobium* en las librerías de RNA-seq. En el Cuadro 6A se observa que la riqueza observada entre librerías fue contrastante, pues las librerías de Amplicon-seq contaron con 2-7 ASVs únicos por muestra. Las librerías RNA-seq rondaron desde 2 hasta 254 ASVs únicos por muestra. Es importante resaltar que las librerías 552 con menor conteo de lecturas tras el proceso de calidad en QIIME2 es congruente con el bajo número de ASVs observadas (2) en contraste con el resto de las librerías de RNA-seq.

El análisis de diversidad alfa confirmó que el método de RNA-seq recuperó significativamente (Chao1, Wilcoxon: $p=0.0011$) mayor riqueza absoluta que el método Amplicon-seq (Figura 5). Sin embargo, al considerar los tratamientos como variable, no se observaron diferencias significativas en términos de riqueza, independientemente del método de secuenciación implementado (Figura 6). A pesar de la diferencia significativa en la cantidad de información que se extrae a partir de cada método, en el caso de este estudio, ambos nos permitieron llegar a las mismas conclusiones.

Lo anterior podría indicar que las condiciones a las que estuvieron expuestas las colonias no representan un factor determinante en la diversidad y composición de ASVs relacionadas a *Ostreobium*. Sin embargo, se debe considerar que la región analizada (16S) suele subestimar la diversidad de algas eucariotas, por lo que análisis con los marcadores UPA, *tufA* y *rbcL* podrían permitir discernir a mayor detalle los cambios en composición de ASVs relacionados a *Ostreobium* sp (Marcelino & Verbruggen, 2016).

Estudios han descubierto que las comunidades endolíticas en general no presentan cambios significativos ante cambios de pH en entornos naturales (Marcelino *et al.*, 2017; Meron *et al.*, 2012). Además, se han documentado fenómenos de resiliencia en cuanto a algas endolíticas expuestas a niveles de pH bajos. Se resalta que la biomasa de estas algas aumenta notablemente bajo condiciones de alto pCO₂, lo cual sugiere que son comunidades que de hecho se benefician en condiciones ácidas (I. C. Enochs *et al.*, 2016).

Asimismo, también se ha hipotetizado que es posible la existencia de un mecanismo especializado a nivel genómico que confiera altos niveles de tolerancia a condiciones drásticas de acidificación (Marcelino *et al.*, 2017). Se ha detectado una amplia gama de genes de respuesta a estresores expresados en el genoma de *Ostreobium* (Iha *et al.*, 2021).

D. Análisis filogenético

El resultado del análisis filogenético implementado por medio del método de máxima verosimilitud con el gen 16S sugiere 7 clados adicionales a los 3 clados previamente conocidos (Figura 9). Dichos clados presentaron soporte >92%. Se detectó la presencia de clados 1 y 2 en las muestras analizadas, siendo este el primer registro para la región (Figura 10). No se observó agrupamiento al clado 3, lo cual tiene congruencia con la literatura ya que los linajes asociados al clado 3 se encuentran ausentes o son muy escasos en corales complejos (del Campo *et al.*, 2017).

Se observó menor prevalencia del clado 1, el cual ha sido reportado como el más común a nivel global. Este clado se ha reportado para *Porites asteroides* y *P. lutea*, pero predomina

en corales de la familia Acroporidae. Asimismo, se considera que a pesar de ser el clado con distribución más amplia, se conoce que es raro en regiones específicas como el Caribe (del Campo *et al.*, 2017). Los resultados sugieren que podría estar ausente en la región del Pacífico Oriental. Sin embargo, es necesario llevar a cabo análisis con más localidades y aumentar la representación de especies hospederas para descartar posibles escenarios de especificidad.

Es importante resaltar que los ASVs obtenidos de las librerías Amplicon-seq se agruparon estrictamente en el clado 2. Los ASVs de RNA-seq, en cambio, se distribuyeron en los clados 1-2 y A-G. Esto sugiere que las librerías de RNA-seq recuperaron mayor diversidad de linajes de *Ostreobium*. Estudios han demostrado que el método RNA-seq es efectivo para evaluar comunidades microbianas asociadas a un hospedero. Esto se ha comprobado analizando datos de transcriptoma obteniendo exitosamente un perfil taxonómico y funcional de la microbiota activa asociada a un hospedero (Chialva *et al.*, 2019; Schneider *et al.*, 2021). Un estudio en particular comprobó datos de meta-transcriptoma tienen mayor sensibilidad para detectar linajes de hongos en comparación con datos de secuenciación de amplicones (16S/ITS, específicamente) (Cottier *et al.*, 2018). Otro estudio realizó un análisis comparativo entre RNA-seq y técnicas de Amplicon-seq, a partir del cual concluyó que recuperó más filotipos de bacterias y arqueas en la microbiota de rumen (Li *et al.*, 2016). Esto sugiere que las técnicas de secuenciación alternativas representan una ventaja para identificar organismos difíciles de aislar y amplificar.

La resolución filogenética del presente trabajo es particularmente interesante puesto que los hospederos (*Porites panamensis*) se encontraban expuestos a un ambiente hidrotermal. *Ostreobium* representa en los corales un rol cuestionable para muchos, sin embargo, se han observado patrones de adaptabilidad a condiciones poco convencionales para un alga verde (e.g. poca luz, aguas profundas, acidez) (Gonzalez-Zapata *et al.*, 2018; Gutner-Hoch & Fine, 2011). Se ha sugerido que *Ostreobium* puede llegar a satisfacer las necesidades nutricionales a sus hospederos durante eventos de blanqueamiento (Ricci *et al.*, 2019). La historia filogenética de *Ostreobium* ha estado en constante actualización, inicialmente se

creía que pertenecía a una sola especie cosmopolita. Sin embargo, estudios han reportado que es un grupo que alberga altos niveles de diversidad, los cuales pueden variar dependiendo del hospedero y gradientes de profundidad (Gutner-Hoch & Fine, 2011; Marcelino & Verbruggen, 2016).

IX. CONCLUSIONES

El análisis filogenético del gen 16S rDNA reveló 7 clados potencialmente nuevos respecto a la filogenia conocida de *Ostreobium*. Considerando dicha filogenia, se comprobó la presencia de linajes pertenecientes a los clados 1 y 2 en las muestras evaluadas, expandiendo así la distribución del género al Pacífico Oriental Tropical.

Por otra parte, se detectaron diferencias sustanciales durante el procesamiento de las librerías obtenidas por los métodos RNA-seq y Amplicon-seq. Las librerías Amplicon-seq presentaron en general más lecturas por muestra que las de RNA-seq, las cuales en un inicio predominaron en conteo de lecturas, pero solo se conservó un porcentaje tras los procesos de mapeo y denoising. No obstante, las librerías de RNA-seq contaron con una mayor cantidad de ASVs por librería, con tanto con 778 después los filtrados correspondientes, en contraste con las 21 ASVs presentes en las librerías Amplicon-seq.

La diferencia entre riqueza según método de secuenciación fue significativa, siendo las librerías de RNA-seq aparentemente más informativas en términos de diversidad. Asimismo, se pudo comprobar la comparabilidad de ambos métodos. Considerando los índices de diversidad analizados independientemente del método se llegaron a las mismas conclusiones: no se observaron diferencias significativas entre las muestras control y las muestras expuestas a condiciones hidrotermales.

Además, las ASVs presentes en las librerías Amplicon-seq se encontraron estrictamente en dichas librerías, salvo por 2 ASVs que se detectaron presentes tanto en las muestras de RNA-seq como las de Amplicon-seq. Se observó que el método Amplicon-seq permite recuperar la diversidad de ASVs predominantes en las muestras analizadas, mientras que el método RNA-seq brinda más información respecto a linajes diferentes

Lo anterior se ha observado en estudios para otros taxones, comprobando que el método RNA-seq es capaz de recuperar lecturas con mayor sensibilidad, a pesar de que su identificación taxonómica represente sus limitaciones debido a la falta de representación de determinados taxones en bases de datos públicas.

La identidad filogenética de los 5 ASVs más abundantes, los cuales pertenecen a las librerías Amplicon-seq pertenecieron al clado 2. Los siguiente 5 ASVs más abundantes, correspondientes a las librerías RNA-seq se agruparon filogenéticamente a diferentes clados de los conocidos actualmente (D, C y E). Las 2 ASVs compartidas entre ambos tipos de librerías, cuya identidad filogenética de estas corresponde al clado 2. En general, se observó menor prevalencia de ASVs pertenecientes al clado 1.

Uno de los aspectos a resaltar es que a pesar de la utilidad y facilidad de implementación de la base de datos SILVA en flujos de trabajo bioinformáticos ampliamente aplicados, esta no es la óptima para evaluar organismos no bacterianos. Debido a la naturaleza del flujo de trabajo, se tuvieron que conservar clasificaciones taxonómicas inespecíficas para recuperar la mayor cantidad de ASVs correspondientes a *Ostreobium*. Esto confirma que aún existen limitaciones para el estudio de esta alga. Sin embargo, apoya las evidencias acerca la subestimación de su diversidad y abre una amplia gama de interrogantes sobre su ecología y dinámica con sus hospederos coralinos, particularmente expuestos a ambientes marginales como las ventilas hidrotermales.

X. RECOMENDACIONES

Se presentaron distintas limitaciones durante el desarrollo del estudio, por lo que se recomiendan las siguientes alternativas para eficientizar los procesos en futuros análisis. Para obtener una mejor resolución filogenética y de diversidad, se recomienda incorporar análisis concatenado con los marcadores *tufA* y *rcbL*. Estos han demostrado recuperar mayor diversidad para el suborden propuesto *Ostreobidinae*, y también se consideran útiles para detectar efectos de variables ambientales. Adicionalmente, implementar una base de datos curada del marcador *tufA* en conjunto con métodos de delimitación de especies, para identificar nuevos linajes de *Ostreobium* con mayor resolución taxonómica y potencialmente detectar cambios en la estructura de sus comunidades en las muestras expuestas a condiciones hidrotermales.

Por otro lado, puesto que ya se comprobó la efectividad de RNA-seq para identificar secuencias de *Ostreobium* sp., se recomienda hacer un análisis comparativo de los tres marcadores principales (16S, *tufA* y *rcbL*) para determinar los diferentes niveles de diversidad que se pueden recuperar a partir de cada uno.

XI. LITERATURA CITADA

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Aiuppa, A., Hall-Spencer, J. M., Milazzo, M., Turco, G., Caliro, S., & Di Napoli, R. (2021). Volcanic CO₂ seep geochemistry and use in understanding ocean acidification. *Biogeochemistry*, *152*(1), 93–115. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00737-9>
- Armstrong, R., Singh, H., Torres, J., Nemeth, R., Can, A., Roman, C., Eustice, R., Riggs, L., & Garcia Moliner, G. (2013). Characterizing the Deep Insular Shelf Coral Reef Habitat of the Hind Bank Marine Conservation District (US Virgin Islands) Using the Seabed Autonomous Underwater Vehicle. *Continental Shelf Research*, *26*, 194–205.
<https://doi.org/10.1016/j.csr.2005.10.004>
- Ayoub, L., Hallock, P., & Coble, P. (2006). *SOLAR IRRADIANCE IN CORAL REEFS: MODELING AND MANAGEMENT TOOLS*.
- Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, *18*(2), 114. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Barshis, D., Ladner, J., Oliver, T., Seneca, F., Traylor-Knowles, N., & Palumbi, S. (2013). Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 110.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1210224110>

Bay, R. A., & Palumbi, S. R. (2014). Multilocus Adaptation Associated with Heat Resistance in Reef-Building Corals. *Current Biology*, 24(24), 2952–2956.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.044>

Benzoni, F., Bianchi, C. N., & Morri, C. (2003). Coral communities of the northwestern Gulf of Aden (Yemen): Variation in framework building related to environmental factors and biotic conditions. *Coral Reefs*, 22(4), 475–484. [https://doi.org/10.1007/s00338-003-0342-](https://doi.org/10.1007/s00338-003-0342-1)

1

Bianchi, C. N., Dando, P. R., & Morri, C. (2011). Increased diversity of sessile epibenthos at subtidal hydrothermal vents: Seven hypotheses based on observations at Milos Island, Aegean Sea. *Advances in Oceanography and Limnology*, 2(1), 1–31.

<https://doi.org/10.1080/19475721.2011.565804>

Bik, H. M. (2021). Just keep it simple? Benchmarking the accuracy of taxonomy assignment software in metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*, 21(7), 2187–2189.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13473>

Björk, M., Mohammed, S. M., Björklund, M., & Semesi, A. (1995). Coralline Algae, Important Coral-Reef Builders Threatened by Pollution. *Ambio*, 24(7/8), 502–505.

<http://www.jstor.org/stable/4314397>

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90.

<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

- Bokulich, N. A., Robeson, M., & Dillon, M. R. (2021). *bokulich-lab/RESCRIPT: 2021.11.0*.
<http://doi.org/10.5281/zenodo.3891931>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bosence, D. W. J. (1983). The Occurrence and Ecology of Recent Rhodoliths—A Review. En T. M. Peryt (Ed.), *Coated Grains* (pp. 225–242). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-68869-0_20
- Brandt, M. E., & McManus, J. W. (2009). Disease incidence is related to bleaching extent in reef-building corals. *Ecology*, *90*(10), 2859–2867. <https://doi.org/10.1890/08-0445.1>
- Brown, B. (1997). Adaptations of Reef Corals to Physical Environmental Stress. *Adv. in Mar. Biol.*, *31*, 221–299. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60224-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60224-2)
- Burke, L. M., Reyntar, K., Spalding, M., & Perry, A. (2011). *Reefs at Risk Revisited*. World Resources Institute.
- Cacciapaglia, C., & van Woesik, R. (2015). Reef-coral refugia in a rapidly changing ocean. *Global Change Biology*, *21*(6), 2272–2282. <https://doi.org/10.1111/gcb.12851>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Calosi, P., Rastrick, S. P. S., Lombardi, C., de Guzman, H. J., Davidson, L., Jahnke, M., Giangrande, A., Hardege, J. D., Schulze, A., Spicer, J. I., & Gambi, M.-C. (2013). Adaptation and acclimatization to ocean acidification in marine ectotherms: An in situ transplant experiment with polychaetes at a shallow CO₂ vent system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1627), 20120444. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0444>
- Camp, E. F., Schoepf, V., Mumby, P. J., Hardtke, L. A., Rodolfo-Metalpa, R., Smith, D. J., & Suggett, D. J. (2018). The Future of Coral Reefs Subject to Rapid Climate Change: Lessons from Natural Extreme Environments. *Frontiers in Marine Science*, 5, 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00004>
- Camp, E., Nitschke, M., Rodolfo-Metalpa, R., Houlbreque, F., Gardner, S., Smith, D., Zampighi, M., & Suggett, D. (2017). Reef-building corals thrive within hot-acidified and deoxygenated waters. *Scientific Reports*, 7, 2434. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02383-y>
- Carilli, J. E., Hartmann, A. C., Heron, S. F., Pandolfi, J. M., Cobb, K., Sayani, H., Dunbar, R., & Sandin, S. A. (2017). Porites coral response to an oceanographic and human impact gradient in the Line Islands. *Limnology and Oceanography*, 62(6), 2850–2863. <https://doi.org/10.1002/lno.10670>
- Carreiro-Silva, M., McClanahan, T., & Kiene, W. (2009). Effects of inorganic nutrients and organic matter on microbial euendolithic community composition and microbioerosion rates. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 1–15. <https://doi.org/10.3354/meps08251>
- Chialva, M., Ghignone, S., Novero, M., Hozzein, W. N., Lanfranco, L., & Bonfante, P. (2019). Tomato RNA-seq Data Mining Reveals the Taxonomic and Functional Diversity of Root-

- Associated Microbiota. *Microorganisms*, 8(1), 38.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010038>
- Chiriboga, A., Edgar, G., & Reyes-Bonilla, H. (2008). *Porites sverdrupi*. IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Cottier, F., Srinivasan, K. G., Yurieva, M., Liao, W., Poidinger, M., Zolezzi, F., & Pavelka, N. (2018). Advantages of meta-total RNA sequencing (MeTRS) over shotgun metagenomics and amplicon-based sequencing in the profiling of complex microbial communities. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0046-x>
- Côté, I. M., & Reynolds, J. D. (Eds.). (2006). *Coral Reef Conservation*. Cambridge University Press.
- Craig, P., Birkeland, C., & Belliveau, S. (2001). High temperatures tolerated by a diverse assemblage of shallow-water corals in American Samoa. *Coral Reefs*, 20, 185–189. <https://doi.org/10.1007/s003380100159>
- Crook, E., Potts, D., Rebolledo-Vieyra, M., & Hernández-Terrones, L. (2011). Calcifying coral abundance near low-pH springs: Implications for future ocean acidification. *Coral Reefs*, 31, 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0839-y>
- Cunning, R., Silverstein, R. N., & Baker, A. C. (2018). Symbiont shuffling linked to differential photochemical dynamics of Symbiodinium in three Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, 37(1), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1640-3>

- Dando, P. R. (2010). Biological Communities at Marine Shallow-Water Vent and Seep Sites. En S. Kiel (Ed.), *The Vent and Seep Biota* (Vol. 33, pp. 333–378). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9572-5_11
- D'Angelo, C., Hume, B. C. C., Burt, J., Smith, E. G., Achterberg, E. P., & Wiedenmann, J. (2015). Local adaptation constrains the distribution potential of heat-tolerant Symbiodinium from the Persian/Arabian Gulf. *The ISME Journal*, 9(12), 2551–2560. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.80>
- del Campo, J., Pombert, J.-F., Šlapeta, J., Larkum, A., & Keeling, P. J. (2017). The ‘other’ coral symbiont: *Ostreobium* diversity and distribution. *The ISME Journal*, 11(1), 296–299. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.101>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Diaz-Pulido, G., & McCook, L. (2002). Diaz-Pulido G, McCook LJ.. The fate of bleached corals: Patterns and dynamics of algal recruitment. *Mar Ecol Prog Ser* 232: 115-128. *Marine Ecology Progress Series*, 232. <https://doi.org/10.3354/meps232115>
- Edgar, R. C. (2018). Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. *PeerJ*, 6, e4652. <https://doi.org/10.7717/peerj.4652>
- Eiler, A., Drakare, S., Bertilsson, S., Pernthaler, J., Peura, S., Rofner, C., Simek, K., Yang, Y., Znachor, P., & Lindström, E. S. (2013). Unveiling Distribution Patterns of Freshwater Phytoplankton by a Next Generation Sequencing Based Approach. *PLOS ONE*, 8(1), e53516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053516>

- Enochs, I. C., Manzello, D. P., Tribollet, A., Valentino, L., Kolodziej, G., Donham, E. M., Fitchett, M. D., Carlton, R., & Price, N. N. (2016). Elevated Colonization of Microborers at a Volcanically Acidified Coral Reef. *PLOS ONE*, *11*(7), e0159818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159818>
- Enochs, I., Manzello, D., Donham, E., Kolodziej, G., R. O., Johnston, L., C, Y., J, I., Edwards, C., Fox, M., Valentino, L., Johnson, S., D, B., SJ, C., Carlton, R., T, B., Eynaud, Y., & Price, N. (2015). Shift from coral to macroalgae dominance on a volcanically acidified reef. *Nature Climate Change*. <https://doi.org/10.1038/nclimate2758>
- Fabricius, K., Langdon, C., Uthicke, S., Humphrey, C., Noonan, S., De'ath, G., Okazaki, R., Muehllehner, N., Gutbrod, M., & Lough, J. (2011). Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Climate Change*, *1*, 165–169. <https://doi.org/10.1038/nclimate1122>
- Farrelly, V., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(7), 2798–2801. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167554/>
- Feely, R., Doney, S., & Cooley, S. (2009). Ocean Acidification: Present Conditions and Future Changes in a High-CO₂ World. *Oceanography*, *22*(4), 36–47. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.95>
- Fine, M., & Loya, Y. (2002). Endolithic algae: An alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *269*, 1205–1210. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1983>

- Fine, M., Roff, G., Ainsworth, T., & Hoegh-Guldberg, O. (2006). Phototrophic microendoliths bloom during coral “white syndrome”. *Coral Reefs*, 25. <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0143-4>
- Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA Gene Primer Pairs for Monitoring Microbial Community Structures Showed High Reproducibility within and Low Comparability between Datasets Generated with Multiple Archaeal and Bacterial Primer Pairs. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01297>
- Forrest, M., Ledesma-Vázquez, J., Ussler, B., Kulongoski, J., Hilton, D., & Greene, H. (2005). Gas geochemistry of a shallow submarine hydrothermal vent associated with the El Requesón fault zone, Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology*, 224, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.07.015>
- Foster, M. S. (2001). RHODOLITHS: BETWEEN ROCKS AND SOFT PLACES. *Journal of Phycology*, 37(5), 659–667. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.00195.x>
- Foster, M. S., McConnico, L. M., Lundsten, L., Wadsworth, T., Kimball, T., Brooks, L. B., Medina-López, M., Riosmena-Rodríguez, R., Hernández-Carmona, G., Vásquez-Elizondo, R. M., Johnson, S., & Steller, D. L. (2007). Diversity and natural history of a *Lithothamnion muelleri*-*Sargassum horridum* community in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 33(4), 367–384. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-38802007000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Fricke, H., Giere, O., Stetter, K., Alfredsson, G. A., Kristjansson, J. K., Stoffers, P., & Svavarsson, J. (1989). Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge. *Marine Biology*, *102*(3), 425–429. <https://doi.org/10.1007/BF00428495>
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R., & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, *261*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>
- González-Delgado, S., & Hernández, J. C. (2018). The Importance of Natural Acidified Systems in the Study of Ocean Acidification: What Have We Learned? En *Advances in Marine Biology* (Vol. 80, pp. 57–99). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2018.08.001>
- Gonzalez-Zapata, F. L., Gómez-Osorio, S., & Sánchez, J. A. (2018). Conspicuous endolithic algal associations in a mesophotic reef-building coral. *Coral Reefs*, *37*(3), 705–709. <https://doi.org/10.1007/s00338-018-1695-9>
- Goreau, T., & Hayes, R. (1994). Coral Bleaching and Ocean "Hot Spots. *Ambio*, *23*.
- Gratwicke, B., & Speight, M. (2005). The relationship between fish species richness, abundance and habitat complexity in a range of shallow tropical marine habitats. *Journal of Fish Biology*, *66*, 650–667. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00629.x>
- Grottoli, A. G., Dalcin Martins, P., Wilkins, M. J., Johnston, M. D., Warner, M. E., Cai, W.-J., Melman, T. F., Hoadley, K. D., Pettay, D. T., Levas, S., & Schoepf, V. (2018). Coral physiology and microbiome dynamics under combined warming and ocean acidification. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191156>
- Guest, J. R., Baird, A. H., Maynard, J. A., Muttaqin, E., Edwards, A. J., Campbell, S. J., Yewdall, K., Affendi, Y. A., & Chou, L. M. (2012). Contrasting Patterns of Coral

- Bleaching Susceptibility in 2010 Suggest an Adaptive Response to Thermal Stress. *PLOS ONE*, 7(3), e33353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033353>
- Guinotte, J. M., & Fabry, V. J. (2008). Ocean Acidification and Its Potential Effects on Marine Ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1134(1), 320–342. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.013>
- Gutner-Hoch, E., & Fine, M. (2011). Genotypic diversity and distribution of *Ostreobium quekettii* within scleractinian corals. *Coral Reefs*, 30, 643–650. <https://doi.org/10.1007/s00338-011-0750-6>
- Guzmán, H., & Cortés, J. (2008, enero 1). *IUCN Red List of Threatened Species: Porites panamensis*. IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Halfar, J., Godinez-Orta, L., Riegl, B., Valdez-Holguin, J. E., & Borges, J. M. (2005). Living on the edge: High-latitude *Porites* carbonate production under temperate eutrophic conditions. *Coral Reefs*, 24(4), 582–592. <https://doi.org/10.1007/s00338-005-0029-x>
- Halldal, P. (1968). PHOTOSYNTHETIC CAPACITIES AND PHOTOSYNTHETIC ACTION SPECTRA OF ENDOZOIC ALGAE OF THE MASSIVE CORAL FAVIA. *The Biological Bulletin*, 134(3), 411–424. <https://doi.org/10.2307/1539860>
- Hall-Spencer, J., Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ransome, E., Fine, M., Turner, S., Rowley, S., Tedesco, D., & Buia, M. (2008). Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature07051>
- Halpern, B. S., Selkoe, K. A., Micheli, F., & Kappel, C. V. (2007). Evaluating and Ranking the Vulnerability of Global Marine Ecosystems to Anthropogenic Threats. *Conservation Biology*, 21(5), 1301–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2007.00752.x>

- Harrington, L., Fabricius, K., De'ath, G., & Negri, A. (2004). RECOGNITION AND SELECTION OF SETTLEMENT SUBSTRATA DETERMINE POST-SETTLEMENT SURVIVAL IN CORALS. *Ecology*, 85(12), 3428–3437. <https://doi.org/10.1890/04-0298>
- Harvey, A., & Woelkerling, W. (2007). A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Ciencias Marinas*, 33. <https://doi.org/10.7773/cm.v33i4.1210>
- Hinojosa Arango, G., & Riosmena-Rodriguez, R. (2004). Influence of Rhodolith-Forming Species and Growth-Form on Associated Fauna of Rhodolith Beds in the Central-West Gulf of California, México. *Marine Ecology*, 25, 109–127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2004.00019.x>
- Hinojosa-Arango, G., Rioja-Nieto, R., Suárez, A., & Riosmena-Rodriguez, R. (2014). Using GIS Methods to Evaluate Rhodolith and Sargassum Beds as Critical Habitats for Commercially Important Marine Species in Bahía Concepción, B.C.S., México. *Cryptogamie Algologie*, 35, 49–65. <https://doi.org/10.7872/crya.v35.iss1.2014.49>
- Hochberg, E., Atkinson, M., & Andréfouët. (2003). Spectral reflectance of coral reef bottom-types worldwide and implications for coral reef remote sensing. *Remote Sensing of Environment*, 85(2), 159–173. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00201-8](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00201-8)
- Hoegh-Guldberg, O., Poloczanska, E. S., Skirving, W., & Dove, S. (2017). Coral Reef Ecosystems under Climate Change and Ocean Acidification. *Frontiers in Marine Science*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00158>
- Hoeksema, B. (2012). Forever in the dark: The cave-dwelling azooxanthellate reef coral *Leptoseris troglodyta* sp. n. (Scleractinia, Agariciidae). *ZooKeys*, 228, 21–37. <https://doi.org/10.3897/zookeys.228.3798>

- Howells, E., Beltran, V., NW, L., Bay, L., Willis, B., & van Oppen, M. (2012). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nature Climate Change*, *2*, 116–120. <https://doi.org/10.1038/nclimate1330>
- Hubbard, D. K., Rogers, C. S., Lipps, J. H., & Stanley, G. D. (Eds.). (2016). *Coral Reefs at the Crossroads* (Vol. 6). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7567-0>
- Hughes, T. P., Barnes, M. L., Bellwood, D. R., Cinner, J. E., Cumming, G. S., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., van de Leemput, I. A., Lough, J. M., Morrison, T. H., Palumbi, S. R., van Nes, E. H., & Scheffer, M. (2017). Coral reefs in the Anthropocene. *Nature*, *546*(7656), 82–90. <https://doi.org/10.1038/nature22901>
- Ibrahim, H. D., Xue, P., & Eltahir, E. A. B. (2020). Multiple Salinity Equilibria and Resilience of Persian/Arabian Gulf Basin Salinity to Brine Discharge. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 573. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00573>
- Iha, C., Dougan, K. E., Varela, J. A., Avila, V., Jackson, C. J., Bogaert, K. A., Chen, Y., Judd, L. M., Wick, R., Holt, K. E., Pasella, M. M., Ricci, F., Repetti, S. I., Medina, M., Marcelino, V. R., Chan, C. X., & Verbruggen, H. (2021). Genomic adaptations to an endolithic lifestyle in the coral-associated alga *Ostreobium*. *Current Biology*, *31*(7), 1393-1402.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.018>
- Ii, M. S. R., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLOS Computational Biology*, *17*(11), e1009581. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>

- Inoue, S., Kayanne, H., Yamamoto, S., & Kurihara, H. (2013). Spatial community shift from hard to soft corals in acidified water. *Nature Climate Change*, 3(7), 683–687.
<https://doi.org/10.1038/nclimate1855>
- Johannes, R., Wiebe, W., Crossland, C., Rimmer, D., & Smith, S. (1983). Latitudinal limits of coral reef growth. *Marine Ecology Progress Series*, 11, 105–111.
<https://doi.org/10.3354/meps011105>
- Jury, C. P., Delano, M. N., & Toonen, R. J. (2019). High heritability of coral calcification rates and evolutionary potential under ocean acidification. *Scientific Reports*, 9(1), 20419.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56313-1>
- Kahng, S., Akkaynak, D., Shlesinger, T., Hochberg, E., Wiedenmann, J., & Tamir, R. (2019). *Light, Temperature, Photosynthesis, Heterotrophy, and the Lower Depth Limits of Mesophotic Coral Ecosystems*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_42
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., von Haeseler, A., & Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kannapiran, E., Manikandan, B., Murali, R. M., & Joseph, A. (2012). Bleaching and secondary threats on the corals of Palk Bay: A survey and Proactive conservation needs. *INDIAN J. MAR. SCI.*, 41(1), 8.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

- Kellogg, E. A., & Juliano, N. D. (1997). The structure and function of RuBisCO and their Implications for Systematic Studies. *American Journal of Botany*, 84(3), 413–428. <https://doi.org/10.2307/2446015>
- Kleypas, J., McManus, J., & MEÑEZ, L. (1999). Environmental Limits to Coral Reef Development: Where Do We Draw the Line? *Am. Zool.*, 39. <https://doi.org/10.1093/icb/39.1.146>
- Knowlton, N. (2001). The future of coral reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5419–5425. <https://doi.org/10.1073/pnas.091092998>
- Knutson, D., Buddemeier, R. W., & Smith, S. V. (1972). Knutson, D. W., Buddemeier, R. W., & Smith, S. V. (1972). Coral Chronometers: Seasonal Growth Bands in Reef Corals. *Science*, 177(4045), 270–272. <https://doi.org/10.1126/science.177.4045.270>
- Koweek, D., Dunbar, R., Monismith, S., Mucciarone, D., Woodson, C., & Samuel, L. (2015). High-resolution physical and biogeochemical variability from a shallow back reef on Ofu, American Samoa: An end-member perspective. *Coral Reefs*, 34. <https://doi.org/10.1007/s00338-015-1308-9>
- Kroeker, K., Kordas, R., Crim, R., Hendriks, I., Ramajo, L., Singh, G., Duarte, C., & Gattuso, J.-P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob Chang Biol. Global change biology*, 19. <https://doi.org/10.1111/gcb.12179>
- Kühl, M., Holst, G., Larkum, A., & Ralph, P. (2008). Imaging of oxygen dynamics within the endolithic algal community of the massive coral *Porites lobata*. *Journal of Phycology*, 44, 541–550. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00506.x>

- LaJeunesse, T., Parkinson, J., Gabrielson, P., Jeong, H. J., Reimer, J., Voolstra, C., & Santos, S. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, *28*, 2570–2580.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, *9*(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, *30*(22), 3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- 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.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, F., Henderson, G., Sun, X., Palevich, F., Janssen, P., & Guan, L. (2016). Taxonomic Assessment of Rumen Microbiota Using Total RNA and Targeted Amplicon Sequencing Approaches. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00987>
- Littler, M. M. (1972). The crustose Corallinaceae, 10: 311-347. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, *10*, 311–347.
<http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/2475>
- Littler, M. M., & Littler, D. S. (2013). The Nature of Crustose Coralline Algae and Their Interactions on Reefs. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*, *39*, 199–212.
- López-Pérez, A., Reyes-Bonilla, H., Budd, A., & Correa S., F. (2003). Posición taxonómica de *Porites sverdrupi*, coral endémico del Golfo de California. *Ciencias Marinas*, *29*, 677–691.

- Lydon, K. A., & Lipp, E. K. (2018). Taxonomic annotation errors incorrectly assign the family Pseudoalteromonadaceae to the order Vibrionales in Greengenes: Implications for microbial community assessments. *PeerJ*, 6, e5248. <https://doi.org/10.7717/peerj.5248>
- Magnusson, S. H., Fine, M., & Kühl, M. (2007). Light microclimate of endolithic phototrophs in the scleractinian corals *Montipora monasteriata* and *Porites cylindrica*. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 119–128. <https://doi.org/10.3354/meps332119>
- Malla, M., Dubey, D.-A., Kumar, A., & Yadav, S. (2018). Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>
- Marcelino, V. R., Morrow, K. M., Oppen, M. J. H., Bourne, D. G., & Verbruggen, H. (2017). Diversity and stability of coral endolithic microbial communities at a naturally high $p\text{CO}_2$ reef. *Molecular Ecology*, 26(19), 5344–5357. <https://doi.org/10.1111/mec.14268>
- Marcelino, V. R., van Oppen, M. J., & Verbruggen, H. (2018). Highly structured prokaryote communities exist within the skeleton of coral colonies. *The ISME Journal*, 12(1), 300–303. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.164>
- Marcelino, V. R., & Verbruggen, H. (2016). Multi-marker metabarcoding of coral skeletons reveals a rich microbiome and diverse evolutionary origins of endolithic algae. *Scientific Reports*, 6(1), 31508. <https://doi.org/10.1038/srep31508>
- Marcelino, V. R., & Verbruggen, H. (2017). Reference datasets of *tufA* and UPA markers to identify algae in metabarcoding surveys. *Data in Brief*, 11, 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.013>

- Massé, A., Domart-Coulon, I., Golubic, S., Duché, D., & Tribollet, A. (2018). Early skeletal colonization of the coral holobiont by the microboring Ulvophyceae *Ostreobium* sp. *Scientific Reports*, 8(1), 2293. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20196-5>
- Matthes, U., Turner, S. J., & Larson, D. W. (2001). Light Attenuation by Limestone Rock and Its Constraint on the Depth Distribution of Endolithic Algae and Cyanobacteria. *International Journal of Plant Sciences*, 162(2), 263–270. <https://doi.org/10.1086/319570>
- Mcgregor, H. V., & Gagan, M. K. (2003). Diagenesis and geochemistry of Porites corals from Papua New Guinea: Implications for paleoclimate reconstruction. *Geochimica et Chosmochimica Acta*, 67(12), 10.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Melwani, A. R., & Kim, S. L. (2008). Benthic infaunal distributions in shallow hydrothermal vent sediments. *Acta Oecologica*, 33(2), 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2007.10.008>
- Meron, D., Rodolfo-Metalpa, R., Cunning, R., Baker, A. C., Fine, M., & Banin, E. (2012). Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. *The ISME Journal*, 6(9), 1775–1785. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.19>
- Morgan, K. M., Moynihan, M. A., Sanwlani, N., & Switzer, A. D. (2020). Light Limitation and Depth-Variable Sedimentation Drives Vertical Reef Compression on Turbid Coral Reefs. *Frontiers in Marine Science*, 7, 931. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.571256>

- 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*, *116*(21), 10586–10591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721415116>
- Moyer, R., Riegl, B., Banks, K., & Dodge, R. (2003). Spatial patterns and ecology of benthic communities on a high-latitude South Florida (Broward County, USA) reef system. *Coral Reefs*, *22*, 447–464. <https://doi.org/10.1007/s00338-003-0334-1>
- Nakamura, T., Yamazaki, S. S., Sakai, K., Yamasaki, H., Furushima, Y., & Yamamoto, H. (2006). Acroporid corals growing over a methane-bubbling hydrothermal vent, Southern Ryukyu Archipelago. *Coral Reefs*, *25*(3), 382–382. <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0107-8>
- NextGIS. (2022). *QuickMapServices* (0.19.26) [Computer software]. <http://qms.nextgis.com>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nicholls, S. (2016, diciembre 24). bowtie2: Relaxed Parameters for Generous Alignments to Metagenomes. *Samposium*. <https://samnicholls.net/2016/12/24/bowtie2-metagenomes/>
- Obeso-Nieblas, M., Gaviño-Rodríguez, J. H., & Obeso-Huerta, H. (2012). Variabilidad espacial y estacional de temperatura, salinidad y densidad en Bahía Concepción, Golfo de California, México. *Revista de biología marina y oceanografía*, *47*(3), 489–502. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300011>
- O'Brien, P. A., Smith, H. A., Fallon, S., Fabricius, K., Willis, B. L., Morrow, K. M., & Bourne, D. G. (2018). Elevated CO₂ Has Little Influence on the Bacterial Communities

- Associated With the pH-Tolerant Coral, Massive *Porites* spp. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2621. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02621>
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Szoecs, E., & Wagner, E. (2020). *vegan: Community Ecology Package (2.5-7)* [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliver, T. A., & Palumbi, S. R. (2011). Many corals host thermally resistant symbionts in high-temperature habitat. *Coral Reefs*, 30(1), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0696-0>
- Oporto-Guerrero, T., Reyes-Bonilla, H., & Ladah, L. B. (2018). Presence of the reef-building coral, *Porites panamensis*, in a shallow hydrothermal field in the Gulf of California. *Marine Biodiversity*, 48(1), 703–708. <https://doi.org/10.1007/s12526-016-0546-6>
- Palumbi, S. R., Barshis, D. J., Traylor-Knowles, N., & Bay, R. A. (2014). Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science*, 344(6186), 895–898. <https://doi.org/10.1126/science.1251336>
- Paz-García, D. A., & Balart, E. F. (2016). New record of the endemic coral *Porites sverdrupi* (Gulf of California): do fluctuations in seawater temperature regulate its southernmost range limit?. *Marine Biodiversity*, 46(2), 499-502.
- Peixoto, R. S., Rosado, P. M., Leite, D. C. de A., Rosado, A. S., & Bourne, D. G. (2017). Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Frontiers in Microbiology*, 8, 341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>

- Pernice, M., Raina, J.-B., Rådecker, N., Cárdenas, A., Pogoreutz, C., & Voolstra, C. R. (2020). Down to the bone: The role of overlooked endolithic microbiomes in reef coral health. *The ISME Journal*, *14*(2), 325–334. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0548-z>
- Perry, C. T., & Larcombe, P. (2003). Marginal and non-reef-building coral environments. *Coral Reefs*, *22*(4), 427–432. <https://doi.org/10.1007/s00338-003-0330-5>
- Pichler, T. (1998). *Hydrothermal activity in a coral reef ecosystem, Tutum Bay, Ambitle Island, Papua New Guinea*. [Thesis, University of Ottawa (Canada)]. <https://doi.org/10.20381/ruor-13893>
- Pichler, T., & Dix, G. R. (1996). *Hydrothermal venting within a coral reef ecosystem, Ambitle Island, Papua New Guinea*. 4.
- Pichon, M. (2011). Porites. En D. Hopley (Ed.), *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2639-2>
- Porzio, L., Buia, M. C., & Hall-Spencer, J. M. (2011). Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *400*(1–2), 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.02.011>
- Price, R., & Giovannelli, D. (2017). A Review of the Geochemistry and Microbiology of Marine Shallow-Water Hydrothermal Vents. En *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09523-3>
- Prol-Ledesma, R. M., Canet, C., Torres-Vera, M. A., Forrest, M. J., & Armienta, M. A. (2004). Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, *137*(4), 311–328. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2004.06.003>

- QGIS.org. (2022). *QGIS Geographic Information System*. (3.16.10) [Computer software]. QGIS Association. <https://www.qgis.org/en/site/>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R. Marcelino, V., Cremen, M. C. M., Jackson, C. J., Larkum, A. A. W., & Verbruggen, H. (2016). Evolutionary Dynamics of Chloroplast Genomes in Low Light: A Case Study of the Endolithic Green Alga *Ostreobium quekettii*. *Genome Biology and Evolution*, *8*(9), 2939–2951. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw206>
- Rambaut, A. (2018). *FigTree*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reigel, A. M., Paz-García, D. A., & Hellberg, M. E. (2021). Microbiome of a Reef-Building Coral Displays Signs of Acclimation to a Stressful Shallow Hydrothermal Vent Habitat. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 1223. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.652633>
- Reigel, A., Owens, S., & Hellberg, M. (2020). Reducing host DNA contamination in 16S rRNA gene surveys of anthozoan microbiomes using PNA clamps. *Coral Reefs*, *39*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-02006-5>
- Repetti, S. I., Jackson, C. J., Judd, L. M., Wick, R. R., Holt, K. E., & Verbruggen, H. (2020). The inflated mitochondrial genomes of siphonous green algae reflect processes driving expansion of noncoding DNA and proliferation of introns. *PeerJ*, *8*. <https://doi.org/10.7717/peerj.8273>
- Reyes-Bonilla, H., & Fosters, S. (1997). Hermatypic Corals Associated with Rhodolith Beds in the Gulf of California, Mexico. *PACIFIC SCIENCE*, *51*, 10.

- Reyes-Nivia, M., Diaz-Pulido, G., Kline, D., Hoegh-Guldberg, O., & Dove, S. (2013). Ocean acidification and warming scenarios increase microbioerosion of coral skeleton. *Global change biology*, 19. <https://doi.org/10.1111/gcb.12158>
- Ricci, F., Rossetto Marcelino, V., Blackall, L. L., Kühn, M., Medina, M., & Verbruggen, H. (2019). Beneath the surface: Community assembly and functions of the coral skeleton microbiome. *Microbiome*, 7(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0762-y>
- Riegl, B. M., Purkis, S. J., Al-Cibahy, A. S., Abdel-Moati, M. A., & Hoegh-Guldberg, O. (2011). Present Limits to Heat-Adaptability in Corals and Population-Level Responses to Climate Extremes. *PLOS ONE*, 6(9), e24802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024802>
- Riegl, B., & Purkis, S. J. (2011). Persian/Arabian Gulf Reefs. En D. Hopley (Ed.), *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process* (pp. 790–797). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2639-2>
- Riosmena-Rodriguez, R., D.L., S., Hinojosa Arango, G., & M.S., F. (2010). *Reefs that Rock and Roll: Biology and Conservation of Rhodolith beds in the Gulf of California*.
- Riosmena-Rodriguez, R., & Medina-López, M. A. (2010). The Role of Rhodolith Beds in the Recruitment of Invertebrate Species from the Southwestern Gulf of California, Mexico. En Z. Dubinsky & J. Seckbach (Eds.), *All Flesh Is Grass* (Vol. 16, pp. 415–426). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9316-5_19
- Rogers, C. (1990). Responses of coral reefs and reef organisms to sedimentation. *Marine Ecology Progress Series*, 62, 185–202. <https://doi.org/10.3354/meps062185>
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355–362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>

- Safaie, A., Silbiger, N. J., McClanahan, T. R., Pawlak, G., Barshis, D. J., Hench, J. L., Rogers, J. S., Williams, G. J., & Davis, K. A. (2018). High frequency temperature variability reduces the risk of coral bleaching. *Nature Communications*, *9*(1), 1671. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04074-2>
- Saunders, G., & Kucera, H. (2010). An evaluation of rbcL, tufA, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie, Algologie*, *31*(4), 487–528. <https://sciencepress.mnhn.fr/fr/periodiques/algologie/31/4/evaluation-rbcl-tufa-upa-lsu-and-its-dna-barcode-markers-marine-green-macroalgae>
- Sauvage, T., Schmidt, W. E., Suda, S., & Fredericq, S. (2016). A metabarcoding framework for facilitated survey of endolithic phototrophs with tufA. *BMC Ecology*, *16*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0068-x>
- Savary, R., Barshis, D. J., Voolstra, C. R., Cárdenas, A., Evensen, N. R., Banc-Prandi, G., Fine, M., & Meibom, A. (2021). Fast and pervasive transcriptomic resilience and acclimation of extremely heat-tolerant coral holobionts from the northern Red Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(19), e2023298118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023298118>
- Schneider, A. N., Sundh, J., Sundström, G., Richau, K., Delhomme, N., Grabherr, M., Hurry, V., & Street, N. R. (2021). Comparative Fungal Community Analyses Using Metatranscriptomics and Internal Transcribed Spacer Amplicon Sequencing from Norway Spruce. *MSystems*, *6*(1), e00884-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00884-20>
- Shashar, N., Banaszak, T., Lesser, M. P., & Amrami, D. (1997). Coral Endolithic Algae: Life in a Protected Environment! *PACIFIC SCIENCE*, *51*, 7.

- Sheppard, C. R. C., Davy, S. K., Pilling, G. M., & Graham, N. A. J. (2018). *The Biology of Coral Reefs*. Oxford University Press.
- Smith, E. G., Vaughan, G. O., Ketchum, R. N., McParland, D., & Burt, J. A. (2017). Symbiont community stability through severe coral bleaching in a thermally extreme lagoon. *Scientific Reports*, 7(1), 2428. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01569-8>
- Spalding, M., Ravilious, C., & Green, E. P. (2001). *World atlas of coral reefs*. University of California Press.
- Stanley, G. D. (2003). The evolution of modern corals and their early history. *Earth-Science Reviews*, 60(3–4), 195–225. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(02)00104-6)
- Steller, D. L. (2007). Effect of temperature on photosynthesis, growth and calcification rates of the free-living coralline alga *Lithophyllum margaritae*. *Ciencias Marinas*, 33(4), 441–456. <https://doi.org/10.7773/cm.v33i4.1255>
- Steller, D. L., Riosmena-Rodríguez, R., Foster, M. S., & Roberts, C. A. (2003). Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: The importance of rhodolith structure and consequences of disturbance. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 13(S1), S5–S20. <https://doi.org/10.1002/aqc.564>
- Sully, S., Burkepile, D. E., Donovan, M. K., Hodgson, G., & van Woesik, R. (2019). A global analysis of coral bleaching over the past two decades. *Nature Communications*, 10(1), 1264. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09238-2>
- Tarasov, V. G., Gebruk, A. V., Mironov, A. N., & Moskalev, L. I. (2005). Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena? *Chemical Geology*, 224(1–3), 5–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.07.021>

- Treviño, E. (2020). *RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA DEL CORAL *Porites panamensis* EN LAS CERCANÍAS DE UN CAMPO HIDROTERMAL EN EL GOLFO DE CALIFORNIA*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).
- Tribollet, A., Godinot, C., Atkinson, M., & Langdon, C. (2009). Effects of elevated pCO₂ on dissolution of coral carbonates by microbial euendoliths. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(3). <https://doi.org/10.1029/2008GB003286>
- Verbruggen, H. (2014). Morphological complexity, plasticity, and species diagnosability in the application of old species names in DNA-based taxonomies. *Journal of Phycology*, 50(1), 26–31. <https://doi.org/10.1111/jpy.12155>
- Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S. T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F. W., Littler, D. S., Littler, M. M., & Leliaert, F. (2009). A multi-locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(3), 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.018>
- Verbruggen, H., & Tribollet, A. (2011). Boring algae. *Current Biology*, 21(21), R876–R877. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.014>
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS ONE*, 8(2), e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Visram, S., & Douglas, A. E. (2007). Resilience and acclimation to bleaching stressors in the scleractinian coral *Porites cylindrica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.04.014>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer New York. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-98141-3>

- Zapata, F., & Lozano-Cortés, D. (2015). Occurrence of the coral *Porites panamensis* (Cnidaria: Scleractinia) in an estuarine environment of the Colombian Pacific. *Marine Biodiversity Records*, 8. <https://doi.org/10.1017/S1755267215001153>
- Zechman, F. W., Theriot, E. C., Zimmer, E. A., & Chapman, R. L. (1990). PHYLOGENY OF THE ULVOPHYCEAE (CHLOROPHYTA): CLADISTIC ANALYSIS OF NUCLEAR-ENCODED rRNA SEQUENCE DATA1. *Journal of Phycology*, 26(4), 700–710. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00700.x>
- Ziegler, M., Seneca, F. O., Yum, L. K., Palumbi, S. R., & Voolstra, C. R. (2017). Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. *Nature Communications*, 8, 14213. <https://doi.org/10.1038/ncomms14213>

XII. APÉNDICE

Cuadro 1A. . Conteo de lecturas por librería antes y después del proceso de mapeo en Bowtie2.

Muestra	Método de secuenciación	Conteo de lecturas pre-mapeadas	Conteo de lecturas mapeadas (Bowtie2)
549	RNA-seq	30,659,306	33,266
	Amplicon-seq	1,080,968	299,659
552	RNA-seq	24,656,962	2,750
	Amplicon-seq	628,614	129,889
553	RNA-seq	25,907,880	11,534
	Amplicon-seq	657,048	158,863
554	RNA-seq	28,399,156	12,137
	Amplicon-seq	1,233,912	308,123
555	RNA-seq	30,950,164	7,793
	Amplicon-seq	558,843	109,609
556	RNA-seq	34,581,744	16,814
	Amplicon-seq	325,969	80,080
557	RNA-seq	40,863,087	68,310
	Amplicon-seq	852,328	250,627
558	RNA-seq	25,340,516	6,822
	Amplicon-seq	1,035,923	62,505
559	RNA-seq	28,124,609	134,806
	Amplicon-seq	579,902	102,162
560	RNA-seq	25,847,257	21,739
	Amplicon-seq	382,097	123,925
561	RNA-seq	30,570,068	2,403
	Amplicon	821,537	192,406
PROMEDIO	RNA-seq	29,627,341	28,943
	Amplicon-seq	741,558	165,259

Nota: Los valores resaltados indican las librerías con menor cantidad de lecturas mapeadas

Cuadro 2A. Estadísticos del proceso de calidad, revisión de quimeras y unificación de paired end (dada2) para las librerías Amplicon-seq.

Muestra	Lecturas crudas	Lecturas filtradas	% lecturas seleccionadas	Denoised	Combinadas	% de lecturas combinadas	Lecturas no- quiméricas	% lecturas no- quiméricas
549_PNA	299,659	231,690	77.32%	228,994	221,879	74.04%	220671	73.64%
552	129,889	122,287	94.15%	120,996	117,455	90.43%	113535	87.41%
553_PNA	158,863	129,115	81.27%	128,715	128,066	80.61%	127865	80.49%
554	308,123	286,891	93.11%	286,132	280,042	90.89%	277847	90.17%
555	109,609	103,632	94.55%	103,190	101,789	92.87%	100873	92.03%
556	80,080	76,655	95.72%	75,664	74,169	92.62%	73782	92.14%
557_PNA	250,627	202,142	80.65%	201,785	200,821	80.13%	199547	79.62%
558_PNA	62,505	47,369	75.78%	47,078	46,628	74.6%	45729	73.16%
559	102,162	95,912	93.88%	95,674	95,161	93.15%	94959	92.95%
560	123,925	117,219	94.59%	116,928	116,174	93.75%	115991	93.6%
561_PNA	192,406	149,229	77.56%	147,697	143,946	74.81%	143212	74.43%

Cuadro 3A. Estadísticos del proceso de calidad, revisión de quimeras y unificación de paired end para las librerías RNA-seq.

Muestra	Lecturas crudas	Lecturas filtradas	% lecturas seleccionadas	Denoised	Combinadas	% de lecturas combinadas	Lecturas no-quiméricas	% lecturas no-quiméricas
549_R	33,266	32,778	98.53%	29,428	17,104	51.42%	12457	37.45%
552_R	2,750	2,709	98.51%	1,311	668	24.29%	609	22.15%
553_R	11,534	11,408	98.91%	9,054	5,712	49.52%	4663	40.43%
554_R	12,137	12,005	98.91%	11,050	7,415	61.09%	6013	49.54%
555_R	7,793	7,679	98.54%	6,768	4,738	60.8%	3748	48.09%
556_R	16,814	16,632	98.92%	15,285	11,953	71.09%	8755	52.07%
557_R	68,310	67,727	99.15%	64,263	52,898	77.44%	38183	55.9%
558_R	6,822	6,752	98.97%	5,688	4,371	64.07%	3651	53.52%
559_R	134,806	133,635	99.13%	132,650	114,278	84.77%	80516	59.73%
560_R	21,739	21,463	98.73%	20,762	17,028	78.33%	12435	57.2%
561_R	2,403	2,380	99.04%	1,962	1,469	61.13%	1341	55.81%

Cuadro 4A. Conteo de ASVs antes y después de filtrado taxonómico en QIIME.

Muestra	Método de secuenciación	Conteo pre-filtrado de ASVs (frecuencia)	Conteo de ASVs filtradas en QIIME (frecuencia)
549	RNA-seq	12,457	2,506
	Amplicon	220,671	67,221
552	RNA-seq	609	213
	Amplicon	113,535	29,184
553	RNA-seq	4,663	1,211
	Amplicon	127,865	105,780
554	RNA-seq	6,013	1,594
	Amplicon	277,847	121,526
555	RNA-seq	3,748	850
	Amplicon	100,873	26,542
556	RNA-seq	8,755	1,917
	Amplicon	73,782	24,388
557	RNA-seq	38,183	16,541
	Amplicon	199,547	148,983
558	RNA-seq	3,651	1,451
	Amplicon	45,729	17,712
559	RNA-seq	80,516	17,322
	Amplicon	94,959	54,848
560	RNA-seq	12,435	1,739
	Amplicon	115,991	61,428
561	RNA-seq	1,341	552
	Amplicon	143,212	20,812
PROMEDIO	RNA-seq	15,670	4,172
	Amplicon-seq	137,637	61,675

Cuadro 5A. Riqueza observada por librería.

Método de secuenciación	Librería	Riqueza observada
Amplicon-seq	549_PNA	3
	552	3
	553_PNA	3
	554	8
	555	5
	556	4
	557_PNA	4
	558_PNA	2
	559	7
	560	7
	561_PNA	3
RNA-seq	549_R	70
	552_R	2
	553_R	74
	554_R	33
	555_R	11
	556_R	35
	557_R	254
	558_R	97
	559_R	162
	560_R	42
561_R	52	

Cuadro 6A. Conteo de ASVs post filtrado filogenético presentes en librerías de Amplicon-seq.

ASVs	549_PNA	552	553_PNA	554	555	556	557_PNA	558_PNA	559	560	561_PNA	Total
<i>ASV_1464</i>	64,661	9,558	102,558	115,085	0	861	135,697	15,997	50,982	60,274	37	555,710
<i>ASV_167</i>	500	1,805	2,381	3,430	1,727	7,363	11,975	265	1,584	96	3,604	34,730
<i>ASV_70</i>	0	0	0	0	12,921	8,350	271	0	0	0	0	21,542
<i>ASV_226</i>	0	0	99	0	1,069	7,773	844	0	351	0	7,357	17,493
<i>ASV_1800</i>	0	0	0	0	4199	0	0	0	0	0	0	4,199
<i>ASV_1135</i>	0	0	0	357	0	0	0	0	173	202	0	732
<i>ASV_486</i>	0	0	0	533	0	0	0	0	0	0	0	533
<i>ASV_826</i>	0	0	0	524	0	0	0	0	0	0	0	524
<i>ASV_1554</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	482	0	0	482
<i>ASV_1091</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	331	0	331
<i>ASV_123</i>	0	0	0	299	0	0	0	0	0	0	0	299
<i>ASV_1618</i>	0	0	0	238	0	0	0	0	0	0	0	238
<i>ASV_1454</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	142	0	142
<i>ASV_1026</i>	0	0	0	0	109	0	0	0	0	0	0	109
<i>ASV_4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	87	0	0	87
<i>ASV_332</i>	0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70
<i>ASV_147</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	68	0	0	68
<i>ASV_337</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	60
<i>ASV_1319</i>	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	21
<i>ASV_855</i>	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
<i>ASV_20</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	15

Cuadro 7A. Códigos de accesoión de Genbank correspondientes a las secuencias de 16S de la filogenia resuleta para *Ostreobium*.

Accesión Genbank				Clasificación según del Campo <i>et al.</i> (2016)
GU200182	GU200214	GU200071	GU319414	
GU119536	GU119516	GU119513	GU119528	
GU119512	GU119525	GU119520	GU119532	
GU119499	GU119494	GU119517	GU119497	
GU119500	GU119527	GU119501	GU119537	
GU119503	GU119519	GU119535	GU119493	
GU119523	GU119511	GU119510	GU119508	
GU119496	GU119498	GU119534	GU119509	
GU119495	GU119515	GU119504	GU119521	
GU119506	GU119502	GU119530	GU119531	
GU119526	GU119507	GU119522	GU119524	
GU119505	GU119529	GU119533	GU119514	
GU119518	GU119546	GU119583	GU119540	
GU119581	GU119552	GU119542	GU119588	
GU119561	GU119585	GU119584	GU119571	
GU119590	GU119555	GU119547	GU119591	
GU119549	GU119587	GU119564	GU119592	
GU119560	GU119556	GU119566	GU119586	
GU119551	GU119573	GU119580	GU119594	
GU119562	GU119545	GU119565	GU119578	
GU119550	GU119544	GU119543	GU119567	
GU119548	GU119596	GU119553	GU119569	OST1
GU119593	GU119570	GU119557	GU119541	
GU119582	GU119576	GU119579	GU119538	
GU119577	JQ347376	JQ347407	JQ316679	
HE817796	GQ204978	GQ204977	AY529881	
AY529884	GU119708	GU119654	GU119604	
GU119661	GU119618	GU119649	GU119709	
GU119643	GU119682	GU119660	GU119691	
GU119610	GU119657	GU119663	HM593533	
HM593539	GQ301408	GU119770	GU119801	
GU119793	GU119822	JN106584	JN106602	
JN106589	FJ535840	JX022216	GU119835	
GU119848	GU119827	GU119843	GU119849	
GU119853	GU119830	GU119847	GU119840	
JN106604	JQ236008	JQ236299	FJ216292	
FJ216294	FJ216295	JF835743	JF835745	
JF835746	JF835750	JF835759	JF835772	
HM223581	HM223583	HM216559	HM216557	
HM216561	FJ202146	FJ203364	FJ203366	
FJ203367	FJ203369	FJ203379	FJ203380	
FJ203384	FJ203389	FJ203390	FJ203393	
FJ203395	FJ203397	FJ203398	FJ203399	

Continuación Cuadro 7A.

Accesión Genbank				Clasificación según del Campo <i>et al.</i> (2016)
FJ203400	FJ203401	FJ203404	FJ203407	OST1
FJ203412	FJ203415	FJ203416	FJ203420	
FJ203348	FJ203424	FJ203349	FJ203431	
FJ203434	FJ203435	FJ203436	FJ203458	
FJ203501	FJ203531	FJ203533	FJ203537	
FJ203549	FJ203550	FJ203588	FJ216244	
FJ216245				
JQ516468	JQ516469	JQ516475	JQ516501	
JQ516505	JQ516545	JQ516555	JQ516566	
JQ516568	JQ516576	JQ516583	JQ516589	
AF473957	HM768377	EU919106	GU119686	
GU119652	GU119699	GU119687	GU119677	
GU119602	GU119664	GU119697	GU119639	
GU119616	GU119641	GU119633	GU119672	
GU119630	GU119696	GU119621	GU119609	
GU119612	GU119680	GU119637	GU119676	
GU119647	GU119638	GU119706	GU119698	
GU119613	GU119675	GU119715	HM593534	
GU119783	GU119787	GU119776	GU119788	
GU119786	GU119767	GU119780	GU119796	
GU119807	GU119812	GU119811	GU119820	
GU119799	GU119802	GU119823	GU119789	
FJ216340	JN106583	JN106600	JN106585	
GU119829	GU119851	GU119828	GU119826	
GU119838	GU119844	JN106665	JF835744	
JF835748	JF835751	JF835760	JF835763	
JF835766	HM223582	HM216544	HM216554	
HM216560	FJ203034	FJ203055	FJ203060	
FJ203172	FJ203006	FJ203179	FJ203180	
FJ203182	FJ203184	FJ203185	FJ203186	
FJ203191	FJ203200	FJ203202	FJ203206	
FJ203207	FJ203008	FJ203210	FJ203214	
FJ203219	FJ203226	FJ203228	FJ203232	
FJ203238	FJ203243	FJ203245	FJ203246	
FJ203254	FJ203255	FJ203256	FJ203259	
FJ203261	FJ203321	FJ203332	FJ203335	
FJ203455	FJ203459	FJ203460	FJ203464	
FJ203465	FJ203467	FJ203474	FJ203475	
FJ203477	FJ203478	FJ203492	FJ203493	
FJ203499	FJ203504	FJ203506	FJ203589	
FJ203625	FJ203630	FJ203631	FJ203637	
FJ203644				
JQ515537	JQ515538	JQ515558	JQ515570	OST3
JQ515675	JQ515677	JQ515678	JQ515695	
JQ515717	JQ515719	JQ515720	JQ516275	
JQ516279	JQ516284	JQ516289	JQ516292	

Continuación Cuadro 7A.

Accesión Genbank				Clasificación según del Campo <i>et al.</i> (2016)
JQ516331	JQ516346	JQ516382	JQ516464	OST3
JQ516497	JQ516512	JQ516514	JQ516532	
JQ516534	JQ516535	JQ516536	JQ516541	
JQ516542	JQ516547	JQ516580	GU119559	
JQ515537	JQ515538	JQ515558	JQ515570	
JQ515675	JQ515677	JQ515678	JQ515695	
JQ515717	JQ515719	JQ515720	JQ516275	
JQ516279	JQ516284	JQ516289	JQ516292	
JQ516331	JQ516346	JQ516382	JQ516464	
JQ516497	JQ516512	JQ516514	JQ516532	
JQ516534	JQ516535	JQ516536	JQ516541	
JQ516542	JQ516547	JQ516580	GU119559	
GU119558	GU119572	GU119539	GU119595	
GU119554	GU119589	HQ127675	HQ127676	
HQ127677	AY038503	AY038504	DQ200494	
DQ200499	DQ200522	DQ200543	DQ200553	
DQ200555	DQ200568	DQ200577	DQ200592	
GU119710	GU119603	GU119695	GU119625	
GU119615	GU119648	GU119679	GU119644	
GU119668	GU119707	GU119662	GU119669	
GU119628	GU119650	GU119673	GU119635	
GU119619	GU119627	GU119617	GU119636	
GU119600	GU119640	GU119620	GU119614	
GU119690	GU119597	GU119694	GU119703	
GU119629	GU119634	GU119768	GU119777	
GU119784	GU119785	GU119773	GU119782	
GU119775	GU119781	GU119774	GU119771	
GU119762	GU119778	GU119766	GU119769	
GU119763	GU119764	GU119772	GU119779	
GU119765	GU119800	GU119798	GU119794	
GU119804	GU119817	GU119810	GU119816	
GU119815	GU119797	GU119819	GU119814	
GU119805	GU119824	GU119792	GU119806	
GU119809	GU119808	GU119795	GU119813	
GU119803	GU119821	GU119790	JN106587	
GU119831	GU119845	GU119832	GU119852	
GU119825	GU119854	FJ203015	FJ203022	
FJ203065	FJ203174	FJ203183	FJ203187	
FJ203190	FJ203211	FJ203213	FJ203240	
FJ203242	FJ203250	FJ203311	FJ203330	
FJ203341	FJ203360	FJ203437	FJ203439	
FJ203447	FJ203448	FJ203351	FJ203451	
FJ203452	FJ203461	FJ203352	FJ203468	
FJ203469	FJ203470	FJ203472	FJ203473	
FJ203482	FJ203484	FJ203489	FJ203490	
FJ203491	FJ203496	FJ203497	FJ203498	
FJ203502	FJ203503	FJ203354	FJ203617	
FJ20363				