

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL  
CALENTAMIENTO GLOBAL SOBRE LOS PROCESOS CELULARES DE  
SUPERVIVENCIA DEL “CORAL DE FUEGO” *Millepora complanata*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M. en C. VÍCTOR HUGO HERNÁNDEZ ELIZÁRRAGA

DIRIGIDA POR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, CENTRO UNIVERSITARIO. 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL  
CALENTAMIENTO GLOBAL SOBRE LOS PROCESOS CELULARES DE  
SUPERVIVENCIA DEL "CORAL DE FUEGO" *Millepora complanata*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M. en C. VÍCTOR HUGO HERNÁNDEZ ELIZÁRRAGA

SINODALES

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

PRESIDENTE

Dr. RAMÓN GUEVARA GONZÁLEZ

SECRETARIO

Dra. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

VOCAL

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SUPLENTE

Dr. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES

SUPLENTE

---

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO  
DIRECTORA FACULTAD DE QUÍMICA

---

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Organismos del Phylum Cnidaria	4
2.2 Venenos de los cnidarios	4
2.2.1 Enzimas	5
2.2.1.1 Fosfolipasas A2	5
2.2.1.2 Metaloproteasas	5
2.2.2 Toxinas formadoras de poros	6
2.2.2.1 Toxinas de medusas	6
2.2.2.2 Hidralisinas	7
2.2.2.3 Complejo de ataque a la membrana	7
2.2.3 Neurotoxinas	7
2.3 Cnidarios del género <i>Millepora</i>	8
2.4 Hidrocorales como organismos holobiontes	9
2.5 Blanqueamiento de arrecifes coralinos	11
2.6 Estudios previos de organismos del género <i>Millepora</i>	13
2.7 Estudio del blanqueamiento en la era de las “ómicas”	15

2.8 La transcriptómica como herramienta de investigación para el estudio del blanqueamiento	16
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos específicos	24
7. METODOLOGÍA	25
7.1 Consideraciones éticas	25
7.2 Recolecta de especímenes	25
7.3 Cuantificación de clorofilas totales	25
7.4 Remoción del tejido del exoesqueleto	25
7.5 Extracción de ADN	26
7.6 Identificación de los genotipos de simbiontes	26
7.7 Extracción de ARN	27
7.7.1 Método 1: Extracción con Trizol	28
7.7.2 Método 2: Extracción con Trizol y precipitación con LiCl	28
7.7.3 Método 3: Extracción con Trizol y purificación con columnas de afinidad	28
7.7.4 Método 4: Extracción con ácido bórico	29
7.7.5 Método 5: Extracción con ácido bórico modificada	29
7.7.6 Método 6: Extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio	30
7.7.7 Método 7: Extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio y precipitación con LiCl	30
7.7.8 Método 8: Kit de extracción RNeasy Mini Kit	30
7.8 Cuantificación del ARN mediante espectrometría UV-VIS	31
7.9 Electroforesis en gel de agarosa	31

7.10 Determinación de la funcionalidad del ARN	32
7.11 Determinación de la integridad del ARN	32
7.12 Comparación estadística entre métodos de extracción de ARN	32
7.13 Secuenciación y ensamblaje del transcriptoma	33
7.14 Anotación funcional y asignación de los términos de ontología de genes	34
7.15 Análisis de expresión diferencial de genes	34
7.16 Validación de los genes diferenciales	35
7.17 Predicción del proteoma y búsqueda de toxinas putativas	36
7.18 Alineamiento múltiple de secuencias	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Grado de blanqueamiento	37
8.2 Genotipificación de simbiontes	38
8.3 Cuantificación y cualificación del ARN	41
8.4 Funcionalidad del ARN	42
8.5 Integridad del ARN	43
8.6 Genes ortólogos de copia única	44
8.7 Contribución de los transcritos en el hidrocoral holobionte	45
8.8 Términos de ontología de genes	46
8.9 Variación intraespecífica durante el blanqueamiento	48
8.10 Detección de toxinas putativas	57
9. DISCUSIÓN	59
9.1 Mecanismos de resistencia al blanqueamiento y su asociación con la diversidad de simbiontes	59
9.2 Implicaciones del aislamiento de ARN funcional en hidrocerales	60
9.3 Composición del holobionte de <i>Millepora</i> spp	63

9.4 Diferencias transcripcionales y posibles mecanismos de respuesta durante el blanqueamiento en <i>M. complanata</i>	64
9.4.1 Traducción y transcripción	64
9.4.2 Transporte celular	65
9.4.3 Respuesta antioxidante	66
9.4.4 Diversidad de toxinas en el transcriptoma de <i>M. complanata</i>	67
10. CONCLUSIÓN	71
11. PUBLICACIONES	73
11. REFERENCIAS	143

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Recolección de las muestras y cuantificación de clorofilas totales	38
2	Árbol filogenético de los simbioses detectados en <i>M. complanata</i> construido mediante el método de unión de vecinos	40
3	Detalles del aislamiento del ARN	41
4	Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa	42
5	Gráficas de amplificación y punto de fusión del gen S-adenosil-L-metionina sintasa	43
6	Determinación de la integridad de ARN	44
7	Integridad del transcriptoma usando la notación BUSCO	45
8	Composición del holobionte <i>M. complanata</i>	46
9	Asignación de los términos de ontología de genes	47
10	Análisis de escalamiento multidimensional	48
11	Análisis de expresión diferencial de genes	49
12	Niveles de expresión relativa de los genes empleados para la validación	56
13	Diversidad de toxinas putativas encontradas en el transcriptoma de <i>M. complanata</i>	57
14	Alineamiento múltiple de secuencias	58

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Estudios recientes del estudio del blanqueamiento con enfoque transcriptómico	18
2	Primers empleados para la identificación de los genotipos de simbioses	27
3	Primers usados para la validación de la expresión de los genes diferenciales	35
4	Identificación de simbioses de la familia Symbiodiniaceae	39
5	Genes expresados de forma diferencial identificados en muestras blanqueadas de <i>M. complanata</i>	50



## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

## RESUMEN

*Millepora complanata* es un hidrocoral formador de arrecifes ampliamente distribuido en el Caribe Mexicano. Esta especie se ha visto seriamente afectada por el estrés térmico derivado calentamiento global. Este factor de estrés ambiental origina el fenómeno conocido como blanqueamiento, el cual amenaza la supervivencia de los organismos del género *Millepora* y de los constructores de arrecifes en general. El propósito de este trabajo de investigación fue determinar el efecto de la disrupción de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, provocada por el estrés térmico derivado del calentamiento global, sobre la transcripción de genes implicados en los procesos celulares de supervivencia del “coral de fuego” *M. complanata*. Como punto de partida para esta investigación, se evaluaron 8 métodos de extracción de ARN, siendo el método 5 (extracción con ácido bórico modificada) el procedimiento más adecuado para la obtención del ARN. Por otro lado, derivado de la determinación del blanqueamiento se observó que los especímenes blanqueados contenían un contenido de clorofila significativamente menor que los hidrocorales normales y la presencia de algas de los géneros *Durusdinium* y *Cladocopium* solo se encontró en tejidos de *M. complanata* normales, lo que podría estar asociado con la mayor resistencia que estas colonias exhibieron durante el blanqueamiento. Por medio de un análisis de expresión diferencial encontramos que 299 genes se expresaron diferencialmente en colonias blanqueadas de *M. complanata* después del ENSO 2015-2016 en el Caribe Mexicano. La respuesta diferencial de *M. complanata* al blanqueamiento mostró términos enriquecidos para categorías funcionales tales como ribosoma, ARN polimerasa y factores de transcripción basales, chaperona, oxidorreductasa, entre otros. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos de respuesta al choque térmico mostrados por *M. complanata* incluyen: una regulación al alza de las defensas antioxidantes endógenas; una mayor expresión de genes de respuesta al estrés por calor; regulación al alza de genes relacionados con la transcripción, mayor expresión de genes asociados a procesos de transporte, entre otros. Finalmente, exploramos la diversidad de toxinas en el transcriptoma de *M. complanata* utilizando un enfoque de minería de datos. Las citolisinas se predijeron a partir del transcriptoma al compararlas con la base de datos del Proyecto de Anotación de Toxinas Animales, lo que dio como resultado 190 toxinas putativas, incluidas metaloproteasas, toxinas que alteran la homeostasia, fosfolipasas, entre otras. Este estudio constituye el primer análisis de expresión génica diferencial de la respuesta molecular de un hidrozoo formador de arrecifes durante el blanqueamiento. Además, este es el primer análisis de minería de datos transcriptómicos que explora la diversidad de las toxinas sintetizadas por un organismo del género *Millepora*. Sin duda, este trabajo aporta información que ampliará nuestra comprensión general de la riqueza estructural de las toxinas de los cnidarios.

## ABSTRACT

*Millepora complanata* is a reef-building hydrocoral widely distributed in the Mexican Caribbean. This species has been seriously affected by thermal stress derived from global warming. This environmental stress factor causes the phenomenon known as bleaching, which threatens the survival of organisms of the genus *Millepora* and others reef-builders in general. The purpose of this research work was to determine the effect of the disruption of the cnidarian-Symbiodiniaceae symbiosis, caused by thermal stress derived from global warming, on the transcription of genes involved in the cellular survival processes of the "fire coral" *M. complanata*. As a starting point for this research, 8 RNA extraction methods were evaluated, being method 5 (modified boric acid extraction) the most suitable procedure for obtaining RNA. On the other hand, derived from the bleaching determination, it was observed that the bleached specimens contained a significantly lower chlorophyll content than normal hydrocorals, and the presence of algae of the genera *Durusdinium* and *Cladocopium* was only found in normal *M. complanata* tissues, which could be associated with the greater resistance that these colonies exhibited during bleaching. Through differential expression analysis we found that 299 genes were differentially expressed in bleached colonies of *M. complanata* after ENSO 2015-2016 in the Mexican Caribbean. The differential response of *M. complanata* to bleaching showed enriched terms for functional categories such as ribosome, RNA polymerase and basal transcription factors, chaperone, oxidoreductase, among others. Our results suggest that the heat-shock response mechanisms exhibited by *M. complanata* include: an up-regulation of endogenous antioxidant defenses; increased expression of heat stress response genes; up-regulation of genes related to transcription, increased expression of genes associated with transport processes, among others. Finally, we explored the diversity of toxins in the *M. complanata* transcriptome using a data mining approach. Cytolysins were predicted from the transcriptome by comparing with the Animal Toxin Annotation Project database, resulting in 190 putative toxins, including metalloproteases, hemostasis-altering toxins, phospholipases, among others. This study constitutes the first differential gene expression analysis of the molecular response of a reef-building hydrozoan during bleaching. Furthermore, this is the first transcriptomic data mining analysis to explore the diversity of toxins synthesized by an organism of the genus *Millepora*. Undoubtedly, this work provides information that will broaden our general understanding of the structural richness of cnidarian toxins.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son considerados como los ecosistemas más diversos de todo el planeta (Knowlton et al., 2010; Plaisance et al., 2011). Se estima que, a pesar de que solamente representan el 0.1% de la superficie de los océanos, los arrecifes de coral soportan a más del 25% de todas las especies marinas. Además, los constructores de arrecifes son indispensables para actividades como el turismo y la pesca (Hughes et al., 2017). Dentro de la gran variedad de organismos capaces de formar estructuras coralinas se encuentran los hidrocorales. Estas especies del género *Millepora* son consideradas como los organismos más importantes para la edificación de los arrecifes de coral, solo por debajo de los corales escleractíneos (Rojas-Molina et al., 2011). Además de su importancia ecológica, los hidrocorales son conocidos comúnmente como “corales de fuego”, ya que inducen efectos tóxicos en el humano (Lewis, 2006).

Corales, hidrocorales y otros cnidarios mantienen una simbiosis mutualista con algas de la familia Symbiodiniaceae, la cual es fundamental para la formación de las estructuras coralinas (Fransolet et al., 2012; Muller-Parker et al., 2015). Las algas, que viven dentro de los tejidos del hospedante, llevan a cabo fotosíntesis y transfieren al cnidario más del 95% de sus productos fotosintéticos. A cambio, estos simbiosiontes cuentan con un refugio contra los herbívoros y tienen acceso a productos metabólicos de desecho del cnidario, tales como nitrógeno inorgánico, fósforo y CO<sub>2</sub>, que es empleado para realizar la fotosíntesis (Venn et al., 2006; Yellowlees et al., 2008).

Desafortunadamente, los arrecifes de coral están amenazados por diversas perturbaciones, entre las que destacan el calentamiento global y la acidificación de los océanos (Lesser, 2011; Neal et al., 2017). Estas perturbaciones provocan un fenómeno conocido como blanqueamiento, el cual ocurre cuando la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae sufre un desequilibrio (Ainsworth & Brown, 2021),

causado por un decremento o pérdida de la población de simbioses o una reducción en la concentración de pigmentos fotosintéticos, o ambos (Hoegh-Guldberg, 1999; Lesser, 2006). La frecuencia y gravedad con la que se presenta este fenómeno ha aumentado en los últimos años y se han registrado eventos de blanqueamiento masivo en todas las regiones tropicales del mundo en 1987, 1998, 2003, 2005, 2010 y 2015-2016 (Olguín-López et al., 2018). Algunos modelos climáticos predicen que si la emisión de CO<sub>2</sub> continua a la tasa actual, los eventos de blanqueamiento aumentarán en frecuencia y severidad, amenazando seriamente la supervivencia de los arrecifes de coral. Ante este panorama, se ha proyectado que el 90% de los arrecifes de todo el mundo estarán en grave riesgo, si los eventos de blanqueamiento llegaran a presentarse de forma anual (R. A. Hill, 2011; Liu et al., 2018; Takahashi & Murata, 2008).

Con respecto a los mecanismos celulares involucrados en el blanqueamiento, numerosas evidencias indican que una elevación en la temperatura del mar y un aumento en la radiación solar provoca una inhibición del fotosistema II (fotoinhibición) en las algas simbioses, lo cual genera una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que dañan a ambos integrantes de la simbiosis. Los mecanismos propuestos para explicar la fotoinhibición incluyen: a) inhibición en la síntesis del precursor de la proteína D1; b) inactivación de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa y c) daño a las membranas tilacoidales de las algas, lo cual desencadena un proceso de apoptosis en las células del huésped y del hospedero (R. Hill et al., 2014; R. A. Hill, 2011; Liu et al., 2018; Tchernov et al., 2011; Tolleter et al., 2013; Tomanek, 2011). Adicionalmente, se ha observado que durante el blanqueamiento, el aporte de CO<sub>2</sub> a las algas por parte de los cnidarios se ve disminuido, lo que provoca un bloqueo en el transporte de electrones en la fase oscura de la fotosíntesis, desencadenando una generación excesiva de especies reactivas de oxígeno y daño al fotosistema II. El blanqueamiento altera significativamente el equilibrio ecológico de las comunidades arrecifales (Baker et al., 2008; Weis, 2008), y aunque se ha observado que algunas especies de cnidarios que sufren la pérdida de sus simbioses pueden sobrevivir, en otras

especies, el blanqueamiento puede conducir a la muerte masiva. Se ha sugerido que ciertas especies de cnidarios son capaces de enfrentar el estrés térmico, a través de algunos procesos adaptativos que incluyen: aclimatación, adaptación genética y/o intercambio de simbioses (Ainsworth et al., 2008; Krueger et al., 2015; Maor-Landaw & Levy, 2016; Palumbi et al., 2014).

En los últimos años, la incidencia y severidad de los eventos de mortalidad a escala global por estrés térmico han aumentado considerablemente (Kalmus et al., 2022). Los estudios destinados a explicar las consecuencias del estrés térmico en los cnidarios simbióticos solo se han llevado a cabo en especies de Anthozoa, y no hay evidencia precedente sobre los efectos del estrés térmico en organismos del género *Millepora*. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la interrupción de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, provocada por el estrés térmico derivado del calentamiento global, sobre la transcripción de genes implicados en los procesos celulares de supervivencia del “coral de fuego” *M. complanata*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Organismos del Phylum Cnidaria

Los Cnidarios, son organismos marinos pertenecientes al linaje más antiguo de animales venenosos (Avian & Ramšak, 2021; Blackstone & Cartwright, 2021); este Phylum cuenta con aproximadamente 13 000 especies que se distribuyen en diferentes hábitats acuáticos alrededor del mundo (Jouiaei et al., 2015). Los Cnidarios (corales, anémonas, medusas, hidras, entre otros) son un grupo diverso de animales de interés para ecólogos y biólogos del desarrollo evolutivo (Steele et al., 2011). Estos organismos poseen células especializadas en la producción y liberación de toxinas, por lo que se encuentran clasificados como los animales más venenosos del planeta (Frazão et al., 2012). Sin embargo, las toxinas producidas por los Cnidarios no han sido tan ampliamente estudiadas como aquellas de animales terrestres (serpientes, escorpiones y arañas) (Turk & Kem, 2009).

### 2.2. Venenos de los cnidarios

El Phylum Cnidaria se caracteriza por incluir a los animales más venenosos que existen (O'Hara et al., 2021). La composición del veneno de los cnidarios no es conocida a detalle, pero se estima que está constituido de aproximadamente unos 250 compuestos de naturaleza proteica, de los cuales se tienen identificados péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasas. Estos venenos también pueden contener compuestos de naturaleza no proteica, tales como purinas, compuestos cuaternarios de amonio, aminos biogénicos y betaínas. Poco se sabe de los genes que codifican para las toxinas producidas por los cnidarios y solamente se han descrito pocas estructuras proteicas tridimensionales (Frazão et al., 2012). La diversidad de componentes de naturaleza proteica en los venenos de los cnidarios comprende una mezcla compleja de moléculas. Entre los componentes más importantes se encuentran, las proteínas de alto peso molecular, pequeños péptidos y poliaminas, los cuales tienen como finalidad colapsar la fisiología celular de sus presas después de la inyección de sus toxinas (Jouiaei et al., 2015).

### 2.2.1. Enzimas

Las enzimas contenidas en los diferentes venenos de los cnidarios, como anémonas y corales, presentan importantes actividades citolíticas y citotóxicas (Romero et al., 2010). Se ha observado la presencia de estas enzimas en los venenos de *Bunodosoma caissarum* y *Millepora platyphylla* (de Oliveira et al., 2006; Radwan & Aboul-Dahab, 2004). Estas toxinas además pueden presentar algunos otros efectos que incluyen actividad antimicrobiana, antiparasitaria o acción sobre canales iónicos (Dube et al., 2007; Norton et al., 2004; Seleglim et al., 2007). En cnidarios, las toxinas con actividad enzimática se encuentran clasificadas en dos grupos: fosfolipasas A2 y metaloproteasas.

#### 2.2.1.1. Fosfolipasas A2

La actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) ha sido detectada en homogeneizados de los tentáculos de cnidarios pertenecientes a las clases Anthozoa, Scyphozoa, Hydrozoa y Cubozoa (Nevalainen et al., 2004). Esta clase de enzimas hidrolizan el enlace en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos para producir ácidos grasos libres (Frazão et al., 2012). La presencia de PLA2s en los venenos de organismos como reptiles, centípedos, insectos, arácnidos, cnidarios y cefalópodos indica que son componentes esenciales en el arsenal tóxico de estos animales. Las PLA2s en los Cnidarios son importantes para la defensa, la inmovilización y digestión de las presas (Talvinen & Nevalainen, 2002).

#### 2.2.1.2. Metaloproteasas

Las metaloproteasas son componentes importantes de los venenos de animales terrestres como centípedos, serpientes y garrapatas (Fry et al., 2009), estas toxinas causan hemorragia y necrosis por la degradación de la matriz extracelular y la prevención de la formación de coágulos sanguíneos (Fox & Serrano, 2005). Las metaloproteasas han sido detectadas en el veneno de medusas tales como *Stomolophus meleagris* y *Chironex flecheri* (R. Li et al., 2014). Algunas de las



funciones citotóxicas de las metaloproteasas incluyen actividades gelatinolítica, caseinolítica y fibrinolítica (Lee et al., 2011).

### 2.2.2. Toxinas formadoras de poros

Las toxinas formadoras de poro (PFTs) se encuentran en varios de los venenos de los cnidarios. El mecanismo de acción de estas toxinas consiste en la penetración a través de la membrana de la célula blanco, lo que permite la difusión de pequeñas moléculas y solutos, provocando la pérdida del balance osmótico y, por consiguiente, la lisis celular (Rosado et al., 2008). Las toxinas formadoras de poro cuentan con dos tipos de estructuras: 1) una estructura monomérica estable y soluble en agua, que se une a receptores de la célula blanco y 2) estructuras oligoméricas, enlazadas entre sí, que se unen a las membranas para formar poros (Parker & Feil, 2005). Las toxinas formadoras de poros de los cnidarios se clasifican en dos grupos, dependiendo del tipo de estructura que utilizan para poder penetrar la membrana y adquirir la actividad formadora de poro: 1) las  $\alpha$ -PFTs, las cuales poseen varias  $\alpha$ -hélices y forman estructuras de barril y 2) las  $\beta$ -PFTs, las cuales son ricas en láminas  $\beta$  (Črnigoj Kristan et al., 2009; Sher et al., 2005; Šuput, 2009).

#### 2.2.2.1. Toxinas de medusas

Las toxinas secretadas por algunas medusas son de las más potentes y con el mecanismo de acción más rápido (Amreen Nisa et al., 2021). Esta familia de toxinas fue originalmente reportada en la medusa *Carybdea alata* tras la identificación de la toxina CAH1, también conocida como CaTX-A/B, la cual fue caracterizada subsecuentemente en otros cubozoos (Chung et al., 2001; Nagai et al., 2000). A esta familia de toxinas pertenecen: la CrTX-A/B de *Carybdea rastoni*; la CqTX-A de *Chiropsalmus quadrigatus*; la CfTX-1/2 y la ZfTX-A/B/B/bt de *Chironex fleckeri*, entre otras (D. Brinkman & Burnell, 2007; D. L. Brinkman et al., 2014; Nagai et al., 2000, 2002). Además, se han reportado toxinas homólogas a las de los cubozoarios en organismos de las clases Scyphozoa (*Aurelia aurita*), Anthozoa (*Aiptasia pallida*) e Hydrozoa (*Hydra magnipapillata*, *Hydractinia*

*symbiolongicarpus* e *Hydra vulgaris*), lo cual sugiere un origen evolucionario común de estas toxinas (Jouiaei et al., 2015). Las toxinas de medusas, son proteínas básicas con un peso molecular de 40 a 46 kDa y contienen dominios de  $\alpha$ - hélices y láminas  $\beta$ . El mecanismo de acción hipotético de estas toxinas comprende la formación de poros, mediante la oligomerización de  $\alpha$ - hélices anfifílicas e hidrofílicas en la región N-terminal de la toxina, dando como resultado la distorsión de la membrana y la muerte celular (D. L. Brinkman et al., 2014; Nagai et al., 2000).

#### 2.2.2.2. Hidralisinas

Adicionalmente a las otras toxinas formadoras de poro de los cnidarios, se ha descrito una familia de  $\beta$ -PFTs secretada por las células digestivas endodermales de la hidra verde *Chlorohydra viridissima* (M. Zhang et al., 2003). Estas toxinas no derivan de los nematocistos, son secretadas durante la alimentación y juegan un rol importante en la lisis de los tejidos de las presas (Sher et al., 2008). Las hidralisinas no son activas en fosfolípidos o carbohidratos membranales, pero se unen a receptores específicos de membrana para la formación de poros (Sher et al., 2005).

#### 2.2.2.3. Complejo de ataque a la membrana

Este grupo de  $\beta$ -PFTs ha sido detectado en el veneno de las anémonas *Phyllodiscus semoni* y *Actinaria villosa*. Las proteínas que forman el complejo de ataque a la membrana, también han sido identificadas en la vía del complemento, en la respuesta del sistema inmune que involucra a las células T y a las células “natural killer” (NK) (Nagai et al., 2002; Oshiro et al., 2004). Estas proteínas crean un poro transmembranal en la célula blanco e inician distintas rutas de apoptosis celular. En el caso de los cnidarios, estas toxinas son utilizadas para la captura, depredación y defensa (Voskoboinik et al., 2010).

#### 2.2.3. Neurotoxinas

Las neurotoxinas de los cnidarios (toxinas que actúan a nivel de los canales iónicos dependientes de voltaje) son un grupo de péptidos de bajo peso molecular. Han

sido encontradas principalmente en anémonas y tienen un rol fundamental en el veneno para ayudar a estos animales a inmovilizar a su presa rápidamente y para defenderse de los depredadores. De manera general, las neurotoxinas prolongan el potencial de acción en membranas excitables de neuronas, células cardíacas y de músculo esquelético, mediante la modulación de los canales de sodio o bloqueando los canales de potasio durante la repolarización (Castañeda & Harvey, 2009). La acción de las neurotoxinas provoca que las neuronas liberen cantidades masivas de neurotransmisores al espacio sináptico y a la unión neuromuscular, causando espasmos iniciales, seguidos de una parálisis flácida. Las toxinas de anémonas que actúan a nivel de los canales iónicos dependientes de voltaje han sido estudiadas exhaustivamente, ya que representan herramientas farmacológicas valiosas para conocer la estructura y función de los canales de sodio y potasio y también pueden ser usadas para el desarrollo de fármacos y bioinsecticidas (Bosmans & Tytgat, 2007; Chi et al., 2012; Upadhyay et al., 2013; Yan et al., 2014).

### 2.3. Cnidarios del género *Millepora*

Las especies del género *Millepora* son Cnidarios en forma de pólipos coloniales, pertenecientes a la clase Hydrozoa, los cuales, producen esqueletos de carbonato de calcio. Hasta ahora, se conocen 13 especies pertenecientes al género *Millepora*, cuyas colonias se extienden por muchos metros formando un denso bosque de arrecifes coralinos en aguas superficiales de mares tropicales alrededor del mundo. De hecho, con excepción de los corales escleractinios (clase Anthozoa), las especies del género *Millepora* son los Cnidarios más importantes formadores de arrecifes coralinos, y por lo tanto, juegan un rol importante en la ecología marina (Rojas-Molina et al., 2012).

Estos organismos son llamados “corales de fuego” o corales urticantes, debido a que el contacto con ellos causa lesiones similares a quemaduras que producen un dolor severo, erupción y ampollas en la piel (Bianchini et al., 1988; Sagi et al., 1987). Existen reportes de que el contacto con las especies de *Millepora* puede causar

falla renal aguda, síndrome nefrótico y edema pulmonar. Los agentes causales de estas condiciones son toxinas de naturaleza proteica contenidas en los nematocistos (Iguchi et al., 2008).

#### 2.4. Hidrocorales como organismos holobiontes

Los corales e hidrocorales viven en simbiosis con algas fotosintéticas de la familia Symbiodiniaceae, conocidas comúnmente como zooxantelas o simbiosites. Esta simbiosis constituye la base del ecosistema de los arrecifes coralinos, proporcionando el complejo marco estructural que soporta la increíble biodiversidad de estos hábitats, el crecimiento del coral y la calcificación (Knowlton et al., 2010). La simbiosis Cnidario-*Symbiodinium* es esencial para la formación de importantes estructuras en los arrecifes de coral (Fransolet et al., 2012). La evolución de esta asociación les ha permitido a los corales e hidrocorales prosperar en ambientes marinos oligotróficos tropicales, donde el alimento y los nutrientes son generalmente escasos. Las algas, mediante la fotosíntesis, proporcionan a los cnidarios una fuente de energía metabólica. Además, la fotosíntesis efectuada por los simbiosites, promueve el proceso de calcificación, mediante el suministro de precursores de la matriz orgánica del esqueleto y por el almacenamiento de protones, producido durante la precipitación del esqueleto de carbonato de calcio de los corales (Moya et al., 2006). Las zooxantelas se alojan en la capa gastrodémica de los cnidarios, en tanto que las células del ectodermo están involucradas en el intercambio de compuestos con el ambiente externo y la formación del esqueleto del coral. Bajo condiciones normales, la densidad de población de simbiosites oscila entre los 0.5 a  $5 \times 10^6$  células por  $\text{cm}^2$  de superficie de coral (Yellowlees et al., 2008).

Las algas de la familia Symbiodiniaceae son adquiridas por las células gastrodermales del Cnidario, vía fagocitosis, favoreciéndose la formación de un compartimiento intracelular cerrado y delimitado por una membrana, conocido como "simbiosoma" (Roth, 2014). El hospedante proporciona la membrana que formará

parte del simbiosoma, el cual sufre un proceso de maduración y a su vez, el alga desarrolla un complejo membranal a través del cual interactúa con el hospedante. Debido a su localización intracelular, las zooxantelas suministran carbono inorgánico disuelto y nutrientes para el crecimiento de los cnidarios, todo esto transportado a través de múltiples membranas que permiten el intercambio (Barott et al., 2015).

Las algas simbiontes proporcionan más del 95 % de los requerimientos energéticos de los corales, a cambio, éstas tienen acceso directo a los productos de desecho derivados del metabolismo del hospedante, como por ejemplo bióxido de carbono y nitrógeno inorgánico (Muller-Parker et al., 2015; Venn et al., 2008). Los simbiontes son capaces de transportar el oxígeno molecular a los corales y la mayoría de la transformación química del carbono se realiza por medio de la fotosíntesis, generando compuestos orgánicos como glicerol, glucosa, aminoácidos y lípidos; adicionalmente, el oxígeno producido por las reacciones fotosintéticas ayuda a mantener los niveles de ATP necesarios para el proceso de calcificación (Fransolet et al., 2012). Por otra parte, los cnidarios les proveen a sus simbiontes nitrógeno inorgánico, fósforo, así como refugio y protección de los herbívoros (Venn et al., 2008; Yellowlees et al., 2008).

Además de la relación simbiótica con algas de la familia Symbiodiniaceae, tanto corales como hidrocorales se asocian con otras comunidades de microorganismos, principalmente bacterias, constituyendo una sola entidad biológica conocida como holobionte. Las interacciones entre corales y los microorganismos favorecen la salud de estos organismos y son esenciales para la función del arrecife, la supervivencia y la conservación (Tran, 2022). Poco se sabe de las interacciones específicas que pueden existir entre las algas de la familia Symbiodiniaceae y los microorganismos dentro de un coral hospedante. Sin embargo, se ha hipotetizado que los huéspedes, pueden tener roles esenciales implicados en la salud, la aclimatación, la adaptabilidad, y la supervivencia durante condiciones

homesotáticas o adversas (Garrido et al., 2021). De manera particular, se sabe que el microbioma de algunos corales es benéfico para mantener la salud del holobionte, ya que estos microorganismos están involucrados en el metabolismo de los nutrientes y en la formación del sistema inmune. Algunas estrategias novedosas proponen la manipulación de los consorcios de microorganismos con la finalidad de mejorar la respuesta ante condiciones ambientales desfavorables (Zhang et al., 2021).

## 2.5. Blanqueamiento de arrecifes coralinos

Desde el punto de vista ecológico, los hidrocorales contribuyen con la estructura de los arrecifes coralinos y proveen en sus ramas protección para otras especies. Las colonias individuales de *Millepora* son de crecimiento rápido, las puntas blancas en sus ramas indican la presencia de pocas algas simbiotas. El fenómeno de blanqueamiento se refiere al efecto visual relacionado con la disminución de las poblaciones de simbiotas o con la reducción de los pigmentos fotosintéticos de las algas (Hoegh-Guldberg, 1999; Lesser, 2006, 2011). Esta disminución de zooxantelas es generada por diversos estresores ambientales (acidificación del océano, elevación en la salinidad, aumento en la radiación UV y aumento en la temperatura de la superficie del océano), los cuales desencadenan la ruptura de la simbiosis mutualista cnidario-alga (Anthony et al., 2008; Fitt et al., 2001; Gleason & Wellington, 1993; Glynn & D’Croz, 1990). Se ha observado que el principal detonante de este fenómeno es la elevación en la temperatura superficial del océano. El aumento en la frecuencia y severidad de los eventos de blanqueamiento masivo alrededor del mundo ha comprometido las poblaciones de hidrocorales durante los últimos 30 años, dejándolos susceptibles. *M. alcicornis* y *M. complanata* fueron las primeras especies en exhibir blanqueamiento en la región del Caribe (Fitt, 2012).

El blanqueamiento, generalmente produce la disminución del crecimiento y el incremento de la mortalidad de los cnidarios, además, puede ser considerado como

una respuesta fisiológica deletérea o de enfermedad. El fenómeno de blanqueamiento comprende tres elementos principales: los factores externos o detonantes, por ejemplo, la elevada temperatura; los síntomas, que incluyen la eliminación de las células de las algas simbiotas y la pérdida de los pigmentos fotosintéticos; y finalmente, el mecanismo que genera el blanqueamiento, que da como resultado la presentación de los síntomas (Ainsworth & Brown, 2021). El grado de blanqueamiento observado en diferentes simbiosis y en respuesta a diferentes detonantes implica mecanismos de respuesta celular bastante complejos (Douglas, 2003).

El blanqueamiento puede ocurrir debido a que los hábitats marinos costeros están expuestos una amplia gama de alteraciones, que incluyen tormentas, precipitación y escorrentía terrestre, enfermedades, brotes de equinodermos depredadores, contaminación, estrés antropogénico, erosión, sedimentación, variación de la salinidad, infecciones bacterianas, exposición durante la marea baja, radiación solar (incluida la radiación ultravioleta) y la elevación de la temperatura de la superficie del mar debido al cambio climático global, que es el más importante factor entre todos (Douglas, 2003; Hume et al., 2013; Wilson et al., 2006). Se ha considerado que el blanqueamiento representa un medio de control para minimizar el daño fisiológico, ocasionado por el desequilibrio metabólico producido por el estrés (Obura, 2009) (Obura, 2009) y numerosos estudios sugieren que el principal mecanismo por el cual se genera el blanqueamiento es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en especial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hume et al., 2013).

Ante elevadas temperaturas, alta irradiación y condiciones de estrés se produce fotoinhibición (R. Hill et al., 2014; Muller-Parker et al., 2015), daño en los cloroplastos y en el sistema fotosintético de los simbiotas, en al menos tres niveles: 1) Proteína D1, componente importante del fotosistema I (PSI), que consta de cinco hélices transmembranales y que está implicada en la fotólisis del agua (R. Hill & Ralph, 2007; Tolleter et al., 2013); 2) RuBisCO, la enzima ribulosa-1,5-

bisfosfato carboxilasa oxigenasa, que cataliza dos procesos opuestos: la fijación del CO<sub>2</sub> a una forma orgánica y como oxigenasa del mismo sustrato (Maor-Landaw & Levy, 2016; Raina et al., 2015); 3) membranas tilacoides, en las cuales durante el blanqueamiento se origina un desacoplamiento energético del transporte de electrones en los dos fotosistemas (I y II), por lo cual se continúan generando electrones, pero se deja de producir ATP y NADP (Seneca & Palumbi, 2015). El exceso de electrones producido reduce O<sub>2</sub> en lugar de NADP y produce el ion superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que puede ser reducido por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que es menos reactivo, pero aún perjudicial y más estable. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede reaccionar con hierro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) para formar una especie aún más reactiva, el radical hidroxilo (-OH). Además, el exceso de electrones puede reaccionar fotoquímicamente con pigmentos y O<sub>2</sub> para generar en última instancia, oxígeno atómico altamente reactivo (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Jokiel & Coles, 1990; Tomanek, 2011). El estrés oxidativo implicado en la producción y acumulación de ROS resulta principalmente en el daño a estructuras esenciales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN (Baird et al., 2009; Weis, 2008); de la misma manera el daño generado por ROS juega un papel importante en la traducción de señales implicados en apoptosis, autofagia y necrosis (R. Hill et al., 2014; Lilley et al., 2010; Yellowlees et al., 2008).

## 2.6. Estudios previo de organismos del género *Millepora*

Existen algunos reportes relacionados con el aislamiento y la caracterización de componentes tóxicos de los extractos crudos de los corales de fuego. Por ejemplo, se ha reportado que los extractos crudos de *M. alcicornis* (Wittle et al., 1971, 1974) y *M. tenera* (Middlebrook et al., 1971) tienen propiedades hemolíticas y dermonecróticas e inducen letalidad en ratones. En el caso particular de *M. complanata*, nuestro grupo de trabajo encontró que el extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral contiene una proteína de 30 kDa con efecto hemolítico y actividad de PLA2 y dos proteínas de 15 y 17 kDa, respectivamente que inducen vasoconstricción en aorta aislada de rata (Ibarra-Alvarado et al., 2007). También se



detectó la presencia de proteínas con un rango de peso molecular de 17 a 44 kDa y péptidos pequeños de menos de 1.8 kDa que estimulan las contracciones del íleon aislado de cobayo, mediante un mecanismo que involucra la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la células del músculo liso intestinal (Rojas et al., 2002). Adicionalmente, se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata*, administrado por vía intravenosa, induce violentas convulsiones y la muerte en ratones en menos de un minuto, con una dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) de 4.62  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso. Se encontró también que dosis menores a la  $\text{DL}_{50}$  produjeron daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociados con la presencia de citolisinas. El análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* permitió la purificación de una proteína de 61 kDa con efecto vasoconstrictor. Adicionalmente, se detectó la presencia de compuestos vasoconstrictores de naturaleza no proteica (García-Arredondo et al., 2015). Por otra parte, el extracto acuoso de *M. alvicornis* fue letal para los ratones con una  $\text{DL}_{50} = 17 \mu\text{g}$  proteína/g e indujo daños histopatológicos en riñones, hígado y pulmones. Se evidenció también que este extracto contiene dos tipos de hemolisinas, unas de éstas tienen pesos moleculares entre 28 y 30 kDa y poseen actividad de PLA2. En tanto que otras, de aproximadamente 200 kDa, no presentan actividad de PLA2 (Hernández-Matehuala et al., 2015).

Adicionalmente, experimentos preliminares, llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, indican que la pérdida de algas fotosintéticas simbiotas provocada por un aumento en la temperatura del agua, disminuye, pero no inhibe completamente, la hemólisis y la actividad de PLA2 inducidas por el extracto acuoso de *M. complanata* (García-Arredondo et al., 2011). Estos resultados sugieren que posiblemente estas especies de cnidarios, que desde hace tiempo han sido expuestas a incrementos térmicos provocados por el calentamiento global de la tierra, han empezado a desarrollar mecanismos bioquímicos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales de su entorno. Sin embargo, este hecho tiene que confirmarse y comprobarse con más investigación al respecto.

## 2.7. Estudio del blanqueamiento en la era de las “ómicas”

En los últimos veinte años, el estudio de los sistemas moleculares y celulares se ha transformado radicalmente gracias al desarrollo de las ciencias ómicas (Boja et al., 2014). La información obtenida a partir de los estudios ómicos ha permitido abordar los procesos de la biología celular y molecular de forma integral, con lo cual ha sido posible profundizar en el entendimiento de los sistemas biológicos complejos (Joyce & Palsson, 2006). Los recientes avances tecnológicos e informáticos han sido aprovechados para generar y procesar grandes cantidades de información derivada de estudios biológicos (Manzoni et al., 2018). El blanqueamiento se ha estudiado, mediante técnicas genómicas y transcriptómicas, a fin de determinar cambios en la expresión de genes y transcritos durante el estrés térmico en algunas especies de la clase Anthozoa: *Acropora nana*, *Stylophora pistillata*, *Acropora euristoma*, *Acropora millepora*, *Aiptasia pallida*, *Orbicella faveolata*, *Acropora hyacinthus*, *Protolpalythoa varibilis* y *Palythoa caribaeorum* (Manzoni et al., 2018; Maor-Landaw & Levy, 2016; Pinzón et al., 2015; Raina et al., 2015; Seneca & Palumbi, 2015; Sloan & Sawyer, 2016). Dichos estudios han revelado que el blanqueamiento provoca un patrón diferencial en la expresión de genes de diversos procesos celulares, entre los que se incluyen: respuesta a estrés oxidativo, homeostasis de  $Ca^{2+}$ , organización del citoesqueleto, muerte celular, síntesis de proteínas, proteínas de choque térmico, respuesta inmune y metabolismo (Maor-Landaw & Levy, 2016; Raina et al., 2015).

Técnicas globales como la proteómica también se han empleado para evaluar el efecto del estrés térmico y el blanqueamiento en organismos marinos, los resultados derivados de dichos estudios han mostrado que el estrés térmico y el blanqueamiento inducen cambios significativos en la expresión de proteínas relacionadas con respuesta a estrés, síntesis y plegamiento de proteínas, homeostasis redox, factores de transcripción, respuesta inmune, proteínas de choque térmico, calcificación, organización del citoesqueleto, apoptosis, endo-exofagocitosis y metabolismo central (Petrou et al., 2021; Jaimes-Becerra et al., 2017; Mayfield et al., 2018; Ricaurte et al., 2016; Weston et al., 2015). En un

estudio proteómico realizados por nuestro grupo de investigación, observamos una expresión diferencial de 17 proteínas por efecto del estrés térmico en el proteoma soluble de *M. alcicornis*, las cuales se relacionaron con procesos tales como la exocitosis, la homeostasis del calcio, la organización del citoesqueleto y algunas de ellas fueron detectadas como toxinas potenciales, incluidas una metaloproteasa, una PLA2 y una actitoxina (Olguín-López et al., 2018). En otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, observamos una respuesta proteómica diferencial en organismos blanqueados de *M. complanata*, que involucraron proteínas implicadas en procesos celulares clave, como la glucólisis, la reparación del ADN, la respuesta al estrés, la homeostasis del calcio, la exocitosis y la organización del citoesqueleto. Además, cuatro de las proteínas, cuyos niveles aumentaron en las muestras blanqueadas, mostraron similitud de secuencia con una PLA2, una metaloproteasa similar a la astacina y dos toxinas formadoras de poros. Por otro lado, una proteína, que mostró similitud de secuencia con una fosfolipasa A2 independiente del calcio, mostró niveles más bajos en condiciones de blanqueamiento (Hernández-Elizarraga et al., 2019).

## 2.8. La transcriptómica como herramienta de investigación para el estudio del blanqueamiento

En los últimos años, las altas tasas de mortalidad de los arrecifes de coral en todo el mundo han provocado un rápido deterioro de las estructuras de los arrecifes y un impacto ambiental de gran alcance (Eakin et al., 2019). Numerosos estudios científicos destinados a comprender la etiología y los efectos del blanqueamiento de corales se han llevado a cabo empleando enfoques de transcriptómica, que han demostrado que el estrés térmico induce la expresión diferencial de genes que codifican diferentes componentes celulares y diversos procesos moleculares. Estudios similares llevados a cabo en cnidarios que no forman arrecifes también han proporcionado información clave sobre las respuestas de estos organismos

ante el estrés térmico. Un estudio realizado en la anémona de mar *Anthopleura elegantissima*, expuesta a estrés térmico y alta radiación UV, evidenció una expresión diferencial de genes que codifican proteínas del citoesqueleto y proteínas asociadas a la biosíntesis, proliferación celular, apoptosis y transporte (Richier et al., 2008). Por otro lado, la exposición al estrés por calor provocó un aumento en la expresión de transcritos relacionados con las vías de señalización de la muerte celular y la homeostasis del calcio en *Anemonia viridis* (Moya et al., 2012).

Con respecto a los estudios realizados en cnidarios formadores de arrecifes, un análisis de microarreglos de ADNc mostró genes expresados diferencialmente relacionados con el estrés oxidativo, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , la organización del citoesqueleto, la muerte celular, la calcificación, el metabolismo, la síntesis de proteínas, las proteínas de choque térmico y la actividad de transposones en el coral caribeño *Montastraea faveolata* sometido a estrés por calor experimental (DeSalvo et al., 2008). Una investigación del efecto del estrés térmico en *Acropora palmata* reveló modificaciones en la expresión de genes relacionados con la detención del crecimiento, actividad chaperona, estabilización de ácidos nucleicos y eliminación de macromoléculas dañadas (DeSalvo et al., 2008). Algunos estudios transcriptómicos han proporcionado información relevante sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia al calor exhibida por ciertas especies de coral. Un experimento de RNA-Seq indicó una regulación ascendente constitutiva de los genes que codifican las enzimas de la gluconeogénesis como la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en especímenes de *Porites astreoides* que vivían en áreas costeras cálidas (Kenkel et al., 2013). En otra investigación, basada en RNA-Seq, de colonias blanqueadas y sin blanquear de *Obicella faveolata* se identificaron varios genes expresados diferencialmente, los cuales estaban relacionados con la inmunidad innata (Anderson et al., 2016). Curiosamente, algunas especies del mar Rojo como *Stylophora pistillata* y del Mediterráneo como *Balanophyllia europaea*, sometidas a un aumento gradual de la temperatura a largo plazo, mostraron una regulación ascendente masiva de genes implicados en la generación de energía metabólica, lo que indica un

comportamiento altamente dinámico como respuesta al estrés térmico (Maor-Landaw et al., 2017). Thomas y colaboradores (2019) evaluaron el impacto de eventos repetidos de blanqueamiento en dos especies de *Acropora* sensibles al calor (*Acropora gemmifera* y *Acropora hyacinthus*) que viven en arrecifes ubicados en la costa sur de Samoa Americana. Al examinar los cambios del transcriptoma en la expresión génica, descubrieron que la recuperación de los eventos recurrentes de blanqueamiento comprende diversos procesos fisiológicos y que se asocian con el recambio de los simbiontes (Thomas et al., 2019).

Con el paso de los años se ha profundizado el entendimiento blanqueamiento de corales, y particularmente la transcriptómica ha ganado terreno siendo una metodologías que más información ha generado para tratar de comprender los mecanismos de respuesta implicados durante este fenómeno. A pesar de que ya son varios los estudios con enfoque transcriptómico, no se ha observado un patron claramente definido para respuesta celular asociada al blanqueamiento durante el estrés térmico, al menos entre especies de la clase Anthozoa. De manera general cada especie formadora de arrecifes se ve afectada de manera diferente ante el calentamiento global y el estrés térmico. En el Cuadro 1 muestra un breve resumen de estudios transcriptómicos recientes encaminados a comprender los efectos del estrés térmico y el blanqueamiento, ya sea derivados del calentamiento global o de forma experimental.

**Cuadro 1.** Estudios recientes del estudio del blanqueamiento con enfoque transcriptómico

Organismo	Condición	Respuesta generalizada	Referencia
<i>Pavona decussata</i>	Blanqueamiento <i>in situ</i>	Supresión del metabolismo y activación de la respuesta inmune	Zhang et al., 2022
<i>Pocillopora spp.</i>	Blanqueamiento experimental	Inducción de receptores del factor de necrosis tumoral, proteínas de choque térmico. Disminución de funciones morfo-anatómicas	Brener-Raffalli et al., 2022

<i>Stylophora pistillata</i>	Blanqueamiento experimental a corto y largo plazo	Activación de la respuesta al estrés y antioxidante. Disminución de procesos del desarrollo	Savary et al., 2021
<i>Montastraea cavernosa</i>	Blanqueamiento <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	Aumento en las vías de crecimiento celular y producción/modificación de proteínas. Disminución de vías del sistema inmune	Studivan et al., 2021
<i>Anomastreaa irregularis</i>	Blanqueamiento experimental	Incremento en la apoptosis y modificaciones en el metabolismo, síntesis de proteínas, citoesqueleto y transporte.	Onyango et al., 2021
<i>Montipora capitata</i>	Blanqueamiento experimental	Supresión en el transporte de metabolitos	Williams et al., 2011
<i>Stylophora pistillata</i>	Blanqueamiento experimental a corto plazo	Modificación en la expresión de genes relacionados con apoptosis, transportadores, oxidoreductasas, metaloproteasas, etc.	Voolstra et al., 2021
<i>Pocillopora damicornis</i>	Blanqueamiento experimental	Regulation al alza de la apoptosis, la exocitosis y la autofagia	Li et al., 2021
<i>Stylophora pistillata</i>	Blanqueamiento <i>in situ</i>	Expresión diferenciada de genes de estrés térmico y metabolismo	Rädecker et al., 2021

Evidentemente, los estudios de expresión génica del transcriptoma han permitido una comprensión mucho más profunda de la complejidad de la respuesta al estrés del holobionte (González-Pech et al., 2017; Kaniewska et al., 2015; Mayfield et al., 2014). La gran mayoría de las investigaciones destinadas a evaluar la influencia del estrés por calor en los procesos celulares de los cnidarios formadores de arrecifes se han centrado en las especies de Anthozoa, y hasta la fecha se sabe muy poco sobre la respuesta celular de las especies de Hydrozoa frente al estrés térmico. Particularmente, ningún estudio transcriptómico previo ha abordado el impacto del aumento de la temperatura del océano en la respuesta celular de los hidrocorales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las diferencias observadas a nivel transcriptómico entre los holobiontes blanqueados y no blanqueados de *Millepora complanata* que estuvieron expuestos a la Oscilación del Sur de "El Niño" 2015-2016 en el Caribe Mexicano.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*M. complanata* (Phylum Cnidaria, clase Hydrozoa) es un hidrocoral ampliamente distribuido en el Caribe Mexicano. Las colonias de *M. complanata* crecen principalmente en las crestas arrecifales y absorben la mayor parte del oleaje, de este modo permiten el establecimiento de las comunidades de especies marinas. Al igual que muchos otros cnidarios, *M. complanata* tiene la capacidad de sintetizar potentes toxinas, que utiliza para la captura de presas y defensa. La administración intravenosa del extracto acuoso de *M. complanata* ha mostrado efectos letales y daños sistémicos en ratones con una DL50 de 4.62 µg de proteína/g de peso corporal (García-Arredondo et al., 2015), lo cual pone en evidencia que este hidrocoral constituye una fuente potencial valiosa de nuevas moléculas bioactivas con interés farmacológico. A la fecha se desconoce la estructura química y el mecanismo de acción de las toxinas proteicas sintetizadas por este organismo. Por otra parte, *M. complanata* es un hidrocoral susceptible al blanqueamiento, este fenómeno deletéreo amenaza la supervivencia de los arrecifes de coral en todo el mundo. El blanqueamiento de arrecifes ha sido estudiado desde diferentes enfoques, por ejemplo, mediante transcriptómica se ha evidenciado, que el blanqueamiento asociado a estrés térmico en *Montrastreae faveolata* causa disrupción en la homeostasis del calcio, lo que conlleva a cambios en la estructura del citoesqueleto, además, disminuye la calcificación y conduce a la muerte celular vía apoptosis y necrosis (DeSalvo et al., 2008). Mediante el empleo de enfoques transcriptómicos, también se ha reportado que el blanqueamiento provocado por estrés térmico en *Acropora palmata* modifica la expresión de genes relacionados con procesos de estrés celular (DeSalvo et al., 2010), además, en *Orbicella faveolata* se ha observado la supresión de genes relacionados con el sistema inmune durante y después de episodios de blanqueamiento (Pinzón et al., 2015). En la anemona simbiótica *Anemonia viridis*, se ha observado que la principal respuesta ocasionada por el blanqueamiento inducido por estrés térmico y aumento en la radiación ultravioleta es la activación de genes relacionados con muerte celular y la homeostasis del calcio (Moya et al., 2012). A la fecha, todos los estudios

encaminados a comprender la etiología del blanqueamiento han sido realizados en organismos de la clase Anthozoa, y ninguno ha comprendido a miembros de la clase Hydrozoa. Adicionalmente, se desconoce el efecto del blanqueamiento provocado por el calentamiento global, sobre la expresión de genes de hidrocorales formadores de arrecifes. En este contexto, se plantea el presente proyecto de investigación que involucra la realización de un estudio transcriptómico diferencial, a fin de conocer el efecto del estrés térmico sobre la transcripción de genes relacionados con los procesos celulares de supervivencia del hidrocoral *M. complanata*. Los resultados obtenidos en esta investigación contribuirán a ampliar el conocimiento acerca de las consecuencias del calentamiento global en los cnidarios constructores de arrecifes y permitirán proponer estrategias encaminadas a prevenir y/o revertir el blanqueamiento.



#### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del estrés térmico, provocado por el calentamiento global, sobre la transcripción de genes involucrados en los procesos celulares de supervivencia del “coral de fuego” *M. complanata*?

## 5. HIPÓTESIS

La interrupción de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, provocada por el estrés térmico derivado del calentamiento global, modifica la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en procesos celulares, tales como el metabolismo primario, la exocitosis, la homeostasis redox, la respuesta al estrés, la homeostasis de calcio, la biosíntesis de toxinas, la reparación de ADN y mecanismos de señalización celular en el holobionte *Millepora complanata*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la interrupción de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, provocada por el estrés térmico derivado del calentamiento global, sobre la transcripción de genes implicados en los procesos celulares de supervivencia del “coral de fuego” *M. complanata*.

### 6.2. Objetivos específicos

- I. Obtener, a partir de poblaciones no clonales, especímenes en condiciones normales y de blanqueamiento del holobionte *Millepora complanata* después del evento de “El Niño” 2015-2016.
- II. Determinar el nivel de blanqueamiento de *M. complanata*, mediante la cuantificación de clorofilas totales.
- III. Analizar el metatranscriptoma y asignar la anotación funcional de transcritos obtenidos de especímenes de *M. complanata*.
- IV. Identificar los genes cuya transcripción se modificó por efecto del estrés térmico, mediante un análisis transcriptómico diferencial.
- V. Proponer un mecanismo sobre los efectos de la expresión diferencial de genes causados por el estrés térmico sobre los procesos de supervivencia de *M. complanata*.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Consideraciones éticas

Este trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (Número de oficio CBQ19/058). La recolección de especímenes del hidrocoral *M. complanata* fue autorizada por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México (SEMARNAT) (Número de permiso PFP-DGOPA-139/15).

### 7.2. Recolección de especímenes

Especímenes normales y blanqueados del hidrocoral *M. complanata* fueron recolectados en el Parque Nacional arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México (21 00'00" y 20 48'33" latitud Norte y 86 46'38.94" latitud Oeste) en Noviembre del 2016 después de la oscilación sureña El Niño 2015-2016. En total, veinte muestras con un área de 25 cm<sup>2</sup> fueron recolectadas de los bordes de colonias blanqueadas y normales localizadas a aproximadamente 5 metros de profundidad. Cada fragmento, ya sea normal o blanqueado, fue muestreado de diferentes colonias. Los especímenes fueron preservados inmediatamente después de la recolección en nitrógeno líquido.

### 7.3. Cuantificación de clorofilas totales

Para determinar el grado de blanqueamiento en las muestras de *M. complanata*, el contenido de clorofila total se cuantificó mediante un método espectroscópico usando un equipo SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter (Tierranegra-García et al., 2011). En breve, capas superficiales del hidrocoral de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup> y 2 mm de grosor fueron obtenidas con un esmeril y un disco de corte diamantado. Posteriormente, estas capas superiores fueron analizadas con el equipo SPAD 502 y la concentración de clorofila total fue expresada en µmol/m<sup>2</sup>. La diferencia entre los contenidos de clorofilas se evaluó con una prueba T de Student ( $p < 0.05$ ).

### 7.4. Remoción del tejido del exoesqueleto

Durante la obtención del tejido de los hidrocorales, los fragmentos de *M. complanata* fueron manipulados a temperatura de ultra-congelación usando nitrógeno líquido en todo momento. A cada fragmento, sujetado con pinzas quirúrgicas estériles, se agregó 1 mL de solución amortiguadora de extracción, el cual fue distribuido uniformemente sobre el tejido. Dependiendo del método, las soluciones de extracción fueron modificadas para obtener ADN o ARN. El tejido fue desprendido del exoesqueleto de CaCO<sub>3</sub> mediante movimientos circulares usando un grabador de vidrio marca DREMEL (tensión 127 V, frecuencia 60 Hz, intensidad absorbida 0.1A). Cada fragmento de hidrocoral se pesó antes y después de este procedimiento. Adicionalmente, el tejido obtenido fue pesado y empleado para realizar las extracciones de las biomoléculas correspondientes.

#### 7.5.Extraction de ADN

El ADN se aisló de tres muestras de hidrocoral normales y blanqueadas (triplicado biológico) usando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Dellacorte, 1994). En resumen, los fragmentos fueron pulverizados con mortero y pistilo usando nitrógeno líquido y 1 mL de buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 0.2 M, and Tris-HCl 0.1 M pH 8.8). Posteriormente, se agregaron 500 µL de cloroformo isoamílico (24:1). Las muestras de ADN se precipitaron con buffer de acetato de sodio 4 M y se resuspendieron en agua destilada esteril.

#### 7.6.Identificación de los genotipos de los simbioses

Los genotipos de Symbiodiniaceae se determinaron mediante primers específicos para las amplificaciones de PCR de acuerdo con el método de identificación de simbioses propuesto por Correa y Mieog (Correa et al., 2009; Mieog et al., 2007). Los primers empleados para la identificación de los simbioses se muestran en el Cuadro 2. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 20 µL con 7.5 µL de agua estéril, 2 µL de buffer Taq 10X con KCl, 1.5 µL de MgCl 25 mM, 2 µL de ADN, 2.5 µL de los correspondientes primers sentido y antisentido y 0.5 U/µL de

polimerasa Taq. Las reacciones de la polimerasa se llevaron a cabo en un termociclador T100 de Biorad bajo las siguientes condiciones: paso 1, 95 °C por 10 min; paso 2, 95 °C durante 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C 30s (35 ciclos); paso 3, 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación fueron enviados al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) para la secuenciación de las muestras de ADN con un equipo Genetic Analyzer 3130 de Applied Biosystems. La amplificación de los marcadores de ADNr de interés fue confirmada con el alineamiento de las secuencias contra la base de datos (no redundante) del NCBI (accesado el 29 de Mayo del 2019) usando Blastn (a value de  $1 \times 10^{-6}$ ). Las secuencias de ADNr asignadas a la familia Symbiodiniaceae fueron empleadas para realizar un análisis filogenético (inferencia de árbol de unión de vecinos) de los simbiontes detectados en *M. complanata* y otras secuencias de simbiontes depositadas en el GenBank.

**Cuadro 2.** Primers empleados para la identificación de los genotipos de simbiontes.

Género	Blanco	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
<i>Symbiodinium</i>	ITS2	CCTCTTGGACCTTCCACAAC	GCATGCAGCAAACTGCTC
<i>Breviolum</i>	LSU-28S	GTCTTTGTGAGCCTTGAGC	GCACACTAACAAGTGTACCATG
<i>Cladocopium</i>	ITS1	AAGGAGAAGTCGTAACAAGGT TTCC	AAGCATCCCTCACAGCCAAA
<i>Durusdinium</i>	ITS1	AAGGAGAAGTCGTAACAAGGT TTCC	CACCGTAGTGGTTCACGTGTAA TAG

### 7.7. Aislamiento del ARN

En total, ocho métodos de extracción diferentes fueron evaluados con la finalidad de determinar un protocolo óptimo de aislamiento de ARN de alta calidad. La cantidad de tejido de *M. complanata* utilizado para las extracciones fue de 0.1 g. Cada extracción se realizó en tres réplicas biológicas. A continuación se describen los procedimientos evaluados en este trabajo para la obtención de del ARN.

### 7.7.1.Método 1: Extracción con Trizol

La extracción de ARN usando el método de trizol se llevó a cabo de acuerdo con la metodología previamente descrita por Anderson en el 2016 (Anderson et al., 2016). Brevemente, 1 mL de reactivo de Trizol fue agregado a cada una de las muestras de tejido de hidrocoral, las cuales fueron mezcladas durante 1 min usando un mezclador Vortex. Subsecuentemente, las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min. Después de la centrifugación, la fase superior fue transferida a un nuevo tubo y 200  $\mu$ L de cloroformo fueron añadidos. Las mezclas fueron agitadas suavemente e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Para la precipitación del ARN, los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 15 min, y las fases superiores resultantes se transfirieron a un tubo nuevo y se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol. Las muestras se almacenaron 24 h a 4 °C. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 15 min y el ARN extraído se lavó con 500 mL de etanol al 70%.

### 7.7.2.Método 2: Extracción con Trizol y precipitación con LiCl

El ARN total fue obtenido de las muestras de los hidrocorales usando un método de Trizol modificado (Kitchen et al., 2015). Las muestras de tejido fueron mezcladas con el reactivo de Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante y el método estándar de trizol fue utilizado. Un lavado del ARN usando etanol al 70% fue adicionado a esta metodología. Las muestras fueron incubadas 24 h a 4 °C con 500  $\mu$ L de LiCl 4M. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min y el ARN resultante fue resuspendido en agua estéril.

### 7.7.3.Método 3: Extracción con Trizol y purificación con columnas de afinidad

El ARN de los hidrocorales se obtuvo mediante un método anteriormente descrito para *Danio rerio* (Shontz et al., 2018). El ARN se extrajo con 500  $\mu$ L del reactivo Trizol según las indicaciones del fabricante. Después de la extracción y

precipitación, las pastillas de ARN fueron disueltas en 100  $\mu$ L de agua libre de RNasas y purificadas con columnas de afinidad Quick-RNA microprep del kit Zymo Kit (Zymo Research, CA, USA, número de catálogo: R1054 & R1055) siguiendo las instrucciones del fabricante. También, con la finalidad de remover el DNA contaminante, se realizó un tratamiento de DNasa en la columna de acuerdo con las instrucciones del protocolo del kit Zymo Kit.

#### 7.7.4. Método 4: Extracción con ácido bórico

El método de aislamiento de ARN descrito para el fruto de *Opuntia ficus* fue empleado con algunas modificaciones (Valderrama-Cháirez et al., 2002). En breve, los tejidos de los hidrocorales fueron mezclados con 1 mL de solución amortiguadora de extracción (Tris base 150 mM, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 1%, EDTA 100 mM y pH 7.5 con ácido bórico saturado). Posteriormente, 100  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M, 250  $\mu$ L de etanol absoluto y 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) fueron agregados y mezclados durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min, se lavaron con etanol al 70% y se resuspendieron en agua estéril.

#### 7.7.5. Método 5: Extracción con ácido bórico modificada

Siguiendo el método reportado previamente por Valderrama-Cháirez, el ARN fue aislado de las muestras de hidrocorales con algunas modificaciones (Valderrama-Cháirez et al., 2002). En resumen, cada muestra se procesó con una solución de extracción modificada, la cual contenía Tris base 150 mM, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 1% y EDTA 100 mM (saturado con ácido bórico y cloruro de sodio). Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M, 250  $\mu$ L de etanol absoluto y 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min y la capa superior fue transferida a un nuevo tubo con 500  $\mu$ L de LiCl 8 M. El ARN fue precipitado y centrifugado a 12,000 rpm por 10 min, se lavó con 250  $\mu$ L de etanol al 70% y se resuspendió en agua estéril.



#### 7.7.6.Método 6: Extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio

Un método rápido de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) previamente descrito por Dellacorte fue empleado para obtener el ARN (Dellacorte, 1994). Las muestras de tejido de hidrocoral se mezclaron con 900 µL de solución amortiguadora de extracción (CTAB 2%, PVP-40 2%, NaCl 2 M, EDTA 2.5 mM, 2-mercaptoetanol 2%, Tris-HCl 0.1 M pH 8). Un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) fue agregado a la mezcla. Después, las muestras fueron mezcladas y centrifugadas a 12,000 rpm durante 10 min. La fase superior fue colocada en un tubo nuevo y se realizaron tres particiones usando un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). El ARN se precipitó con etanol al 70% y se resuspendió en agua estéril.

#### 7.7.7.Método 7: Extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio y precipitación con LiCl

El ARN se aisló de las muestras de hidrocócorales usando el mismo método rápido de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito en la sección anterior con algunas modificaciones. Al final del procedimiento de extracción, el ARN se precipitó durante 30 min usando una concentración final de LiCl 3M. Por último, se obtuvo una pastilla de ARN mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 20 min, la cual fue lavada con etanol al 70% y resuspendida en agua estéril.

#### 7.7.8.Método 8: Kit de extracción RNeasy Mini Kit

El RNA fue obtenido de los tejidos de las muestras empleando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, NV, DEU, información del catálogo: RNeasy Mini Kit 250) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En breve, un volumen de etanol al 70% se agregó al tejido previamente lisado y se mezcló suavemente con pipeteo. Las mezclas fueron transferidas a una columna RNeasy Mini Spin y centrifugadas a 12,000 rpm durante 15 s. Posteriormente, se agregaron 700 µL de solución RW1 a la columna, los

cuales se centrifugaron a 12,000 rpm. El ARN fue eluído de la columna usando 50  $\mu$ L de agua libre de RNasas.

#### 7.8. Cuantificación del ARN mediante espectrometría UV-VIS

La cuantificación del ARN obtenido a partir de cada uno de los métodos descritos en la sección anterior se realizó con espectrometría UV-VIS con un equipo Nanodrop 2000 (Waltham, MA, USA, Thermo Fisher Scientific). A partir de 1  $\mu$ L de muestra se determinó la concentración y la correlación de absorción 260/280. Con estos datos se calculó la diferencia significativa entre cada método de extracción usando una prueba ANOVA ( $p < 0.05$ ).

#### 7.9. Electroforesis en gel de agarosa

La técnica de electroforesis en gel de agarosa se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Voytas (Voytas, 2000). En total, 24 muestras de ARN aislado usando cada uno de los métodos de extracción previamente descritos ( $n=3$ ) fueron analizadas, usando un gel de agarosa al 4% (condiciones de corrida: 75 V durante 1 h). Los patrones electroforéticos fueron observados con un equipo Bio-Rad ChemiDoc-Mp (Hercules, CA, USA, Bio-Rad) y el análisis de las imágenes fue realizado empleando una resolución de 600 dpi asistida por el software ImageLab (Hercules, CA, USA, Bio-Rad). El ARN extraído fue clasificado de acuerdo a su patrón de resolución en el gel de agarosa, siendo la integridad y prominencia (intensidad) de las bandas ribosomales 28S y 18S, el criterio más importante para su clasificación. De acuerdo con los criterios antes mencionados, las muestras se agruparon como a continuación se describe: baja calidad del ARN (aquellas muestras cuyo patrón de bandas ribosomales no fue observado), calidad media (muestras con presencia de una o ambas bandas ribosomales), y por último, alta calidad (para aquellas muestras con bandas ribosomales prominentes y la ausencia tanto de patrones de degradación así como de DNA). Solamente las muestras con una alta calidad del ARN obtenidas por esta clasificación fueron empleadas para las

evaluaciones de funcionalidad y de integridad con un microchip, estos análisis se describen en la siguiente sección.

#### 7.10. Determinación de la funcionalidad del ARN

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad del ARN extraído, las muestras fueron analizadas mediante Q-RT-PCR. El DNAc se sintetizó a partir del RNA usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada amplificación se realizó utilizando 100 ng de ADNc sintético. Las secuencias GCCTACATTTGCCGACAGATG sentido (5'-3') y AATGGCTTGGCAACACCAAT anti-sentido (5'-3') fueron empleadas para la amplificación del gen constitutivo S-adenosil-L-metionina sintasa (SAM) (GeneBank accession number EH036622). Las evaluaciones de la funcionalidad se identificaron con fluorescencia usando el reactivo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix en un equipo C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 Real-Time System. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: a) 5 min a 95 °C; b) 30 s a 95 °C y 30 s a 60 °C (40 ciclos).

#### 7.11. Determinación de la integridad del ARN

Las muestras de ARN con una integridad alta fueron enviadas al Laboratorio Nacional para la Genómica y la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) campus Irapuato, en Irapuato, Guanajuato, México. En este laboratorio se realizó la determinación del “RNA integrity number” (RIN, por sus siglas en inglés) con un microchip Agilent Eukaryote Total Nano Chip siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 7.12. Comparación estadística entre métodos de extracción de ARN

Los valores de concentración de ARN y los cocientes 260/280 obtenidos a partir de cada método de extracción fueron utilizados para los análisis estadísticos empleando el software R. La diferencia significativa entre los métodos se determinó

con un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey HSD (Honestly-significant-difference, por sus siglas en inglés) ( $p < 0.05$ ).

### 7.13. Secuenciación y ensamblaje del transcriptoma

Para la secuenciación del transcriptoma se construyeron librerías de ADNc usando el kit TruSeq RNA Library Prep Kit de Illumina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente las librerías de ADNc fueron secuenciadas usando un equipo NextSeq (2 x 150 bp, 4 líneas). Las lecturas crudas fueron analizadas con FASTQC para el control de calidad de la secuenciación (Brown et al., 2017). Los datos crudos fueron sometidos al Sequence Read Archive (SRA) del NCBI bajo el Bioproject PRJNA524427 y la Biosample SAMN11026413. Para una mejor reconstrucción de las isoformas, a partir de los datos de secuenciación, cada librería, por muestra y por condición (normal o blanqueada), fue ensamblada independientemente con SPAdes-RNA (Bankevich et al., 2012). Posteriormente, un transcriptoma combinado fue obtenido mediante el agrupamiento de secuencias y reducción de la redundancia con CD HIT-EST (W. Li & Godzik, 2006). El metatranscriptoma obtenido fue depositado en el repositorio Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) del NCBI. Para cuantificar los niveles de expresión de cada condición en cada librería, se crearon tablas de abundancia que contenían los conteos efectivos por millón (CPM) usando Kallisto (Bray et al., 2016). Los estadísticos del ensamble se calcularon con scripts de Python y R, los cuales se depositaron en el siguiente repositorio: ([https://github.com/vhelizarraga/Effect\\_thermal\\_strees\\_on\\_Mcomplanata.git](https://github.com/vhelizarraga/Effect_thermal_strees_on_Mcomplanata.git)). El poder estadístico de este experimento de secuenciación de ARN, que incluye tres muestras de *M. complanata* normales y cinco blanqueadas, fue calculado con RNASeqPower en R (Therneau et al., 2020). Un poder mayor a 0.66 fue obtenido para un fold-change de 2 usando un 10% de probabilidad de cometer un error de Tipo I ( $\alpha = 0.1$ ). Además, para explorar la variación entre muestras normales y blanqueadas, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional usando edgeR en R (Robinson et al., 2010).

#### 7.14. Anotación funcional y asignación de los términos de ontología de genes

Las secuencias del transcriptoma fueron anotadas con Blastx mediante similitud estructural (e-value de  $1 \times 10^{-6}$ ) contra las siguientes bases de datos: 1) proteínas no redundantes del NCBI, 2) proteínas del repositorio central del UniprotKB. La distribución taxonómica de las secuencias se obtuvo con MEGAN (Huson et al., 2016). Los transcritos fueron separados de acuerdo a su procedencia y se clasificaron en los siguientes grupos: metazoos, bacterias, arqueas y virus. Los estadísticos de las secuencias separadas fueron calculados con Python y R. La integridad de los transcriptomas correspondientes a cada grupo se determinó con BUSCO (Simão et al., 2015). Las secuencias fueron analizadas con Blast2Go (Conesa et al., 2005) para recuperar los términos de ontología de genes y las diferencias significativas en cuanto al número de genes observados entre muestras normales y blanqueadas se determinó con una prueba Chi cuadrada. Por último, las vías de la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) fueron obtenidas con Blast2Go (Conesa et al., 2005).

#### 7.15. Análisis de expresión diferencial de genes

Para detectar las diferencias entre especímenes normales y blanqueados de *M. complanata* después de la oscilación sureña El Niño 2015-2016, se realizó un análisis de expresión diferencial con edgeR (Robinson et al., 2010). Después de calcular los valores para CPM, las muestras fueron filtradas usando un valor de 3 para CPM y se normalizaron usando el método de la media recortada para los valores de M (TMM) (Robinson et al., 2010). Además, se realizó una prueba de razón de verosimilitud (GLM) y para conocer el número de genes diferencialmente expresados para las muestras blanqueadas se empleó una tasa de descubrimiento falso (FDR) menor a 0.05. Por último, con base en la distribución hipergeométrica seguida de una corrección usando FDR, se efectuó un análisis de redes de genes para observar el enriquecimiento de las vías detectadas en las muestras blanqueadas mediante ShinyGo (Ge et al., 2020).

### 7.16. Validación de los genes diferenciales

Cinco genes fueron seleccionados de forma aleatoria para validar los niveles de expresión por medio de PCR semicuantitativa. La lista de los genes empleados para la validación, así como los correspondientes primers se muestran en el Cuadro 3. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 20  $\mu$ L (7.5  $\mu$ L de agua esteril, 2  $\mu$ L de buffer Taq 10X con KCl, 1.5  $\mu$ L de MgCl 25 mM, 2  $\mu$ L de cDNA, 2.5  $\mu$ L de primers sentido y antisentido y 0.5 U/ $\mu$ L de polimerasa Taq). Cada amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 de Biorad bajo las siguientes condiciones: a) 95 °C durante 10 min; b) 35 ciclos 95 °C por 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; c) 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 4% por 1 h a 75V. Las imágenes de los geles de electroforesis se obtuvieron con un equipo ChemiDoc MP de Biorad y se procesaron con ImageLab de Biorad. La intensidad de las señales (n=3) de cada gen obtenido de muestras normales y blanqueadas fueron filtradas y analizadas con Quantity Tools de ImageLab. Los datos normalizados expresados en función de la intensidad de pixeles en unidades arbitrarias (AU) fueron usados para calcular la significancia estadística de la expresión con una prueba t de Student ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 3.** Primers usados para la validación de la expresión de genes

Descripción	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
Superoxido dismutasa	GGCGTGGATATTA AAAACAG	ATGGACCGTACATTGGTAAG
Zinc metaloproteína nas-6	CAG AATGGATGTCATTGTGA	TGTTCTCTTCGACGTAACCT
Miosina	TAGCTCTTTGTCTGGCTTTC	GCAAGACGCTACAGAAAAAT
10 kDa proteína de choque térmico	TACCAGTTTCCGTAGCAGTT	TCTGCGTTTGTAATCACTG
Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L subunidad beta-2	CTCGTAGCTGCTGAAAAGTT	GTATTGACGTAGCTCCCAAG

#### 7.17. Predicción del proteoma y búsqueda de toxinas putativas

Con la finalidad de obtener el proteoma del hidrocoral *M. complanata*, se realizó la predicción de todas las secuencias codificantes a partir del transcriptoma para los tres marcos de lectura abiertos (sentido y antisentido) usando Seqinr en R (Charif & Lobry, 2007). Posteriormente, se realizó una búsqueda de toxinas en el proteoma predicho con Blastp. En breve, las secuencias de proteína fueron anotadas por similitud estructural contra la base de datos Animal Toxins Annotation Project del UniProtKB usando un e-value de  $1 \times 10^{-6}$ . Después de la anotación, los hits resultantes fueron filtrados y clasificados; solamente las secuencias con un e-value igual o menor que  $1 \times 10^{-6}$  y con más de 10 aminoácidos de similitud fueron considerados como toxinas putativas.

#### 7.18. Alineamiento múltiple de secuencias

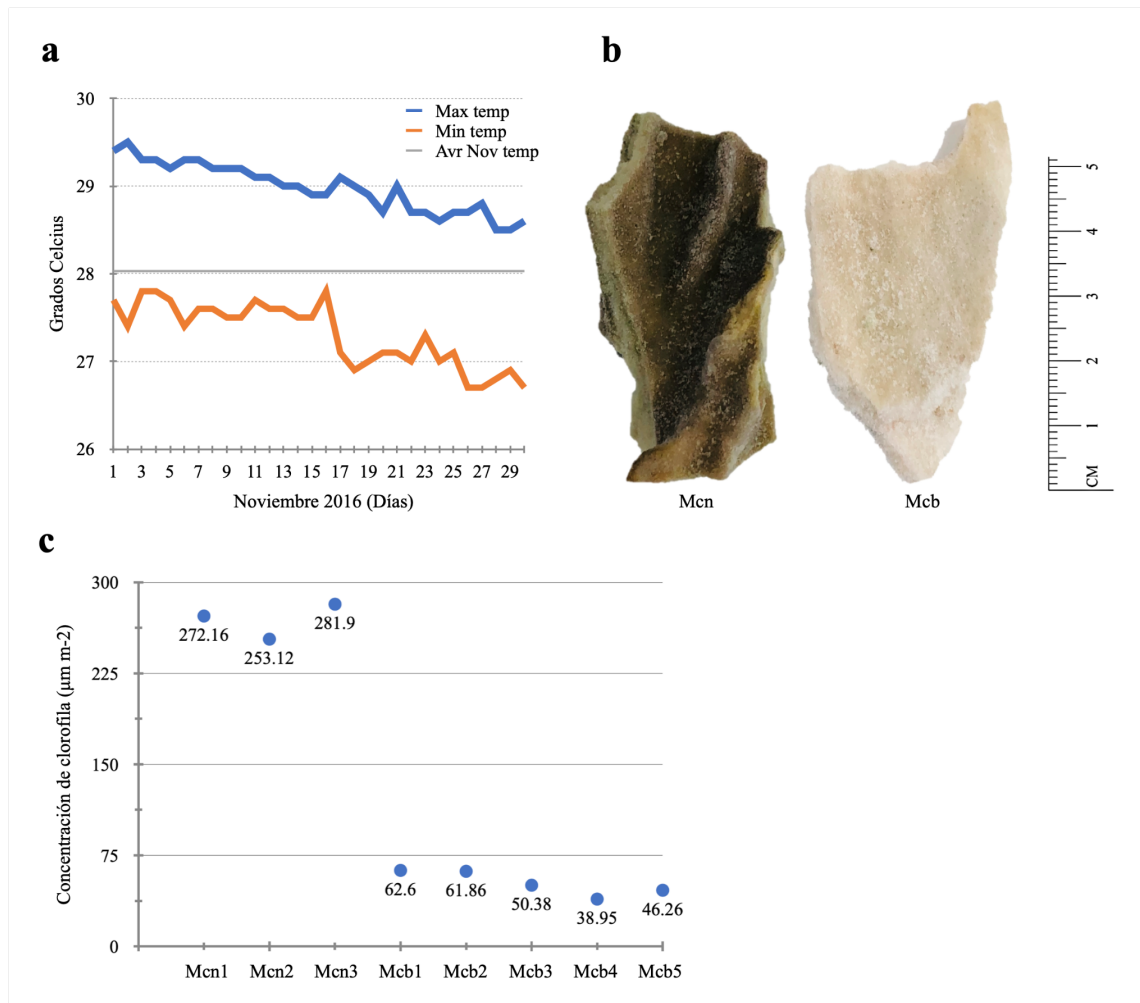
Dos toxinas putativas representativas, una hemolisina y una PFT, fueron seleccionadas para analizarlas mediante un alineamiento múltiple contra secuencias homólogas depositadas en la base de datos UniProtKB. Dichos lineamientos se realizaron con ClustalOmega (Sievers & Higgins, 2014) y los resultados se visualizaron con Jalview (Clamp et al., 2004).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Grado de blanqueamiento

Fragmentos del hidrocoral *M. complanata* normales y blanqueados, Mcn y Mcb respectivamente, fueron recolectados en el Caribe Mexicano después de la oscilación sureña El Niño 2015-2016 en Noviembre del 2016. Los registros correspondientes de la temperatura del agua de mar, incluyendo las temperaturas máximas y mínimas durante Noviembre del 2016 en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México se muestran en la Figura 1a. Los valores de las temperaturas del agua en Noviembre del 2016 fueron comparados contra las temperaturas máximas y mínimas promedio en esta región desde 2007 hasta el 2015 durante el mismo mes (fuente: <http://seatemperature.info>). Fragmentos representativos de Mcn y Mcb (aproximadamente 5 cm de largo) se muestran en la Figura 1b. Los especímenes blanqueados mostraron una clara disminución de la coloración en comparación con las muestras normales. Se determinó el contenido de clorofila total en los tejidos de ambas condiciones para medir el grado de blanqueamiento en las colonias de este hidrocoral. Como se esperaba, las muestras blanqueadas mostraron un valor de clorofila total significativamente menor ( $46.29 \pm 12.95 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) en comparación con las muestras normales ( $255.91 \pm 40.67 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 1c).





**Figura 1.** Recolección de las muestras y cuantificación de clorofilas totales. a) Registros de temperatura del agua en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México durante noviembre del 2016 (la temperatura promedio se calculó a partir de los registros de la temperaturas de los años 2007 al 2015 durante el mismo mes). b) Fragmentos representativos de especímenes de *M. complanata* recolectados en el Caribe Mexicano. Mcn: *M. complanata* normal. Mcb: *M. complanata* blanqueado. c) Cuantificación de clorofila total para hidrocorales normales y blanqueados.

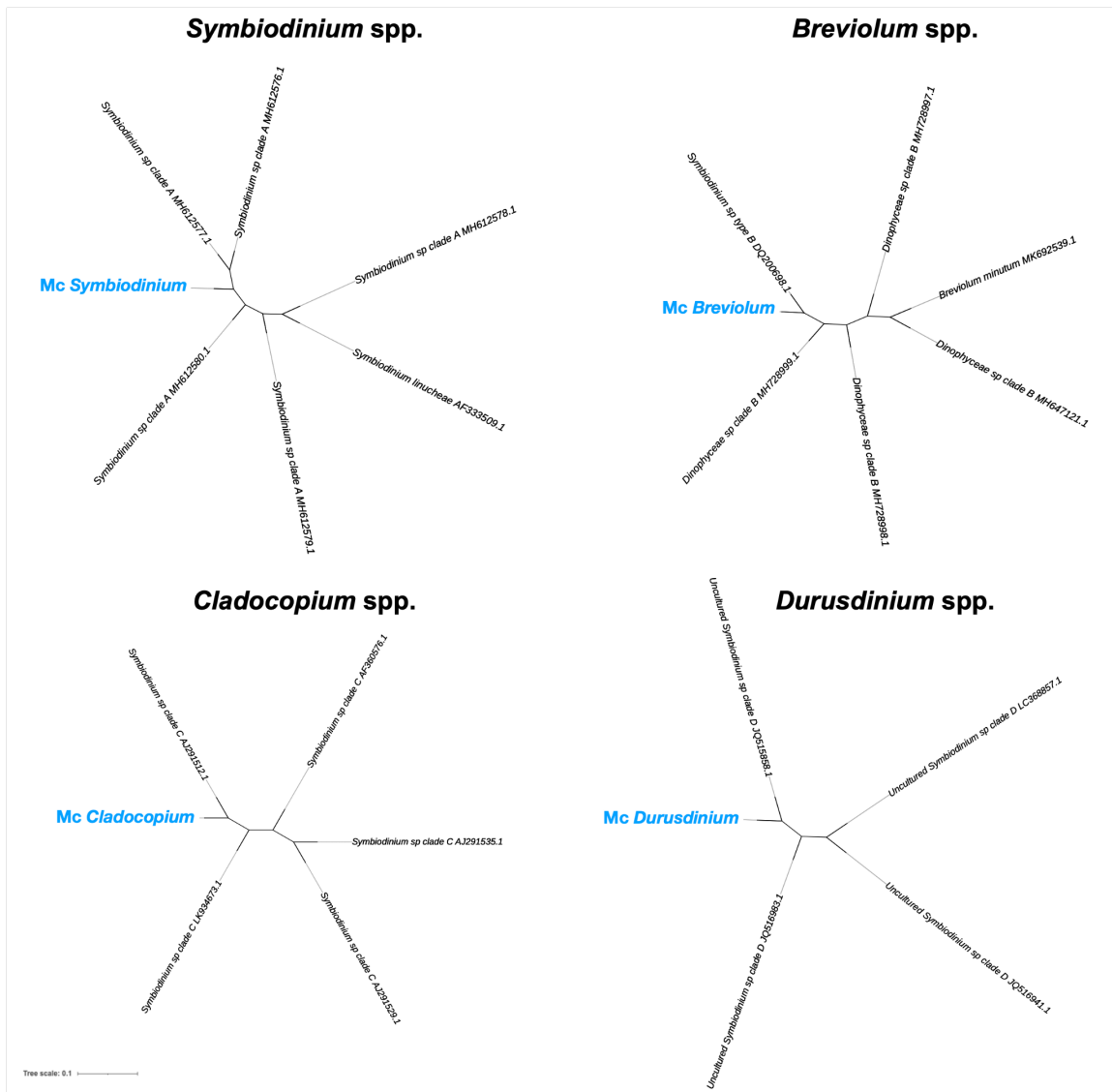
## 8.2. Genotipificación de simbiontes

Los genotipos de los simbioses de la familia Symbiodiniaceae que se identificaron de acuerdo a la identificación de las secuencias de ADNr se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Identificación de simbioses de la familia Symbiodiniaceae

Hit	Nombre científico	Muestra	Max Score	Query cover	E value	Identidad	Acceso
<i>Symbiodinium</i> sp. isolate CV94 internal transcribed spacer 1	<i>Symbiodinium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> clade A)	Mc1; Mc2; Mc3; BMc3	268	87%	1E-67	89.72%	MH612580.1
s15b1_p 28S large subunit ribosomal RNA gene	<i>Breviolum</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> type B clone)	Mc1; Mc2; Mc3; BMc5;	187	98%	1E-43	97.30%	DQ200698.1
<i>Symbiodinium</i> sp. clade_C 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	<i>Cladocopium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> sp. clade C)	Mc1; Mc2; Mc3	45	51%	1E-17	89.47%	AF360576.1
Uncultured clade D <i>Symbiodinium</i> sp. clone 0907_ZHM3_5	<i>Durusdinium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> sp. clade D)	Mc1; Mc2; Mc3	78.7	59%	4E-11	97.78%	JQ516983.1

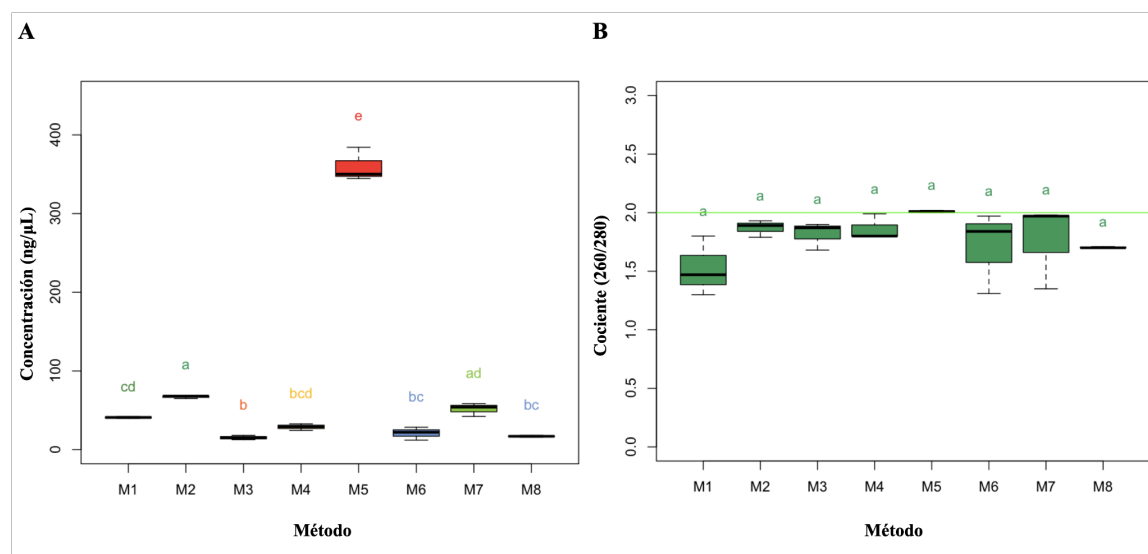
Los especímenes normales mostraron la presencia de cuatro géneros de simbioses: *Symbiodinium* spp. (MH612580.1), *Breviolum* spp. (DQ2000698.1), *Cladocopium* spp. (AF360576.1) y *Durusdinium* spp. (JQ516983.1), mientras que solamente los géneros *Symbiodinium* spp. (MH612580.1) y *Breviolum* spp. (DQ200698.1) fueron identificados para los hidrocorales blanqueados. El árbol filogenético correspondiente para la unión aglomerativa de vecinos entre los cuatro géneros identificados se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Árbol filogenético de los simbioses detectados en *M. complanata* construido mediante el método de unión de vecinos para los géneros *Symbiodinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, y *Durusdinium*. Números de acceso: MH612580.1, MH612579.1, MH612578.1, MH612577.1, MH612576.1, AF333509.1, DQ200698.1, MH728999.1, MH728998.1, MH728997.1, MH647121.1, MK692539.1, AF360576.1, LK934673.1, AJ291535.1, AJ291529.1, AJ291512.1, LC368857.1, JQ516983.1, JQ516941.1, JQ515858.1.

### 8.3. Cuantificación y cualificación del ARN

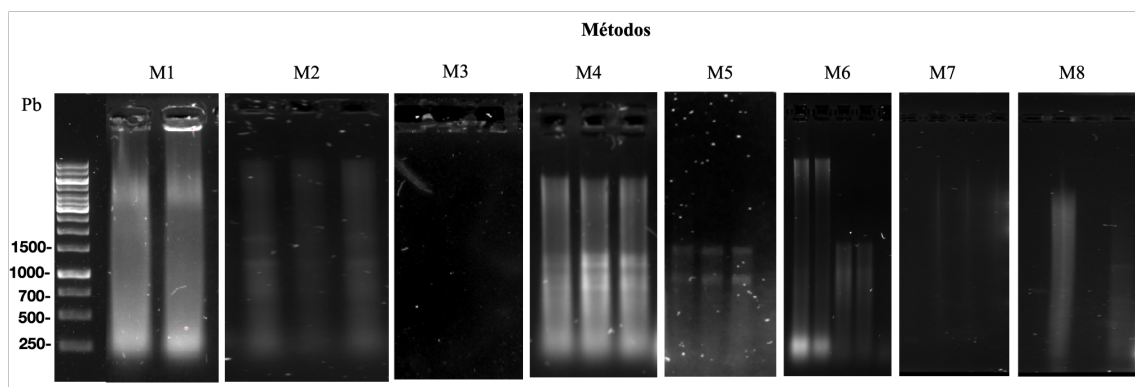
Los resultados obtenidos de la cuantificación del ARN se muestran en la Figura 3A. Tras la comparación de métodos de aislamiento de ARN evaluados en este estudio se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de ARN, expresadas en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , entre los ocho métodos. La mayoría de los procedimientos mostraron valores de concentración menores a  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Sin embargo, las muestras de ARN obtenidas con el método modificado de extracción con ácido bórico (Método 5) resultaron con la mayor concentración de ARN ( $359.5 \pm 21.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Por otra parte, se obtuvieron notorias diferencias entre los cocientes 260/280 tal y como se muestra en la Figura 3B. Además, se observó una alta variabilidad dentro de cada grupo de muestras, con excepción de los cocientes 260/280 correspondientes a los métodos 5 y 8. Particularmente, un valor del cociente 260/280 de  $2.01 \pm 0.01$  fue obtenido para el ARN aislado con el método 5, lo cual fue indicativo de la alta pureza de este grupo de muestras.



**Figura 3.** Detalles del aislamiento de ARN a partir de especímenes de *M. complanata*. A) Concentraciones de ARN expresadas en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . B) Cocientes 260/280. La significancia estadística entre los métodos de obtención de ARN se determinó con un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey HSD ( $p <$

0.05). Diferentes letras minúsculas en los gráficos indican la significancia obtenida entre los métodos.

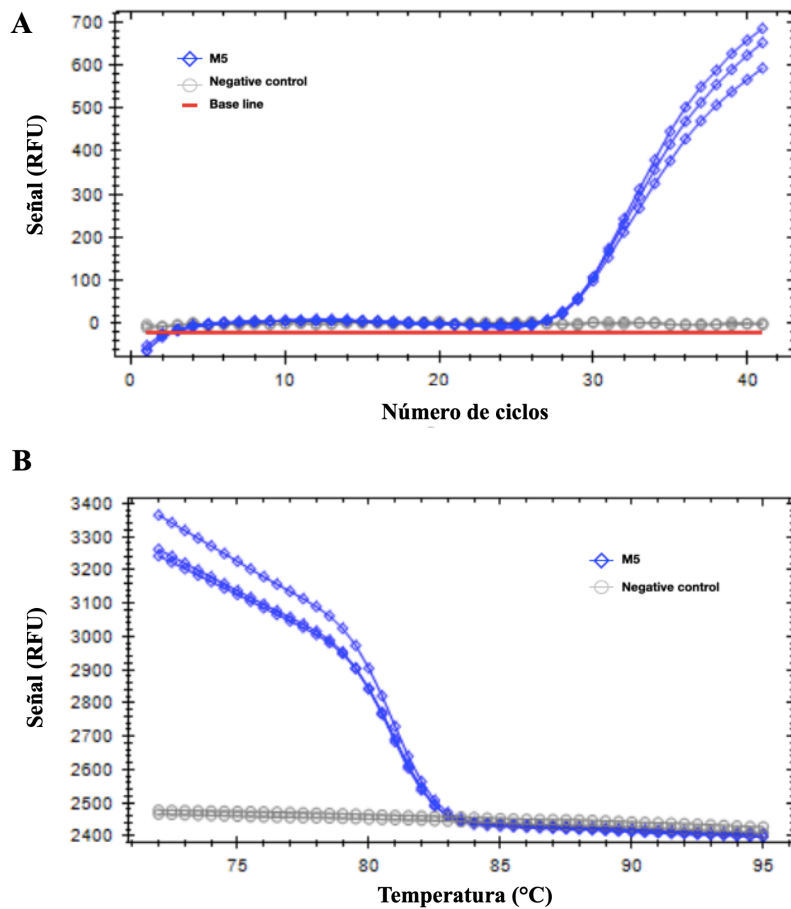
Los resultados del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa se muestran en la Figura 4. Con respecto a la clasificación del ARN, basada en su integridad en el gel de agarosa, las muestras de ARN obtenidas por los métodos 1, 2, 3 y 8 fueron consideradas como de baja calidad. Mientras que a las muestras provenientes de los métodos 4, 6 y 7 se les asignó una clasificación de calidad intermedia. Por último, el ARN extraído con el método 5 fue el único procedimiento que mostró una alta calidad e integridad en el gel de agarosa.



**Figura 4.** Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ARN obtenidas a partir de especímenes de *M. complanata*.

#### 8.4. Funcionalidad del ARN

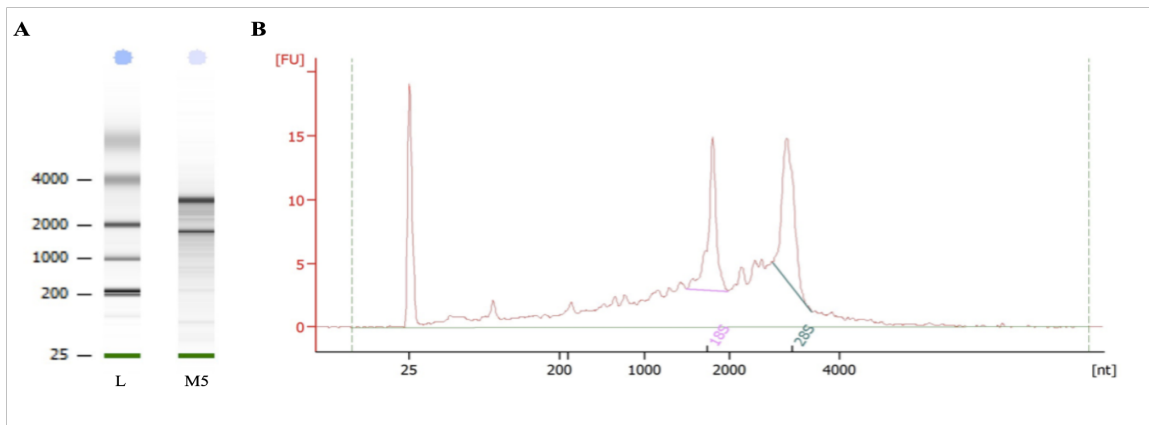
Las muestras de ARN obtenidas con el método 5 mostraron viabilidad para ser analizadas por Q-RT-PCR. La gráfica de amplificación y la curva de fusión para el gen SAM se observan en la Figura 5A y 5B, respectivamente. Tras la amplificación del gen SAM se obtuvo un valor de Cq de  $27.59 \pm 0.0984$ , el cual mostró un comportamiento logarítmico a partir de los 26 ciclos (Figura 5A). Por otro lado, tras la evaluación de las características del ADN bicatenario durante el calentamiento, se observó una disolución de la doble cadena a partir de los 81.0 C (Figura 5B).



**Figura 5.** A) Gráfica de amplificación y B) curva de fusión del gen S-adenosil-L-metionina sintasa (SAM) del ARN de *M. complanata* obtenido mediante el método 5.

### 8.5. Integridad del ARN

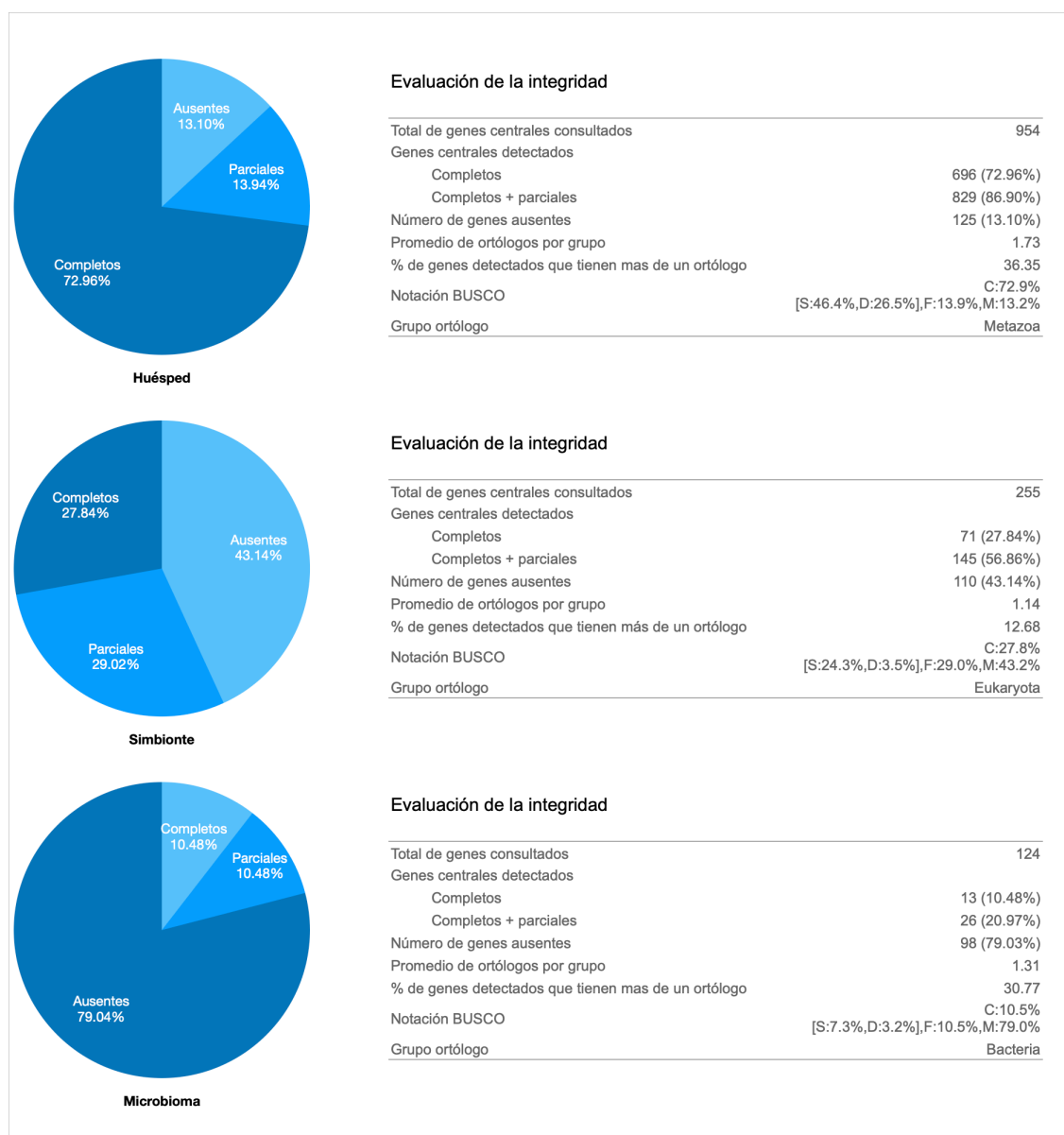
Las muestras de ARN de alta calidad obtenidas por el método 5 fueron empleadas para la determinación del RIN. El patrón de bandeo de estas muestras de ARN, así como un electroferograma representativo, donde se resaltan las bandas ribosomales 18S y 28S se muestran en la Figura 6A y 6B, respectivamente. El valor del RIN obtenido para este grupo de muestras fue de  $6.4 \pm 0.7$ .



**Figura 6.** Determinación del RIN para las muestras de ARN de *M. complanata* extraídas con el método 5 (M5). A) patrón de bandeado. B) electroferograma representativo.

#### 8.6. Genes ortólogos de copia única

Posteriormente a la secuenciación de las muestras de ARN obtenidas por el método 5, el análisis general del ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *M. complanata* mostró un total de 412 660 cóntigos. Estas secuencias mostraron un tamaño promedio de 417 pb, un contenido máximo de 37 740 pb y un contenido de GC del 43.0%. El transcriptoma ensamblado de este organismo se depositó en el GenBank bajo el número de acceso GIXI00000000. A partir de este transcriptoma 169, 236 secuencias fueron anotadas mediante similitud estructural contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Las secuencias fueron analizadas de acuerdo a los correspondientes niveles taxonómicos, y los genes ortólogos de copia única, en notación BUSCO, fueron clasificados para los siguientes grupos: hospedante, simbiote y microbioma. Este análisis mostró que el 86% de los BUSCOs del núcleo de genes correspondientes fueron asignados al hospedante, el 56.86% al simbiote y por último, el 20.97% de los BUSCOs fueron identificados para el microbioma (Figura 7).



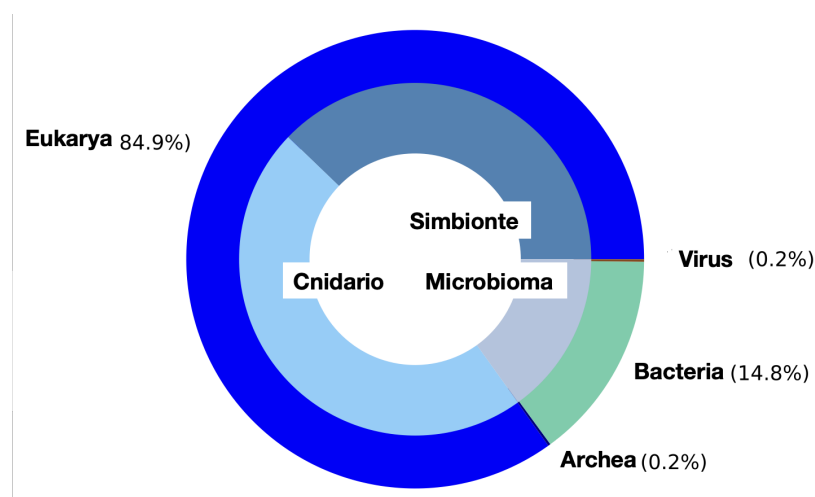
**Figura 7.** Resultados del análisis de integridad del transcriptoma usando la notación de BUSCO.

### 8.7. Contribución de los transcritos en el hidrocoral holobionte

Tras el análisis de los contigs usando MEGAN, se obtuvo la distribución taxonómica de las secuencias para los diferentes niveles taxonómicos. La distribución general de las secuencias mostró un 84.9% para Eukarya, 14.8% para Bacteria, 0.2% para Archaea y un 0.2% para Virus. Además, los hits fueron



subclasificados de acuerdo a los componentes del hidrocoral holobionte de la siguiente manera: secuencias de cnidario con un 37.8%, secuencias provenientes de los simbiotes con el 37.4% y componentes del microbioma con un 15.1% (Figura 8).

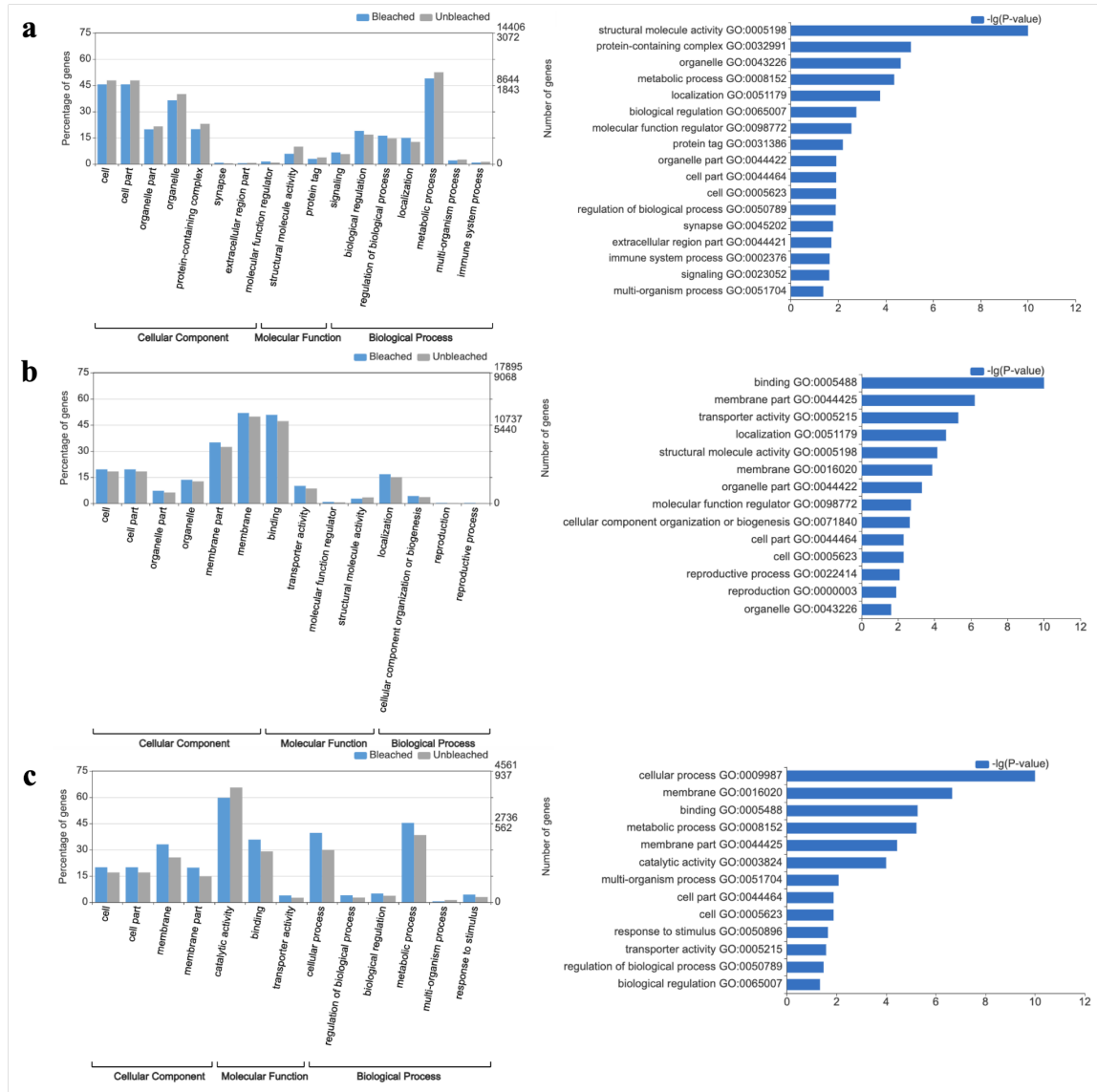


**Figura 8.** Composición del holobionte *M. complanata* con base en la asignación taxonómica de los cóntigos.

### 8.8. Términos de ontología de genes

Usando Blast2Go, los términos de ontología de genes fueron asignados para los subgrupos del cnidario, simbionte y el microbioma bajo condiciones normales y de blanqueamiento. El panel izquierdo de la Figura 9 muestra los términos sobrerrepresentados en las subontologías proceso biológico (BP), compartimento celular (CC) y función molecular (MF). Los términos significativos, con base en el número de genes por subgrupo para las condiciones normales y blanqueadas se muestran en el panel derecho de la Figura 9. Por otra parte, las anotaciones fueron empleadas para determinar los elementos presentes en las enciclopedia de genes y genomas de Kyoto. En total, 147 genes pertenecientes a diferentes rutas metabólicas fueron asignados. Con respecto a las muestras blanqueadas, las vías metabólicas mayormente representadas fueron: metabolismo de tiamina

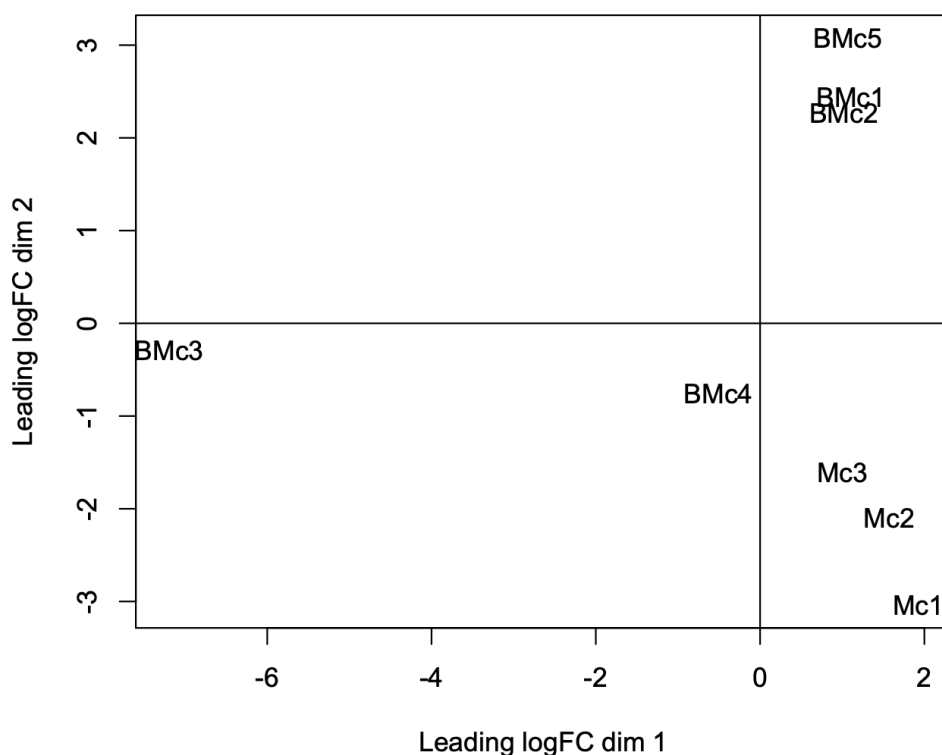
(map00730), metabolismo de sacarosa (map00500) y metabolismo de arginina y prolina (map00330), entre otros.



**Figura 9.** Asignación de los términos de ontología de genes para los subgrupos a) hospedante, b) simbiote y c) microbioma. Panel derecho: Términos de ontología en las subontologías proceso biológico (BP), compartimiento celular (CC) y función molecular (MF). Panel izquierdo: Términos de ontología con diferencias significativas en el número de genes anotados ( $p < 0.05$ ).

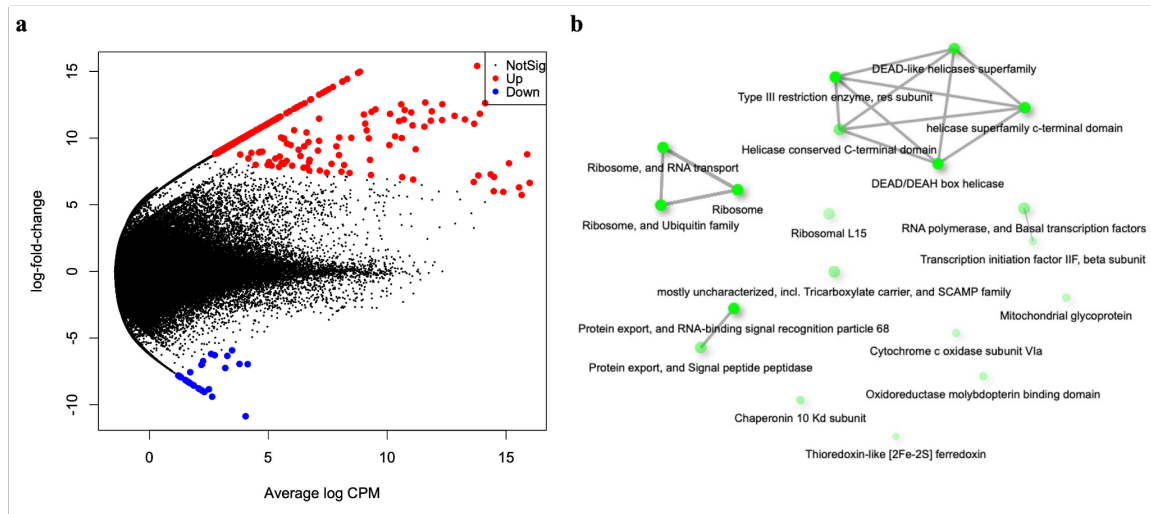
### 8.9. Variación intraespecífica durante el blanqueamiento

En la Figura 10 se muestran los resultados del análisis de escalamiento multidimensional, en este gráfico se puede observar un agrupamiento entre las muestras de hidrocorales normales y la variabilidad observada para el grupo correspondiente a los organismos blanqueados.



**Figura 10.** Análisis de escalamiento multidimensional (PCoA simplificado) que muestra la variación multivariada entre muestras de *M. complanata* normales y blanqueadas.

Los genes cuya expresión se vio modificada durante el blanqueamiento fueron determinados con una prueba de expresión diferencial pareada. Esta prueba mostró que un total de 299 genes se expresan de forma diferencial ( $p < 0.05$ ) en los especímenes blanqueados, de los cuales 265 mostraron una regulación a la alta y 34 fueron regulados a la baja (Figura 11a).



**Figura 11.** Análisis de expresión diferencial de genes. a) Gráfica de volcán mostrando los genes diferenciales en las muestras blanqueadas de *M. complanata*. b) Red para los genes diferenciales enriquecidos en las muestras blanqueadas. Dos vías (nodos) se conectan si comparten el 20% o más genes. Los nodos más oscuros representan un enriquecimiento significativo mayor. Los nodos más grandes representan grupos de genes más grandes. Los bordes gruesos representan más genes superpuestos.

Las anotaciones correspondientes a los genes expresados diferencialmente se enlistan en el Cuadro 5. El análisis de enriquecimiento evidenció la presencia de categorías funcionales con un aumento en su expresión en los hidrocorales blanqueados ( $p < 0.05$ ), las cuales incluyeron ribosoma, ARN polimerasa, chaperona, oxidoreductasa y factores basales de la transcripción, entre otros. Las redes de genes enriquecidas en las muestras blanqueadas se muestran en la Figura 11b. Estas redes representan el agrupamiento jerárquico que resume la correlación entre las vías enriquecidas.

**Cuadro 5.** Genes expresados de forma diferencial identificados en muestras blanqueadas de *M. complanata*.

Secuencia	Acceso	Descripcion	E value	Términos	Expresión	Fold-change	LogFold-change
Mcom_334 265	SAC97892. 1	Uncharacterized protein ORF91 (chloroplast)	1.45317 E-17	1	D	1276.724 0890923 4	10.318231 0647484
Mcom_340 624	XP_020620 022.1	Cytochrome c	3.25655 E-60	8	U	44100.20 0796839 8	15.428497 6042199
Mcom_217 30	AER54540. 1	Cytochrome c oxidase subunit 2	3.17665 E-107	7	U	182.7375 5289964 1	7.5136293 3066364
Mcom_118 61	XP_002153 881.1	Cytochrome c oxidase subunit 6A	5.06327 E-18	3	U	1262.414 6378009 1	10.301970 12339
Mcom_368 787	XP_002160 547.1	NADH dehydrogenase	3.85075 E-114	10	U	430.4735 4774277 6	8.7497807 7765742
Mcom_375 232	XP_002159 185.1	Sulfite oxidase, mitochondrial	3.58009 E-162	13	U	147.2715 1996627	7.2023346 5221867
Mcom_379 104	XP_004207 238.1	Metaxin-1	2.07999 E-41	1	U	350.8316 0062044 5	8.4546348 9196192
Mcom_224 758	XP_006129 875.1	ATP synthase lipid- binding protein, mitochondrial	1.25444 E-36	14	D	88.75809 0799299 5	6.4718067 3015543
Mcom_340 556	XP_012555 294.1	NADP-dependent malic enzyme	1.21439 E-116	23	U	279.5591 0326502 9	8.1270095 1389226
Mcom_804 86	XP_012564 774.1	Alanine aminotransferase 2	0.0	12	U	695.4327 4667464 1	9.4417671 9234902
Mcom_142 67	XP_002155 934.1	Ethanolamine- phosphate cytidyltransferase	1.72585 E-158	6	U	521.5459 5559184 4	9.0266505 7000469

Mcom_534 1	EDO36122. 1	EH domain- containing protein 2	1.24308 E-08	3	U	463.4222 4139735 9	8.8561834 7606563
Mcom_333 904	XP_002158 873.2	Lysosome- associated membrane glycoprotein 1	1.30311 E-12	25	D	69.45350 8788753	6.1179756 7583647
Mcom_375 516	ACY74447. 1	Actin	0.0	3	U	302.0646 8295438	8.2387137 0550206
Mcom_340 435	XP_002160 112.1	Radixin 2438	0.0	63	U	64.55572 5362345 7	6.0124731 4681906
Mcom_289 194	Q05000.1	Myosin heavy chain	4.08753 E-78	27	D	147.1905 3936999 5	7.2015411 3533664
Mcom_132 637	XP_012556 891.1	ATP-binding cassette sub-family A member 2	2.0417E- 124	74	U	286.2776 7189522 2	8.1612713 4211615
Mcom_408 33	ABD59026. 1	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2	1.86888 E-139	28	U	296.9307 7351794 5	8.2139828 0987948
Mcom_410 59	XP_002160 025.1	Protein RER1	1.60237 E-83	12	U	277.6487 9416809 4	8.11711732 007682
Mcom_369 436	XP_002154 626.1	Protein transport protein Sec61 subunit beta	2.94603 E-23	14	U	59.84497 9899537 1	5.9031583 2655402
Mcom_376 281	XP_002164 532.3	Charged multivesicular body protein 7	6.37689 E-31	7	U	339.9071 3191840 6	8.4089968 225439
Mcom_352 094	XP_002156 778.1	GTP-binding protein SAR1a	3.81118E -97	16	U	948.0140 4318803 3	9.8887646 2008779
Mcom_228 382	XP_006822 187.1	Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog	2.9801E- 60	28	D	89.42849 1540576 9	6.4826626 3609154
Mcom_294 74	XP_002160 344.2	General transcription factor IIF subunit 2	2.80607 E-67	10	U	294.8217 1345344 9	8.2036989 7179935

Mcom_966 98	XP_027048 494.1	Circadian locomoter output cycles protein kaput-like isoform X2	2.54647 E-62	55	U	279.1723 4612805	8.1250122 2989018
Mcom_63	XP_002163 509.2	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	1.5809E- 118	24	U	676.5463 9494637 1	9.4020450 6183902
Mcom_368 775	XP_002157 035.1	Protein arginine N- methyltransferase 1	7.10301 E-170	42	U	127.6664 4451771 6	6.9962355 708111
Mcom_132 054	XP_001629 792.2KAT8	KAT8 regulatory NSL complex subunit 3	7.89375 E-74	3	U	2374.677 2941043 6	11.213515 756915
Mcom_978 51	XP_002156 165.1	ATP-dependent RNA helicase DDX18	3.80115 E-103	14	U	329.6907 8307990 7	8.3649697 4499419
Mcom_164 457	PIK45035.1	Putative transcription elongation factor B polypeptide 1	3.07025 E-59	15	U	497.4951 8082632 8	8.9585387 4029205
Mcom_51	XP_002167 484.2	Probable glucosamine 6- phosphate N- acetyltransferase	4.68977 E-34	12	U	325.0691 7307303 6	8.3446029 3877943
Mcom_286 392	CBJ32893. 1	Elongation factor 1- alpha	0.0	28	D	70.34124 0303509 8	6.1362988 6863288
Mcom_296 13	XP_004210 536.1	60S ribosomal protein L28	5.30798 E-34	15	U	89.09576 6380253 3	6.4772849 7481272
Mcom_352 275	XP_002162 844.1	60S ribosomal protein L15	4.53887 E-94	5	U	13295.47 7543909	13.698647 9760648
Mcom_361 440	XP_002167 181.1	60S ribosomal protein L3	0.0	8	U	78.61186 6946852 8	6.2966752 0753786
Mcom_361 745	XP_027039 507.1	Probable 60S ribosomal protein L37-A	9.86898 E-35	13	U	72.75763 4323552 9	6.1850267 3016424

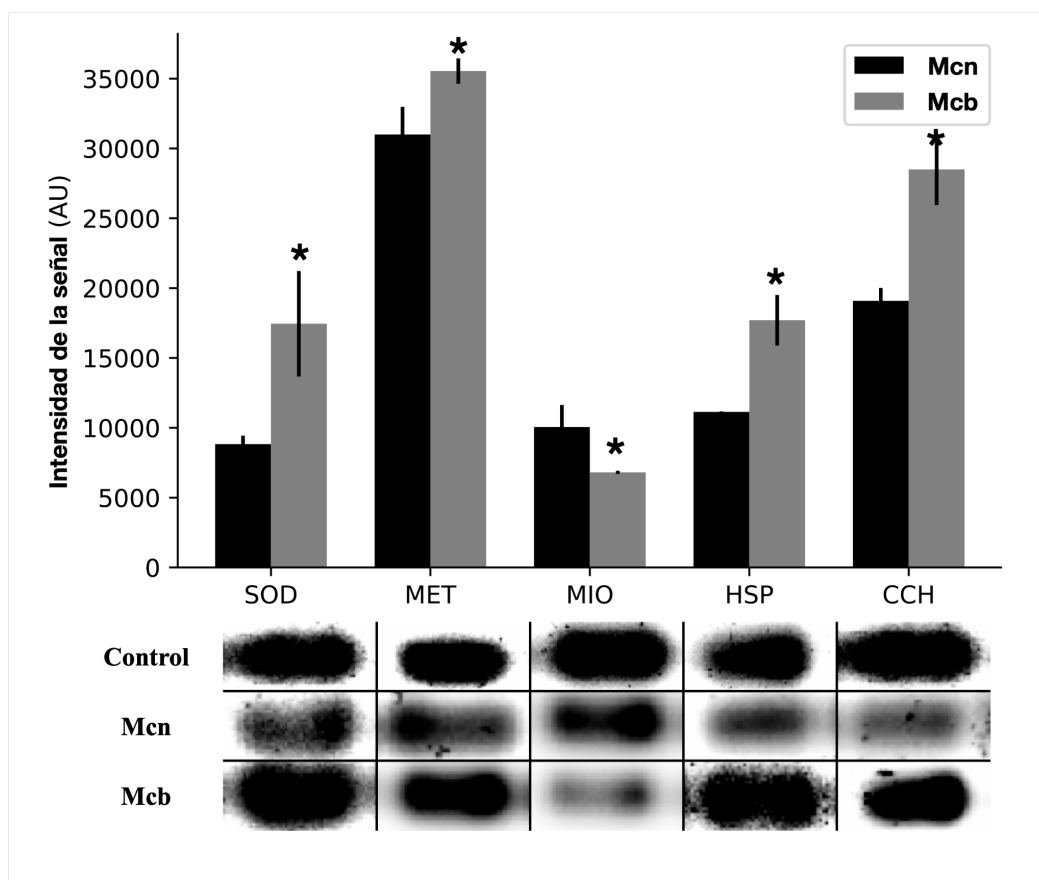
Mcom_368 908	XP_002154 604.1	60S ribosomal protein L7a	1.52604 E-104	16	U	79.57278 1668283 5	6.3142031 2782583
Mcom_381 948	XP_002157 788.1	Elongation factor 2	3.87495 E-76	31	U	63.72252 4019243 1	5.9937315 0735522
Mcom_506 54	XP_002167 039.1	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C	8.32792 E-98	4	D	104.0382 5942975 8	6.7009703 5794122
Mcom_392 361	XP_019626 223.1	Translation machinery- associated protein 7	7.53134 E-10	1	U	62.72514 5157584 6	5.9709719 9918877
Mcom_341 05	XP_004206 204.1	40S ribosomal protein S20	1.9916E- 59	11	U	91.49687 7005902 4	6.5156505 9669947
Mcom_145 31	XP_012560 354.1	40S ribosomal protein S21	1.79431 E-29	14	U	83.86869 6518892 6	6.3900605 2886578
Mcom_223 86	XP_002154 455.2	60S acidic ribosomal protein P0	1.01138 E-13	18	D	28.20222 2189897 3	4.8177369 3893113
Mcom_896 4	EPY87465. 1	60S ribosomal protein L38	9.50835 E-33	13	U	1381.614 149275	10.432139 0475289
Mcom_145 48	XP_020631 005.1	60S ribosomal protein L30	2.47305 E-58	14	U	1153.401 8302853 7	10.171679 5015243
Mcom_555 8	XP_012554 015.1	40S ribosomal protein S14	1.45918 E-95	16	U	821.8970 1084941 2	9.6828138 1574302
Mcom_146 99	XP_002158 762.1	40S ribosomal protein S11	1.03139 E-76	8	U	160.7625 0818669 4	7.3287871 8111879
Mcom_117 71	XP_002158 630.1	40S ribosomal protein S8	1.94285 E-101	11	U	85.99354 2817867 4	6.4261564 2802317
Mcom_375 472	XP_001640 983.2	Beta-1,4- galactosyltransfera se 1	3.17841 E-81	46	U	285.9818 4904346 1	8.1597797 7340085



Mcom_185	XP_012562 496.1	Ubiquitin-protein ligase E3B	1.09805 E-16	2	U	465.3432 1040646 5	8.8621513 4752259
Mcom_143 09	XP_020914 076.2	Ribitol-5-phosphate xylosyltransferase 1	3.20071 E-51	5	U	345.2623 8178633 5	8.4315493 4306018
Mcom_293 87	XP_034757 966.1	Polyubiquitin	0.0	24	U	3636.690 42822113	11.828410 4068596
Mcom_409 01	XP_012557 742.1	DNA replication licensing factor mcm2	0.0	38	U	313.3461 5734852	8.2916134 9083699
Mcom_216 83	XP_002163 825.1	DNA replication complex GINS protein PSF3	9.97508 E-56	3	U	567.9259 1233351 8	9.1495589 2781363
Mcom_132 706	XP_002167 421.3	Casein kinase I isoform gamma-3	0.0	11	U	380.1396 1889313 4	8.5703855 8330396
Mcom_141 49	XP_012556 253.1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	1.44241 E-93	26	U	754.9909 8480590 5	9.5603156 0738666
Mcom_194 638	XP_012555 833.1	Centromere- associated protein E	1.25655 E-102	28	U	315.5740 0988650 9	8.3018345 8222417
Mcom_216 73	XP_012561 340.1	THO complex subunit 3	1.87029 E-160	18	U	459.8959 8390680 2	8.8451637 8905152
Mcom_132 261	XP_002165 482.2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	0.0	18	U	345.3216 8082997 7	8.4317971 0561664
Mcom_408 94	XP_002164 714.2	Probable ATP- dependent RNA helicase DDX6	0.0	41	U	317.5956 7972444 9	8.3110474 7731068
Mcom_162 432	XP_002161 749.2	Probable ATP- dependent RNA helicase DDX46	0.0	14	U	1642.780 3089463 4	10.681923 8444476
Mcom_377 629	XP_002164 119.1	Serine/arginine-rich splicing factor 6	8.55599 E-49	25	U	1069.896 0433332 8	10.063254 9083412

Mcom_309	XP_034553	Zinc	2.11041	13	U	340.0920	8.4097814
	585.1	metalloproteinase nas-6	E-17			4195496	3761281
						8	
Mcom_376	XP_002166	U11/U12 small	6.05631	9	U	72.87905	6.1874323
960	019.1	nuclear	E-43			6743135	8167816
		ribonucleoprotein 35 kDa protein				4	
Mcom_162	JQ994220.	Superoxide	3.67142	6	U	349.5820	8.4494873
778	1	dismutase	E-08			6831575	7399706
						7	
Mcom_368	XP_002160	Soma ferritin	3.51062	9	U	678.6470	9.4065177
760	295.1		E-59			8248957	1313031
						1	
Mcom_539	XP_018080	Hypoxia-inducible	2.26163	25	U	324.3099	8.3412294
0	893.1	factor 1-alpha	E-107			5202218	8588651
		inhibitor				1	
Mcom_409	XP_002155	Complement	4.29566	16	U	341.5327	8.4158802
64	810.1	component 1 Q	E-21			8481453	6380725
		subcomponent- binding protein, mitochondrial				7	
Mcom_379	XP_027131	Cysteine-rich	6.1676E-	19	U	53.31956	5.7365931
896	091.1	protein 1	29			5259537	1236477
						5	
Mcom_116	XP_012560	Nucleolin 2-like	6.57403	11	U	1400.849	10.452086
80	101.1	isoform X1	E-20			3747133	1240593
						6	
Mcom_555	XP_002162	10 kDa heat shock	3.44982	10	U	123.8711	6.9526967
6	621.1	protein, mitochondrial	E-33			8192454	7975229
						8	
Mcom_340	XP_002155	12 kDa FK506-	2.7987E-	55	U	149.7522	7.2264342
704	592.2	binding protein	47			91676511	7068555
Mcom_144	XP_002164	NAD(P)H-hydrate	1.11441	13	U	652.2084	9.3491893
32	619.2	epimerase	E-103			4224423	0535521
Mcom_240	OBZ62712.	Hypothetical	3.82223	3	D	86.82268	6.4400001
920	1	protein	E-09			8215787	8708821
		A0H81_15016				4	

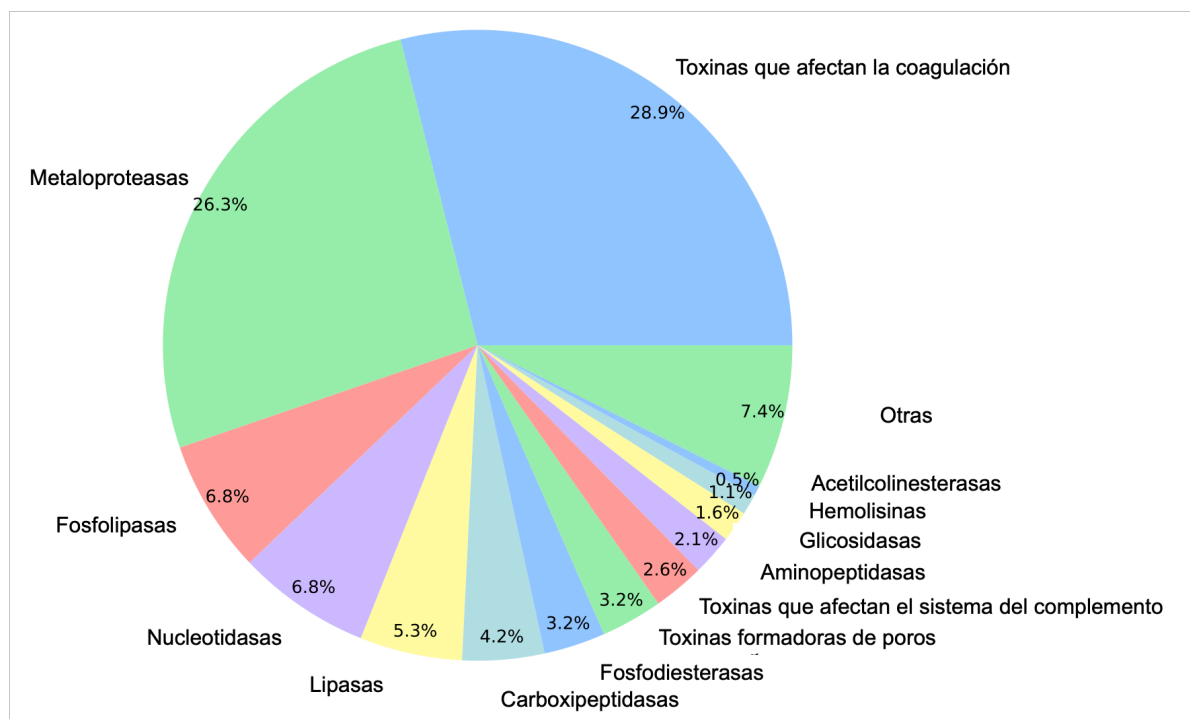
Por otra parte, la expresión relativa de los genes seleccionados de forma aleatoria para la validación fue consistente con los resultados observados en el análisis de expresión pareado tal y como se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Niveles de expresión relativa de los genes usados para la validación. SOD) superóxido dismutasa, MET) zinc metaloproteasa, MIO) miosina, HSP) proteína de choque térmico de 10 kDa y CCH) subunidad beta-2 del canal de calcio voltaje dependiente tipo L. Las validaciones se realizaron con PCR semicuantitativa. Mcn) *M. complanata* normal. Mcb) *M. complanata* blanqueado. Los asteriscos indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

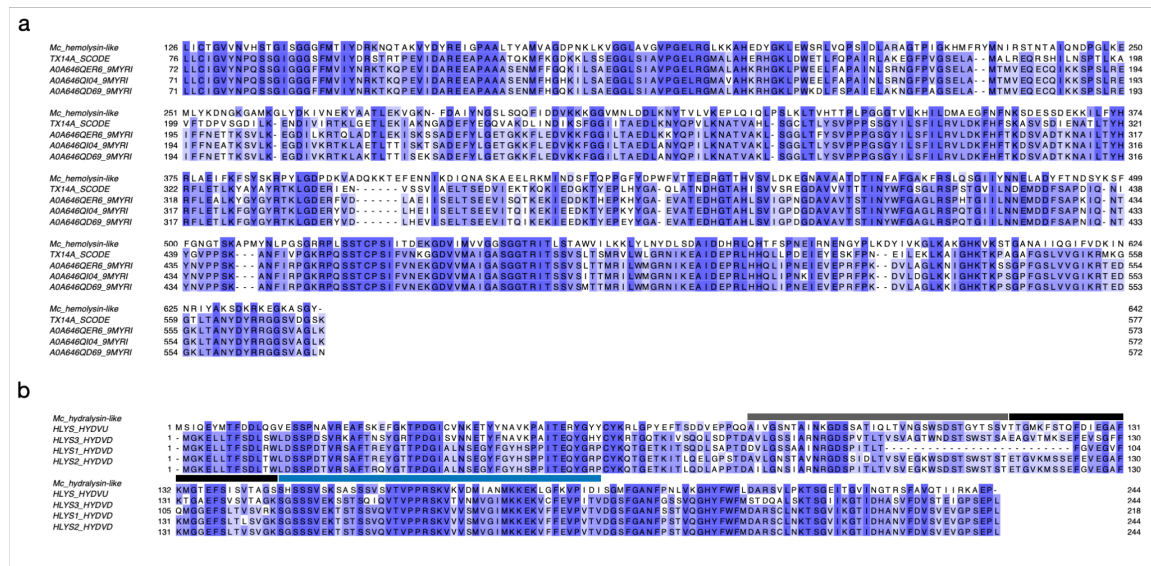
### 8.10. Detección de toxinas putativas

Un total de 2 475 960 proteínas hipotéticas fueron predichas a partir del transcriptoma de *M. complanata*. Estas secuencias fueron anotadas contra la base de datos Animal Toxins Annotation Project del UniprotKB y se obtuvieron 3024 hits. Después de la filtración de las secuencias, 190 toxinas putativas fueron identificadas. De acuerdo con su función molecular, las toxinas putativas se agruparon de la siguiente manera: metaloproteasas, toxinas que afectan la hemostasia, fosfolipasas, nucleotidasas, lipasas, carboxipeptidasas, fosfodiesterasas, proteínas formadoras de poro, toxinas que afectan el sistema del complemento, aminopeptidasas, glicosidasas, acetilcolinesterasas, entre otras. La distribución de las toxinas putativas identificadas a partir del transcriptoma de *M. complanata* se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Diversidad de toxinas putativas encontradas en el transcriptoma de *M. complanata*

De acuerdo con los análisis de alineamiento múltiple, algunas secuencias como hemolisinas y toxinas formadoras de poro comparten una alta similitud estructural con toxinas previamente reportadas. Dos alineamientos representativos de una toxina del tipo hemolisina y una hidralisina se muestran en la Figura 14.



**Figura 14.** A) Alineación de secuencias múltiples entre una proteína similar a hemolisina de *M. complanata* y cuatro toxinas de ciempiés (TX14A\_SCODE o Scoloptoxin SSD14, A0A646QER6\_9MYRI, A0A646QD04\_9MYRI y A0A646QD69\_9MYRI) (La conservación de aminoácidos se resalta en azul). B) Alineación de secuencias múltiples entre una toxina tipo hidralisina de *M. complanata* con cuatro hidralisinas (HLYS\_HYDVU, HLYS1\_HYDVU, HLYS2\_HYDVU y HLYS3\_HYDVU). Anotaciones: Motivo que flanquea la parte superior entre las posiciones 80–115 (línea gris); región responsable de la formación de poros transmembranales en las posiciones 116–145 (línea negra); y motivo de franqueo inferior dentro de las posiciones 146–190 (línea azul). (La conservación de aminoácidos está resaltada en azul).

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Mecanismo de resistencia al blanqueamiento y su asociación con la diversidad de simbioses

A pesar de que los hidrocorales son considerados los segundos organismos más importantes implicados en la formación de arrecifes de coral (Lewis, 2006), estos organismos han sido pobremente estudiados. Particularmente, el efecto del cambio climático en las especies de *Millepora* no se ha abordado de forma integral. En este trabajo de investigación, describimos por primera vez, las diferencias observadas a nivel transcriptómico entre holobiontes del coral *M. complanata* normales y blanqueados, los cuales estuvieron expuestos a la oscilación sureña el Niño 2015-2016, lo cual causó un aumento anormal en la temperatura del agua del mar y provocó eventos de blanqueamiento masivos alrededor del mundo (Romero-Torres et al., 2020). De acuerdo con reportes de mortalidad y blanqueamiento observados durante 1987, 1993, 1995, 1998, 2003 y 2003, *M. complanata* se encuentra identificado como una especie muy sensible ante el estrés ocasionado por aumentos en la temperatura (McClanahan et al., 2009). Aquí, demostramos que muestras blanqueadas de *M. complanata* mostraron una disminución significativa en el contenido de clorofilas totales debido a la pérdida de simbioses (Figura 1c). Resultó interesante el hecho de que, a pesar de las altas temperaturas registradas para el agua de mar en Noviembre del 2016 (Figura 1a), algunos hidrocorales, recolectados de forma simultánea, de colonias de la misma zona y profundidad, no experimentaron blanqueamiento, lo cual indica una variación intraespecífica en *M. complanata* con respecto a la tolerancia frente al blanqueamiento. Un conocido mecanismo de resistencia al blanqueamiento está relacionado con la diversidad y abundancia de simbioses de la familia Symbiodiniaceae (Swain et al., 2018). Se ha demostrado, en especies de la clase Anthozoa, que la presencia de géneros termotolerantes de algas de la familia Symbiodiniaceae (como por ejemplo *Durisdinium* y *Cladocopium*) potencian las respuestas moleculares ante el blanqueamiento (Chen et al., 2020; Poquita-Du et al., 2020; Qin et al., 2019). Sin embargo, una alta variación relacionada a la termotolerancia puede ser observada

dentro de cepas de simbioses del mismo género. A pesar de que *M. complanata* ha sido catalogado como una especie vulnerable ante el estrés térmico y el blanqueamiento, la susceptibilidad de las especies de Symbiodiniaceae albergadas por este organismo no ha sido descrita anteriormente. La presencia de los géneros *Symbiodinium* y *Breviolum* fue esperada (muestras Mcn1, Mcn2, Mcn3, Mcb3 y Mcb5), ya que previos estudios indicaron que *M. complanata* de México, Belice, Barbados y Colombia albergan este tipo de simbioses. Sin embargo, las algas de los géneros *Cladocopium* y *Durusdinium* no han sido previamente identificadas en este organismo del Mar Caribe (Banaszak et al., 2006; Finney et al., 2010; Grajales & Sanchez, 2016; LaJeunesse, 2002). Investigaciones previas han demostrado que la dominancia de los endosimbioses depende fuertemente de la localización geográfica (Finney et al., 2010; Grajales & Sanchez, 2016; LaJeunesse, 2002). Por ejemplo, las especies de *Breviolum* son dominantes en *M. complanata* y *M. alcicornis* que habitan arrecifes de las Bahamas, mientras que las especies de *Symbiodinium* son prevalentes en hidrocorales que se encuentran en barreras arrecifales de Belice (Samayoa et al., 2017). Además, se ha demostrado que la profundidad también modifica la diversidad de los simbioses albergados en los tejidos de *M. complanata* (Finney et al., 2010). Evidentemente, la diversidad de simbioses de la familia Symbiodiniaceae en los hidrocorales depende del hábitat del arrecife, como en el caso de los constructores de arrecifes de la clase Anthozoa. Es este estudio, la presencia de las especies de *Durusdinium* y *Cladocopium* en muestras de *M. complanata* no blanqueadas puede estar asociada a la mayor resistencia que estos organismos mostraron ante el blanqueamiento, como se ha observado en antozoos (Pettay & Lajeunesse, 2009; Stat & Gates, 2011). Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada.

## 9.2. Implicaciones del aislamiento de ARN funcional en hidrocorales

Considerando que los ácidos nucleicos intactos y de alta pureza son esenciales para el adecuado funcionamiento de las nuevas técnicas de biología molecular en la era de las ómicas, en el presente estudio, se compararon ocho métodos de

aislamiento para ARN con el propósito de obtener ARN íntegro y funcional a partir del hidrozoo *M. complanata*. El primer paso en esta estrategia consistió en la remoción del tejido del hidrocoral del exoesqueleto calcáreo. Para llevar a cabo esta meta, se empleó un rallador de vidrio marca Dremel, el cual permitió la obtención de tejido de manera fácil, efectiva y que permite manipular las muestras durante el menor tiempo posible en comparación con otros protocolos previamente descritos, tales como molienda o cepillado con aire (McCowan et al., 2011). Una vez obtenido el tejido necesario, se procedió a la extracción de ARN y se realizó una comparación entre los ocho métodos evaluados en este trabajo.

Uno de los procedimientos empleados fue extracción con Trizol, metodología descrita por primera vez en 1987 por Piotr Chomczynski y Nicoletta Sacchi como una técnica de un solo paso para obtener ARN (Chomczynski & Sacchi, 1987). En el campo de la investigación de organismos marinos, la extracción con Trizol ha sido ampliamente utilizada para obtener, tanto ARN, como proteínas principalmente de organismos suaves como anémonas y medusas. Esta metodología comprende una extracción sencilla usando una mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, la cual es bastante útil para obtener altos rendimientos de ARN puro y sin degradar. También, la literatura científica provee un largo repertorio de modificaciones a esta metodología. Algunas de las modificaciones sugieren el uso de diferentes concentraciones de etanol o sales inorgánicas para favorecer la precipitación del ARN. En el caso del presente trabajo, los procedimientos evaluados empleando el reactivo de Trizol (métodos 1-3) mostraron bajas concentraciones de ARN y relaciones 260/280 no deseables. Particularmente, la concentración obtenida con el método 3, la cual involucró la purificación de ARN por cromatografía de afinidad, fue bastante baja ( $15.3 \pm 2.7$  ng/ $\mu$ L).

Por otra parte el método de CTAB, desarrollado por Doyle en 1990 ha demostrado ser un procedimiento eficiente para extraer ADN y ARN de plantas (Jobes et al., 1995), particularmente de aquellas con un alto contenido de polisacáridos (Gambino



et al., 2008) y polifenoles (Porebski et al., 1997). Esta metodología también ha sido empleada para el aislamiento de ADN y ARN de anthozoos (Dellacorte, 1994). En este estudio, utilizando dos protocolos basados en el método de CTAB (métodos 6 y 7) se obtuvieron concentraciones de RNA menores a 100 ng/ $\mu$ L y la medición de los cocientes 260/280 resultó en una alta variabilidad (de 1.3 a 2.2, aproximadamente). Estos resultados indican que las muestras de ARN obtenidas por estos procedimientos, contienen impurezas, la mayoría probablemente compuestos de naturaleza proteica.

A la fecha, los kits comerciales de extracción de RNA están diseñados para acelerar y simplificar el proceso de extracción de ácidos nucleicos. Estos kits son muy efectivos para obtener RNA de alta calidad de órganos, tejidos, levaduras, cultivos celulares e inclusive de matrices complejas como médula ósea o de suelo (Carvalhais et al., 2012; Langebrake et al., 2006). Nosotros empleamos el kit RNeasy, el cual cuenta con varias ventajas metodológicas, por ejemplo, usando este kit es posible evitar las particiones usando fenol-cloroformo y eliminar las precipitaciones con etanol o LiCl, además de que no se requiere el uso de gradientes de CsCl. Sin embargo, en nuestro caso las muestras de los tejidos de hidrocoral permitieron la obtención de concentraciones muy bajas de ARN ( $51.1 \pm 1.0$  ng/ $\mu$ L) con un valor 260/280 de  $1.7 \pm 0.01$ . Con base en estos resultados, es evidente que el kit comercial evaluado no resultó apropiado para extraer ARN a partir de *M. complanata* y probablemente no sea útil para otros hidrocorales.

Uno de los principales problemas durante el procesamiento de muestras de corales e hidrocorales para la extracción de biomoléculas es la presencia del  $\text{CaCO}_3$  y las algas simbiotes. Estas últimas poseen una pared celular constituida principalmente por polisacáridos, los cuales son contaminantes indeseados durante la obtención de muestras de ADN y ARN. Los polisacáridos son extremadamente difíciles de remover o eluir, debido a la presencia de varios donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, y también debido a que tienen propiedades iónicas similares a las del ARN. En este trabajo de investigación se empleó el método de extracción con ácido

bórico (método 4), además de una modificación del procedimiento a partir de una técnica previamente descrita para aislar ARN de los frutos de *Opuntia sp.* (método 5), los cuales contienen altas concentraciones de polisacáridos (Valderrama-Cháirez et al., 2002). Esta metodología nos permitió obtener la concentración más alta de ARN ( $359.6 \pm 21.5$  ng/ $\mu$ L) y a su vez los mejores valores del cociente 260/280 ( $2.01 \pm 0.01$ ). Además, las muestras de ARN obtenidas con el método 5 mostraron una alta integridad de las bandas ribosomales 18S y 28S en los geles de agarosa y un valor de RIN de  $6.4 \pm 0.07$ . Con respecto a la funcionalidad de estas muestras, el ADNc fue sintetizado y la amplificación del gen SAM se logró satisfactoriamente. Teniendo en cuenta lo mencionado con anterioridad, se consideró al método 5 como un procedimiento exitoso que puede ser empleado para obtener ARN de alta calidad de muestras de hidrocorales y otros formadores de arrecifes pétreos.

### 9.3. Composición del holobionte de *Millepora* spp

La asignación taxonómica de las secuencias mostraron un radio 2:2:1 (hidrocoral-simbionte-microbioma) para el holobionte *M. complanata*. Estos resultados sugieren que este metaorganismo se constituye principalmente de elementos provenientes del cnidario y el alga simbiote, mientras que el microbioma constituye una pequeña fracción de la población del holobionte. Relaciones similares de la composición hospedante/simbionte se han observado para corales escleractíneos como *Porites australiensis* (Shinzato et al., 2014). Además, existe evidencia que demuestra la importante contribución del microbioma a los corales holobiontes para la supervivencia y el desempeño de funciones vitales (Sogin et al., 2017). Aquí, presentamos el primer reporte de la contribución microbiana del holobionte *M. complanata*, sin embargo, considerando la baja representación de secuencias bacterianas que se pudieron encontrar en esta investigación, se necesitan nuevos estudios transcriptómicos cuyos objetivos moleculares sean el ARN procarionte con la finalidad de obtener una caracterización más amplia del microbioma de las especies de *Millepora*. Por otra parte, los términos de ontología de genes que se recuperaron de las secuencias separadas para cada componente del holobionte

mostraron diferencias marcadas en cuanto a las subontologías BP, CC y MF. En el análisis de las vías metabólicas se determinó que algunos procesos como el metabolismo de tiamina, el metabolismo de sacarosa y el metabolismo de arginina y prolina fueron prevalentes. Estos resultados representan el primer acercamiento a los procesos metabólicos que continúan activos en el holobionte *M. complanata* durante el blanqueamiento

#### 9.4. Diferencias transcripcionales y posibles mecanismos de respuesta durante el blanqueamiento en *M. complanata*

El análisis de expresión diferencial reveló cambios significativos ( $FDR < 0.05$ ) en la expresión de 299 genes en muestras blanqueadas, las cuales experimentaron blanqueamiento durante el fenómeno de El Niño 2015-2016. Las categorías funcionales enriquecidas para los genes diferenciales incluyeron: ribosoma, chaperona, oxidoreductasa, helicasa, RNA polimerasa, entre otros (Figura 11). Algunas categorías enriquecidas durante el blanqueamiento en *M. complanata* se discuten a continuación.

##### 9.4.1. Traducción y transcripción

El presente estudio provee evidencia de que las muestras blanqueadas de *M. complanata* mostraron cambios transcriptómicos significativos asociados a la síntesis de proteínas. El término Ribosoma fue una de las categorías que se vio más enriquecida ( $p < 0.05$ ) en Mcb. La mayoría de los genes expresados diferencialmente relacionados con la biosíntesis de proteínas mostraron un aumento en su expresión (por ejemplo 40S proteína ribosomal S20, 60S proteína ribosomal L15, 40S proteína ribosomal S14, etc.), y solamente tres genes resultaron con expresión disminuida (Factor de elongación 1-alfa, Complejo catalítico de péptido señal de la subunidad SEC11C, y 60S proteína ribosomal ácida P0). Una reducción en la expresión de los genes de la síntesis de proteínas ha sido previamente observada en los anthozoos *Orbicella faveolata* y *Montastraea faveolata* como parte de una respuesta inmediata al estrés térmico (Pinzón et al.,

2015; Voolstra et al., 2009). Mientras que algunos componentes estructurales de los ribosomas, como la proteína ribosomal L24, fueron regulados a la alza en *M. faveolata* (Rosic et al., 2011). Por otra parte, varios estudios transcriptómicos han probado que la regulación de la transcripción es afectada directamente durante el blanqueamiento de los corales (DeSalvo et al., 2008, 2010; Rosic et al., 2011; Souter et al., 2011). De hecho, varios módulos transcripcionales, relacionados con funciones celulares variadas (por ejemplo, secuencia específica de unión al ADN, actividad motora, estructura de la matriz extracelular, etc.) se han correlacionado significativamente con el blanqueamiento (Thomas & Palumbi, 2017). Nuestros resultados muestran que la RNA polimerasa y los factores basales de la transcripción se vieron enriquecidos en las muestras blanqueadas. Particularmente, siete genes involucrados en procesos de transcripción mostraron un aumento en su expresión en Mcb y solamente dos genes fueron regulados a la baja. Estos resultados indican que las muestras de hidrocorales blanqueados no mostraron una baja expresión de genes relacionados a los procesos de transcripción y traducción, como se ha observado en corales de la clase Anthozoa. Estos hallazgos podrían implicar que existen variaciones en cuanto a la respuesta al estrés térmico entre hidrozoos y organismos de la clase Anthozoa.

#### 9.4.2. Transporte celular

Siete genes relacionados con el transporte celular mostraron un aumento en su expresión en Mcb: Miembro 2 de la subfamilia A del casete de unión a ATP, proteína RER1, subunidad Sec61 beta de proteína de transporte, proteína corporal multivesicular cargada 7, Subunidad beta-2 del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, etc. Estos resultados concuerdan con un estudio previo realizado en *Pocillopora damicornis* sometido a estrés térmico, en el cual se observó un aumento en la regulación de transportadores de iones como los canales de calcio dependientes de voltaje (Crowder et al., 2017). Se ha observado que los canales de calcio participan de forma activa en el proceso de calcificación de algunas especies de escleractíneos. Particularmente, los canales voltaje dependientes de calcio se

han asociado directamente al transporte transepitelial de calcio y a la formación del carbonato de calcio (Zoccola et al., 1999). Algunas investigaciones han probado que el bloqueo de los canales de calcio  $Ca_v1$  disminuyen de forma significativa la calcificación en *Stylophora pistillata* y *Galaxea fascicularis* (Marshall, 1996; Tanbutté et al., 1996). Por lo tanto, es probable que la regulación al alza de genes asociados con el transporte de calcio y señalización en *Mcb* está relacionado con una optimización de los procesos celulares involucrados en la deposición o el transporte del calcio.

#### 9.4.3. Respuesta antioxidante

Se ha demostrado ampliamente que las enzimas antioxidantes constituyen la primera línea de defensa de los cnidarios formadores de arrecifes, de la clase Anthozoa, contra el estrés térmico y la radiación UV. Particularmente, la superóxido dismutasa, la catalasa y la ascorbato peroxidasa juegan un papel clave, tanto para el hospedante como para el simbiote, como parte de la respuesta antioxidante durante el blanqueamiento (Downs et al., 2002; Hawkins et al., 2015; Krueger et al., 2015; Lesser, 1997, 2011; Lesser et al., 1990; Oakley & Davy, 2018). Estas enzimas contribuyen de forma importante para el mantenimiento de la homeostasis entre el cnidario y el simbiote, ya que neutralizan las especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de estrés (Szabó et al., 2020). Investigaciones realizadas en *Acropora millepora* y *Montipora digitata* indican que el estrés térmico induce un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes (Krueger et al., 2015; Souter et al., 2011). En este estudio, las oxidoreductasas se fueron altamente representadas y observamos un aumento en la regulación de la enzima superóxido dismutasa en muestras de *M. complanata* que experimentaron blanqueamiento. Esta respuesta al estrés por calor, es similar a la observada en especies de Anthozoa (Downs et al., 2002). Además de un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes, los niveles altos de proteínas de choque térmico ha sido considerado como un mecanismo molecular de respuesta común entre corales escleractíneos sometidos a estrés por calor (Rosic et al., 2011). Las proteínas de choque térmico son responsables del

mantenimiento de funciones celulares críticas como el transporte de proteínas, degradación, agregación, y el plegamiento y desplegamiento bajo condiciones de estrés (Sørensen et al., 2003). Además, las proteínas chaperonas juegan un papel crucial en la protección celular contra el daño inducido por el estrés térmico (Black et al., 1995; Fang et al., 1997; Hayes & King, 1995). En la presente investigación, encontramos que la expresión de una proteína de choque térmico de 10 kDa fue regulada al alza ( $p < 0.05$ ) en Mcb. Seveso y colaboradores demostraron que las especies *Goniopora lobata*, *Porites lobata*, *Seriatopora hystrix* y *Stylophora pistillata* poseen una regulación significativa, dependiente de la especie, en la expresión de proteínas de choque térmico en respuesta al blanqueamiento (Seveso et al., 2020). Adicionalmente, la proteína de choque térmico PdHSP70, cuya expresión es inducida por altas temperaturas, ha sido considerada como un elemento esencial en la prevención del blanqueamiento en el coral *Pocillopora damicornis* (Y. Zhang et al., 2018). El aumento en la expresión de genes relacionados con las respuestas antioxidante y de choque térmico en Mcb es indicativo de una activación de procesos celulares ante el estrés térmico. La superóxido dismutasa y la proteína de choque térmico de 10 kDa podrían representar marcadores bioquímicos importantes para el monitoreo de los efectos inducidos durante el blanqueamiento en organismos del género *Millepora*.

#### 9.5. Diversidad de toxinas en el transcriptoma de *M. complanata*

Los cnidarios son conocidos como los organismos más venenosos del planeta, cuya producción de toxinas es de vital importancia para su supervivencia (Šuput, 2009). Aquí, exploramos la diversidad de toxinas sintetizadas por el “coral de fuego” *M. complanata* mediante el análisis de las secuencias codificantes con posible actividad tóxica. El término “actividad de toxina” fue prevalente entre las anotaciones y un total de 190 secuencias se asemejan a toxinas previamente reportadas. Estos resultados corroboran la diversidad de toxinas que hasta la fecha se han reportado para cnidarios del género *Millepora* (García-Arredondo et al., 2015; Hernández-Elizárraga et al., 2019; Rojas et al., 2002; Rojas-Molina et al., 2012).

En este estudio bioinformático, determinamos que las metaloproteasas, las toxinas que afectan la hemostasis y las fosfolipasas son componentes mayoritarios del arsenal tóxico sintetizado por *M. complanata*. A pesar de que el efecto hemolítico y la actividad de PLA2 han sido efectos descritos para especies de *Millepora* (Middlebrook et al., 1971; Radwan & Aboul-Dahab, 2004; Shiomi et al., 1989), la presencia de secuencias asociadas con nucleotidasas, lipasas, carboxipeptidasas, fosfodiesterasas, PFTs, toxinas que afectan el sistema del complemento, aminopeptidasas, glicosidasas y acetilcolinesterasas fueron evidenciadas por primera vez para un organismo del género *Millepora*. Nuestro estudio mostró que más del 50% de las toxinas putativas corresponden a metaloproteasas y toxinas que afectan la hemostasis. Un estudio previo, realizado a partir del transcriptoma del tentáculo de la medusa *Chrysaora fuscescens* reveló una mayor abundancia de genes codificantes para metaloproteasas, lo cual se ha asociado con la inflamación y la disrupción de los tejidos durante la picadura de este organismo (Balasubramanian et al., 2012). Investigaciones posteriores del transcriptoma de la medusa *Cyanea capillata* también revelaron una alta abundancia de transcritos codificantes para metaloproteasas (Liu et al., 2015). Nuestro estudio indica que las metaloproteasas son componentes claves del veneno de hidrocorales, de manera similar a lo que se ha observado con otros cnidarios como las medusas.

Por otra parte, las toxinas hemorrágicas y hemostáticas son componentes comunes de los venenos de crustáceos, insectos que se alimentan de sangre, sanguijuelas, serpientes y algunos cnidarios. Por ejemplo, se ha encontrado que los transcriptomas de cuatro especies de ceriántidos (*Pachyceriantus* cf. *maua*, *Isarachnanthus nocturnus*, *Ceriantheomorpha brasiliensis*, y *Pachycerianthus borealis*) poseen más del 30% de transcritos relacionados con toxinas hemostáticas y hemorrágicas (Klompen et al., 2020). Los resultados del estudio del transcriptoma de *M. complanata* indican que las toxinas que afectan la hemostasia también

podrían jugar un papel importante en los mecanismos de toxicidad inducidos por los “corales de fuego” durante la captura de presas y la defensa ante depredadores.

Uno de los principales efectos biológicos demostrados para los extractos y venenos de los hidrocorales es la actividad hemolítica que producen en eritrocitos de diferentes especies. Sin embargo, la estructura química de las hemolisinas que son sintetizadas por estos organismos no han sido caracterizadas. Una toxina hemolítica y una PFT putativas identificadas en el transcriptoma de *M. complanata* se seleccionaron para el análisis de alineamiento múltiple con la finalidad de identificar motivos estructurales que pudieran ser similares a los de otras toxinas previamente reportadas.

Se observó conservación de aminoácidos entre una proteína similar a la hemolisina (longitud de 642 aminoácidos) de *M. complanata* y cuatro toxinas de ciempiés: una de una hemolisina del ciempiés *Scolopendra dehaani* tailandés (TX14A\_SCODE o Scoloptoxin SSD14) y tres de *Hemiscolopendra marginata* (A0A646QER6\_9MYRI, A0A646QI04\_9MYRI, A0A646QD69\_9MYRI) (Figura 14A). Anteriormente se descubrió que la escoloptoxina SSD14 provocó una agregación de plaquetas humanas dependiente de la dosis (respuesta máxima a 3,2 µg/mL) e indujo hemólisis en eritrocitos de ratones y conejos (35 y 65 % a 5 µg/mL, respectivamente) (Sher et al., 2005). Además, se identificó una toxina similar a la hidralisina (longitud de 244 aminoácidos) a partir del transcriptoma de *M. complanata*. Esta secuencia proteica fue similar a la de las hidralisinas de la hidra verde *Chlorohydra viridissima*. Las hidralisinas y sus homólogos comparten un grupo de motivos conservados con toxinas formadoras de poros conocidas, como las aerolisinas (Sher et al., 2005). La toxina similar a hidralisina de *M. complanata* detectada en este trabajo mostró motivos de secuencia conservados de cuatro hidralisinas (HLYS\_HYDVU, HLYS1\_HYDVU, HLYS2\_HYDVU y HLYS3\_HYDVU) (Figura 14B). Específicamente, se identificaron tres motivos conservados característicos (resaltados en azul) de aerolisinas en la toxina similar a hidralisina



de *M. complanata*: a) el motivo flanqueante superior entre las posiciones 80–115 (línea gris); b) la región responsable de la formación de poros transmembrana en las posiciones 116–145 (línea negra); y c) el motivo de franqueo inferior dentro de las posiciones 146–190 (línea azul) (Figura 14B) (Sher et al., 2005, 2008; M. Zhang et al., 2003). Estos resultados sugieren que las PFTs, como las hidralisinas, pueden ser sintetizadas por *M. complanata* y podrían mostrar mecanismos de formación de poros similares a los de las aerolisinas. Además, es muy probable que las proteínas relacionadas estructuralmente con este tipo de toxinas contribuyan a la hemólisis inducida por los venenos de *Millepora*.

## 10.CONCLUSIÓN

Hasta la fecha, no se ha reportado un método que permita la obtención de ARN de alta calidad a partir de hidrocorales del género *Millepora*, los cuales son muy relevantes desde una perspectiva ecológica y toxicológica. En este estudio, proponemos, por primera vez, un protocolo para el aislamiento de ARN de tejidos de hidrocorales, que comprende el uso de una metodología de extracción de ácido bórico modificada. Las muestras de ARN obtenidas siguiendo este procedimiento mostraron adecuadas concentraciones de ARN y valores de relación 260/280, así como buena integridad y funcionalidad. Por lo tanto, este método se puede utilizar con éxito para la extracción de ARN de alta calidad de cnidarios formadores de arrecifes.

Aunque las especies de *Millepora* se encuentran entre los organismos constructores de arrecifes más gravemente afectados por las perturbaciones ambientales antropogénicas, hasta ahora se sabe muy poco sobre los mecanismos celulares mediante los cuales estos organismos hacen frente al estrés inducido por el aumento de la temperatura del océano y la radiación ultravioleta. Nuestros hallazgos sugieren que, incluso en ausencia de algas Symbiodiniaceae, los hidrocorales son capaces de llevar a cabo funciones esenciales, incluidas en las categorías de ontología génica, tales como: ribosoma, ARN polimerasa y factores de transcripción basales, chaperonas, oxidoreductasa, transporte, entre otros. Este es un estudio pionero sobre la respuesta transcripcional de las especies de hidrozoos durante el blanqueamiento por calor, que contribuirá a futuras investigaciones destinadas a obtener una visión más profunda de los mecanismos de respuesta celular general de los hidrozoos que forman arrecifes y sus estrategias de adaptación y aclimatación frente a perturbaciones como el cambio climático.

En este estudio, determinamos la diversidad de toxinas del "coral de fuego" *M. complanata* utilizando un enfoque de extracción de datos transcriptómicos. Las

metaloproteasas, las toxinas que alteran la hemostasia y las fosfolipasas (incluidas las fosfolipasas A y B) fueron los componentes putativos predominantes de este veneno de este “coral de fuego”. La actividad hemolítica provocada por el proteoma de nematocistos de este hidrocoral se puede atribuir a la presencia de proteasas tóxicas y PLA2. Este es el primer informe sobre la diversidad de toxinas de los venenos producidos por especies de *Millepora*, lo que contribuirá a ampliar nuestra comprensión de los mecanismos que subyacen a los efectos tóxicos producidos por estos cnidarios tan importantes. Además, se evidenció el potencial de estos hidrocorales como fuente valiosa de biomoléculas estructural y funcionalmente diversas.

## 11. PUBLICACIONES

Este trabajo de investigación derivó en tres artículos de investigación originales, los cuales se mencionan a continuación:

- 1) Hernández-Elizárraga, V. H., Olgúin-López, N., Hernández-Matehuala, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., & Rojas-Molina, A. (2021). Comprehensive Metatranscriptome Analysis of the Reef-Building Holobiont *Millepora complanata*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 149.
- 2) Hernández-Elizárraga, V. H., Ocharán-Mercado, A., Olgúin-López, N., Hernández-Matehuala, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., & Rojas-Molina, A. (2022). New Insights into the Toxin Diversity and Antimicrobial Activity of the “Fire Coral” *Millepora complanata*. *Toxins*, 14(3), 206.
- 3) Hernández-Elizárraga, V. H., Olgúin-López, N., Hernández-Matehuala, R., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., & Rojas-Molina, A. Transcriptomic differences between bleached and unbleached *Millepora complanata* following the 2015-2016 “El Niño” Southern Oscillation 2015-2016 in the Mexican Caribbean. (Artículo enviado a la revista *PeerJ* el 13 de abril del 2022).



# Comprehensive Metatranscriptome Analysis of the Reef-Building Holobiont *Millepora complanata*

Victor Hugo Hernández-Elizárraga<sup>1</sup>, Norma Olguín-López<sup>1</sup>, Rosalina Hernández-Matehuala<sup>1</sup>, Juan Caballero-Pérez<sup>2</sup>, César Ibarra-Alvarado<sup>3</sup> and Alejandra Rojas-Molina<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Mexico, <sup>2</sup> Databiology Ltd., Oxford, United Kingdom, <sup>3</sup> Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Mexico

**Keywords:** *Millepora complanata*, Symbiodiniaceae, metatranscriptomic analysis, RNAseq, reef-building cnidarians

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Carla Zilberberg,  
Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

### Reviewed by:

Jian-Wen Qiu,  
Hong Kong Baptist University,  
Hong Kong  
Konstantin Khalturin,  
Okinawa Institute of Science and  
Technology Graduate  
University, Japan

### \*Correspondence:

Alejandra Rojas-Molina  
rojas@uaq.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Coral Reef Research,  
a section of the journal  
Frontiers in Marine Science

**Received:** 29 May 2020

**Accepted:** 04 February 2021

**Published:** 26 February 2021

### Citation:

Hernández-Elizárraga VH,  
Olguín-López N,  
Hernández-Matehuala R,  
Caballero-Pérez J, Ibarra-Alvarado C  
and Rojas-Molina A (2021)  
Comprehensive Metatranscriptome  
Analysis of the Reef-Building  
Holobiont *Millepora complanata*.  
Front. Mar. Sci. 8:566913.  
doi: 10.3389/fmars.2021.566913

## INTRODUCTION

Hydrocorals from the genus *Millepora* (Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa) are conspicuous organisms commonly found in shallow waters of tropical regions. These cnidarians, which are considered the second reef builders in the world (Rojas-Molina et al., 2012), are vital components of marine ecosystems and provide habitat for many coral reef-dependent communities (Lewis, 2006).

The genus *Millepora* includes calcareous hydroids that are not classified in the group of true stony corals (Radwan and Aboul-Dahab, 2004). Milleporids are commonly known as “fire corals” due to their ability to inflict painful wounds in human epithelial tissues through the secretion of toxins (Radwan, 2002), which are stored in the nematocysts (Shiomi et al., 1989; David et al., 2008).

*Millepora complanata* is a common resident of the Mesoamerican Reef System in the Mexican Caribbean (Ibarra-Alvarado et al., 2007). This organism inhabits shallow water and the reef crest (Stromgren, 1976) where it forms plate-like colonies composed of multiple clones (Lewis, 1991). Like many scleractinian corals and other cnidarians, *M. complanata* lives in mutualistic symbiosis with dinoflagellate algae of the family Symbiodiniaceae (commonly known as zooxanthellae) (Davy et al., 2012).

Dinoflagellates reside in the symbiosomes, which are phagosome-derived vacuoles within cnidarian gastrodermal cells (Lehnert et al., 2014). Symbiodiniaceae algae provide photosynthetic fixed carbon to their host, in exchange, cnidarians supply their symbionts with nitrogenous compounds (Sproles et al., 2018). Within host tissues, coral-associated symbionts may reach population densities of several millions per square centimeter and the holobiont may contain more than one Symbiodiniaceae genus (LaJeunesse, 2002). Diverse studies have analyzed the symbiotic relationship between stony corals (class Anthozoa) and their symbionts (Furla et al., 2005; Davy et al., 2012; Gusmão et al., 2020; Tivey et al., 2020; Xiang et al., 2020). However, hydrocoral-Symbiodiniaceae symbiosis is poorly understood. Investigations on the mutualistic relationship between reef-building cnidarians and Symbiodiniaceae algae have increased in the “omics age” (Meyer and Weis, 2012; Bi et al., 2019; Simona, 2019) and the sea anemone *Exaiptasia diaphana*, formerly known as *Aiptasia pallida*, has been widely employed as a model to study cnidarian endosymbiosis (Lehnert et al., 2012; Tortorelli et al., 2020). A gene expression analysis of cnidarian-algae association in *Anthopleura elegantissima* evidenced a complex modulation of host gene expression related to oxidative stress, apoptosis, cell proliferation, cell adhesion, and lipid metabolism (Rodríguez-Lanetty et al., 2006).

It has been demonstrated that reef-building cnidarians are also associated with a diverse community of bacteria and other microorganisms (Tandon et al., 2020). These microorganisms are key components of the coral holobiont and play a major role in nutrient cycling, which is fundamental for reef development (Rajasabapathy et al., 2020).

Environmental stressors, such as UV radiation and high temperature can lead to “bleaching,” the disruption of the symbiosis between cnidarians and Symbiodiniaceae (Hughes et al., 2017). Unfortunately, the frequency and seriousness with which bleaching occurs have increased in recent years, seriously compromising coral populations around the world (Sully et al., 2019). Considering that perturbations induced by climate change have threatened the integrity and resilience of marine ecosystems, several investigations have analyzed the bleaching phenomenon, using transcriptomic approaches to understand the molecular mechanisms underlying the responses of cnidarians and symbionts to heat stress (Mayfield et al., 2011, 2014; Pinzón et al., 2015).

Investigations aimed at characterizing the transcriptomes of reef-building cnidarians have focused on species of the class Anthozoa (Kitchen et al., 2015; Kenkel and Bay, 2017; Pootakham et al., 2018; Veglia et al., 2018; Rivera-García et al., 2019; Ryu et al., 2019; Chiu et al., 2020). Regarding organisms of the class Hydrozoa, analysis of the transcriptomes from *Hydractinia echinata* and *Hydra vulgaris* showed the presence of evolutionary-conserved proteins and hitherto undescribed sequences in metazoans (Soza-Ried et al., 2010; Wenger and Galliot, 2013). However, with respect to *de novo* transcriptome assemblies of cnidarians of the genus *Millepora*, only one study has been reported on the branching hydrocoral *M. alicornis* from the Caribbean (Ortiz-González et al., 2017).

RNA-seq-based transcriptomic approaches have become powerful tools directed toward recognizing all the expressed genes codified by a genome under certain conditions. Additionally, generation of new gene catalogs enables identification of ortholog sequences across related taxa. In this study, we used a metatranscriptomic sequencing approach to describe, for first time, the metatranscriptome of *M. complanata* and its associate symbionts in order to generate a new reference metatranscriptome of reef-building cnidarians of the class Hydrozoa.

## DATA DESCRIPTION

### Sample Collection

Fragments of *M. complanata* colonies (~10 cm) were collected by SCUBA (Self-Contained Underwater Breathing Apparatus) diving at the Parque Nacional Arrecife located in Puerto Morelos, Quintana Roo, México (21°00′00″ and 20°48′33″ North latitude and 86°53′14.40″ and 86°46′38.94″ West longitude), during November 2016 (Permit No PFP/DGOPA-139/15). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and transported to the “Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales in the Universidad Autónoma de Querétaro,” Querétaro, Mexico for RNA isolation.

### RNA Extraction

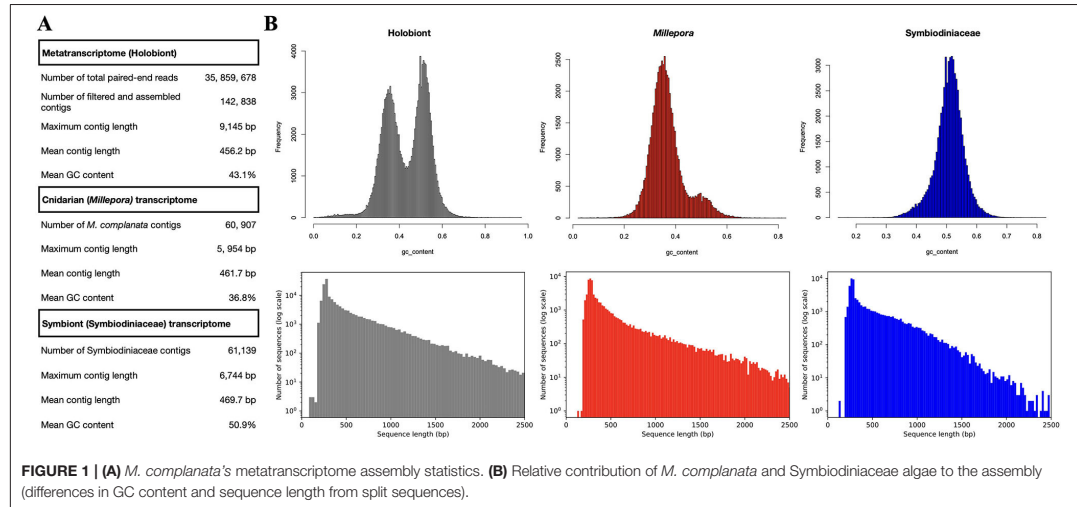
Total RNA from three biologically independent *M. complanata* colonies was extracted according to Valderrama-Cháirez et al. (2002) with some modifications. Briefly, 0.1 g of hydrocoral tissue (previously ground with mortar and pestle in liquid nitrogen) was mixed with 1 mL of extraction buffer (150 mM Tris base, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, and 100 mM EDTA adjusted to pH 7.5 with saturated boric acid). Afterward, 100  $\mu$ L of potassium acetate 5 M, 250  $\mu$ L of absolute ethanol, and 500  $\mu$ L of chloroform-isoamyl alcohol (25:1) were added and mixed by vortex for 1 min. Samples were centrifuged at 12,0E3 rpm for 10 min, the top layer was removed and 500  $\mu$ L of lithium chloride 8 M were added. Samples were stored overnight. Extracted RNA was precipitated by centrifugation at 12,0E3 rpm for 10 min, washed with 250  $\mu$ L of ethanol 70% and re-suspended in sterile water. Isolated RNA was resolved with a 4% agarose electrophoresis gel (run conditions: 75 V during 60 min) and the RNA integrity number was measured with an Agilent™ Eukaryote Total RNA Nano chip. Run results generated by the Nexseq500 sequencing system yielded 39.18 Gbp with high quality reads (78.43%  $\geq$  Q30) in 2  $\times$  150 medium performance plate.

### cDNA Libraries Preparation, Sequencing, and Metatranscriptome Assembly

RNA samples were sent to the “Laboratorio de Servicios Genómicos,” LANGEBIO CINVESTAV-Campus Irapuato for cDNA libraries preparation with Truseq RNA sample prep v2 of Illumina, according to the manufacturer's instructions. Subsequently, cDNA libraries were sequenced on the Illumina NextSeq500™ platform (2x150) generating 35 GB and 120 million reads. Quality control of raw reads was assessed using FASTQC (Brown et al., 2017), none of the libraries showed any issue. Each library was independently assembled with rnaSPAdes (Bankevich et al., 2012). To improve the accuracy of isoform reconstruction after initial assembly, all sample contigs were merged to reduce sequence redundancy using CD-HIT-EST (Li and Godzik, 2006). A unique identifier was assigned to each FASTA sequence of the assembled transcriptome. Raw data obtained from the sequencing was submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database (Bioproject accession: PRJNA524427; Biosample accession: SAMN11026413). Pair-end reads yield displayed as a maximum 16,431,435 reads. FASTQC analysis of all samples showed a GC content of 40.3%. Assembled transcripts resulted in an N50 value of 510 and an average contig length of 480, whereas statistics of transcriptome assemblies previously obtained from *M. alicornis* showed an N50 value of 749 and an average contig length of 550 (Ortiz-González et al., 2017). Metatranscriptomic contigs were annotated in order to separate cnidarian and symbiont transcripts.

### Splitting of the Transcripts and Transcriptome Completeness Estimation

Sequences from *M. complanata* and Symbiodiniaceae were classified by comparing two custom databases. A cnidarian database was constructed using the transcriptomes from



*Millepora alcornis* (ID GFAS01, BIOPROJECT PRJNA344421), *Hydra vulgaris* (ID GGF01, BIOPROJECT PRJNA399692), *Millepora squarrosa* (ID GFGU01, BIOPROJECT PRJNA350711), and *Nematostella vectensis* (ID HADP0, BIOPROJECT PRJEB13676). On the other hand, a database containing the following Symbiodiniaceae transcriptomes was created: *Symbiodinium* sp. (clade A1, ID GAKY01, BIOPROJECT PRJNA206215), *Symbiodinium* sp. (clade A2, ID GBGW01, BIOPROJECT PRJNA237994), *Breviolum* sp. (clade B2, ID GBRZ01, BIOPROJECT PRJNA260330), *Cladocopium* sp. (clade C, ID GBSC01, PRJNA260340), *Cladocopium* sp. (clade C, ID GAFO01, PRJNA175601), uncultured *Cladocopium* sp. (clade C, ID IADM01, BIOPROJECT PRJDB4715), *Durisdinium* sp. (clade D, ID GAFP01, BIOPROJECT PRJNA175600), *Durisdinium* sp. (clade D, ID GBRR01, BIOPROJECT PRJNA260333), uncultured *Durisdinium* sp. (clade D, ID IADN01, BIOPROJECT PRJDB4715), and *Symbiodinium muscatinei* (ID GFDR03, BIOPROJECT PRJNA359147). *M. complanata* metatranscriptome was compared against the customized cnidarian and Symbiodiniaceae databases using Blastn. Python scripts were used for splitting and retrieving confidently identified sequences (e-value threshold of 1.0E-20) from *M. complanata* and Symbiodiniaceae. This procedure enabled assignment of 60,907 (42.6%) sequences to *M. complanata*, and 61,139 (42.8%) sequences to Symbiodiniaceae algae. Completeness of the separated transcriptome sequences was assessed with BUSCO using the Eukaryota database (Simão et al., 2015). Sequences assigned to Cnidaria possessed 75.3% of orthologs from Eukaryota core, whereas Symbiodiniaceae sequences displayed 51.8%. **Figure 1** shows the relative contribution of *M. complanata* and Symbiodiniaceae algae to the assembly. Statistics of split sequences showed that *M. complanata* sequences possessed 36.8% GC content and a maximum contig length of 5,954 bp, whereas symbionts' transcripts exhibited 50.9% GC content and a maximum contig

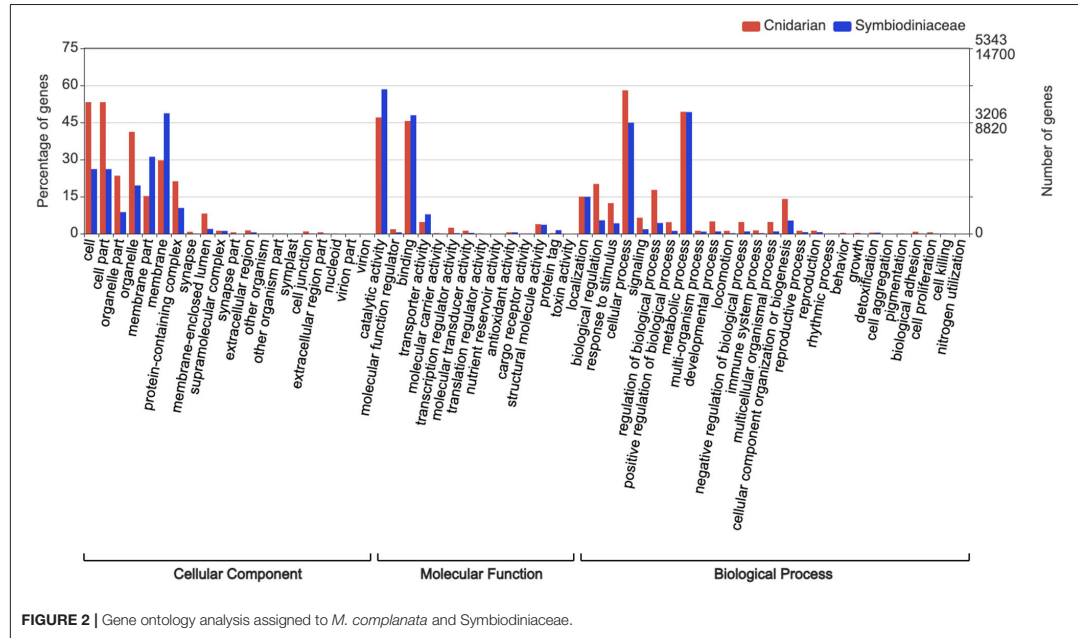
length of 6,744 bp (**Figure 1A**). GC content distribution and the length of split sequences are shown in **Figure 1B**. The assembled transcriptome was submitted to the Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) project of NCBI. This TSA has been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GIXC00000000. The version described in this paper (GIXC01000000) is the first one.

## Functional Annotation and Gene Ontology

All bioinformatic analyses were performed in the Databiology Lab platform (<https://www.lab.databiology.net/>). Sequences were annotated by sequence homology against the NCBI non-redundant database using Diamond (Buchfink et al., 2015) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (e-value threshold of 1.0E-6). The annotation of transcripts for *M. complanata* and Symbiodiniaceae subsets are found in **Supplementary Material** (*M. complanata*\_annotations.xlsx and Symbiont\_annotations.xlsx). Gene Ontology (GO) terms were retrieved from Blastx hits with the Blast2GO software v. 5.2. Sequences were analyzed with "Mapping and Annotation." GO were grouped into Biological Process (BP), Molecular Function (MF), and Cellular Component (CC) domains. GO annotations across sub-ontologies were visualized with WEGO 2.0 (<https://wego.genomics.cn/>). The most over-represented GO terms across sub-ontologies for *M. complanata* were "cell" with 53.2% (CC), "catalytic activity" with 47% (MF), and "cellular process" with 58% (BP). Whereas, the most prevalent GO terms for Symbiodiniaceae were "membrane" with 48.7% (CC), "catalytic activity" with 58.4% (MF), and "metabolic process" with 49.2% (BP) (**Figure 2**).

## Taxonomic Analysis

The assembled metatranscriptome was compared against the NCBI non-redundant database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)



using Diamond (Buchfink et al., 2015) (e-value threshold of 1.0E-6) and MEGAN v. 6.19.8 was employed to perform the taxonomic analysis (Huson et al., 2016). Taxonomy assignments resulted in 61,604 hits, most of them were assigned to Dinophyceae (41.2%), Cnidaria (16.8%), and Proteobacteria (3.8%), the remaining percentage (37.2%) corresponded to non-dominant phyla such as Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Haptista, Ascomycota, Microsporidia, Chordata, Nematoda, Arthropoda, Mollusca, Placozoa, Ciliophora, Perkinsozoa, Bacillariophyta, Oomycota, Chlorophyta, and Streptophyta.

## NOVELTY OF PRESENTED DATA

We describe, for the first time, the metatranscriptome of the *M. complanata* holobiont. After assignment of transcripts, cnidarian and symbiont transcriptomes were classified either as *Millepora* (42.6%) or Symbiodiniaceae (42.8%). Over-represented Dinophyceae hits imply a dominance of symbiotic algae sequences, which indicates that Symbiodiniaceae algae represent a common characteristic of hydrocorals' holobionts. The information obtained from *M. complanata* metatranscriptome will be a key piece for understanding the cellular survival processes, phylogeny, and physiology of milleporids from the class Hydrozoa.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories

and accession number(s) can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, PRJNA524427 and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, GIXC00000000.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

VH-E: conceptualization, investigation, formal analysis, and writing-original draft preparation. NO-L and RH-M: investigation. JC-P: supervision, formal analysis, review, and editing. CI-A: supervision, review, and editing. AR-M: conceptualization, project administration, funding acquisition, review, and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

VH-E acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for his graduate grant (CVU: 709502). The authors acknowledge computer facilities provided by Databiology Ltd. to perform all bioinformatic analyses.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.566913/full#supplementary-material>



## REFERENCES

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Bi, Y., Wang, F., and Zhang, W. (2019). Omics analysis for dinoflagellates biology research. *Microorganisms* 7:288. doi: 10.3390/microorganisms7090288
- Brown, J., Pirrung, M., and McCue, L. A. (2017). FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics* 33, 3137–3139. doi: 10.1093/bioinformatics/btx373
- Buchfink, B., Xie, C., and Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. doi: 10.1038/nmeth.3176
- Chiu, Y.-L., Shikina, S., Yoshioka, Y., Shinzato, C., and Chang, C.-F. (2020). The first *de novo* transcriptome assembly from the gonads of a scleractinian coral *Euphyllia ancora*: molecular mechanisms underlying scleractinian *Gametogenesis*. 21:732 doi: 10.21203/rs.3.rs-33092/v1
- David, C. N., Özbek, S., Adamczyk, P., Meier, S., Pauly, B., Chapman, J., et al. (2008). Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst. *Trends Genet.* 24, 431–438. doi: 10.1016/j.tig.2008.07.001
- Davy, S. K., Allemand, D., and Weis, V. M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 229–261. doi: 10.1128/MMBR.05014-11
- Furla, P., Allemand, D., Shick, J. M., Ferrier-Pagès, C., Richier, S., Plantivaux, A., et al. (2005). The symbiotic anthozoan: a physiological chimera between alga and animal. *Integr. Comp. Biol.* 45, 595–604. doi: 10.1093/icb/45.4.595
- Gusmão, L. C., Van Deusen, V., Daly, M., and Rodríguez, E. (2020). Origin and evolution of the symbiosis between sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) and hermit crabs, with additional notes on anemone-gastropod associations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 148:106805. doi: 10.1016/j.ympev.2020.106805
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., et al. (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 543, 373–377. doi: 10.1038/nature21707
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., et al. (2016). MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS Comput. Biol.* 12:e1004957. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004957
- Ibarra-Alvarado, C., García, J. A., Aguilar, M. B., Rojas, A., Falcón, A., and de la Cotera, E. P. H. (2007). Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 511–518. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.06.002
- Kenkel, C. D., and Bay, L. K. (2017). Novel transcriptome resources for three scleractinian coral species from the Indo-Pacific. *GigaScience* 6:gix074. doi: 10.1093/gigascience/gix074
- Kitchen, S. A., Crowder, C. M., Poole, A. Z., Weis, V. M., and Meyer, E. (2015). *De novo* assembly and characterization of four anthozoan (phylum Cnidaria) transcriptomes. *G3 Genes Genomes Genet.* 5, 2441–2452. doi: 10.1534/g3.115.020164
- Lajeunesse, T. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar. Biol.* 141, 387–400. doi: 10.1007/s00227-002-0829-2
- Lehnert, E. M., Burriesci, M. S., and Pringle, J. R. (2012). Developing the anemone *Aiptasia* as a tractable model for cnidarian-dinoflagellate symbiosis: the transcriptome of aposymbiotic *A. pallida*. *BMC Genomics* 13:271. doi: 10.1186/1471-2164-13-271
- Lehnert, E. M., Mouchka, M. E., Burriesci, M. S., Gallo, N. D., Schwarz, J. A., and Pringle, J. R. (2014). Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. *Genes Genomes Genet.* 4, 277–295. doi: 10.1534/g3.113.009084
- Lewis, J. (1991). Testing the coral fragment size-dependent survivorship hypothesis for the calcareous hydrozoan *Millepora complanata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70, 101–104. doi: 10.3354/meps070101
- Lewis, J. B. (2006). Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar. Biol.* 50, 1–55. doi: 10.1016/S0065-2881(05)50001-4
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158
- Mayfield, A. B., Wang, L.-H., Tang, P.-C., Fan, T.-Y., Hsiao, Y.-Y., Tsai, C.-L., et al. (2011). Assessing the impacts of experimentally elevated temperature on the biological composition and molecular chaperone gene expression of a reef coral. *PLoS ONE* 6:e26529. doi: 10.1371/journal.pone.0026529
- Mayfield, A. B., Wang, Y.-B., Chen, C.-S., Lin, C.-Y., and Chen, S.-H. (2014). Compartment-specific transcriptomics in a reef-building coral exposed to elevated temperatures. *Mol. Ecol.* 23, 5816–5830. doi: 10.1111/mec.12982
- Meyer, E., and Weis, V. M. (2012). Study of cnidarian-algal symbiosis in the “omics” age. *Biol. Bull.* 223, 44–65. doi: 10.1086/BBLV223n1p44
- Ortiz-González, I. C., Rivera-Vicéns, R. E., and Schizas, N. V. (2017). *De novo* transcriptome assembly of the hydrocoral *Millepora alcicornis* (branching fire coral) from the Caribbean. *Mar. Genomics* 32, 27–30. doi: 10.1016/j.margen.2016.11.005
- Pinzón, J. H., Kamel, B., Burge, C. A., Harvell, C. D., Medina, M., Weil, E., et al. (2015). Whole transcriptome analysis reveals changes in expression of immune-related genes during and after bleaching in a reef-building coral. *R. Soc. Open Sci.* 2:140214. doi: 10.1098/rsos.140214
- Pootakham, W., Naktang, C., Sonthirod, C., Yoocha, T., Sangsakra, D., Jomchai, N., et al. (2018). Development of a novel reference transcriptome for scleractinian coral *Porites lutea* using single-molecule long-read isoform sequencing (Iso-Seq). *Front. Mar. Sci.* 5:122. doi: 10.3389/fmars.2018.00122
- Radwan, F. F. (2002). Comparative toxicological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 131, 323–334. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00017-0
- Radwan, F. F., and Aboul-Dahab, H. M. (2004). Milleporin-1, a new phospholipase A 2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 139, 267–272. doi: 10.1016/j.cca.2004.12.002
- Rajasabapathy, R., Ramasamy, K. P., Manikandan, B., Mohandass, C., and Arthur James, R. (2020). Bacterial communities associated with healthy and diseased (skeletal growth anomaly) reef coral *Acropora cytherea* from Palk Bay, India. *Front. Mar. Sci.* 7:92. doi: 10.3389/fmars.2020.00092
- Rivera-García, L., Rivera-Vicéns, R. E., Veglia, A. J., and Schizas, N. V. (2019). *De novo* transcriptome assembly of the digitate morphotype of *Briareum asbestinum* (Octocorallia: Alcyonacea) from the southwest shelf of Puerto Rico. *Mar. Genomics* 47:100676. doi: 10.1016/j.margen.2019.04.001
- Rodríguez-Lanetty, M., Phillips, W. S., and Weis, V. M. (2006). Transcriptome analysis of a cnidarian – dinoflagellate mutualism reveals complex modulation of host gene expression. *BMC Genomics* 7:23. doi: 10.1186/1471-2164-7-23
- Rojas-Molina, A., García-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., and Bah, M. (2012). *Millepora* (“fire corals”) species: toxicological studies until 2011. *Adv. Environ. Res.* 26, 133–148.
- Ryu, T., Cho, W., Yum, S., and Woo, S. (2019). Holobiont transcriptome of colonial scleractinian coral *Alveopora japonica*. *Mar. Genomics* 43, 68–71. doi: 10.1016/j.margen.2018.07.003
- Shiomi, K., Hosaka, M., Yanaike, N., Yamanaka, H., and Kikuchi, T. (1989). Partial characterization of venoms from two species of fire corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 357–362. doi: 10.2331/suisan.55.357
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., and Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31, 3210–3212. doi: 10.1093/bioinformatics/btv351
- Simona, F. (2019). *Application of Quantitative Phosphoproteomics to the Study of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis*. Thual: KAUST Research Repository. doi: 10.25781/KAUST-7MZ7C
- Soza-Ried, J., Hotz-Wagenblatt, A., Glatting, K.-H., del Val, C., Fellenberg, K., Bode, H. R., et al. (2010). The transcriptome of the colonial marine hydroid *Hydractinia echinata*. *FEBS J.* 277, 197–209. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07474.x
- Sproles, A. E., Kirk, N. L., Kitchen, S. A., Oakley, C. A., Grossman, A. R., Weis, V. M., et al. (2018). Phylogenetic characterization of transporter proteins in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120, 307–320. doi: 10.1016/j.ympev.2017.12.007

- Stromgren, T. (1976). Skeleton growth of the hydrocoral *Millepora complanata* Lamarck in relation to light. *Limnol. Oceanogr.* 21, 156–160. doi: 10.4319/lo.1976.21.1.0156
- Sully, S., Burkepile, D. E., Donovan, M. K., Hodgson, G., and van Woesik, R. (2019). A global analysis of coral bleaching over the past two decades. *Nat. Commun.* 10:1264. doi: 10.1038/s41467-019-09238-2
- Tandon, K., Lu, C.-Y., Chiang, P.-W., Wada, N., Yang, S.-H., Chan, Y.-F., et al. (2020). Comparative genomics: dominant coral-bacterium *Endozoicomonas acroporae* metabolizes dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *ISME J.* 14, 1290–1303. doi: 10.1038/s41396-020-0610-x
- Tivey, T. R., Parkinson, J. E., and Weis, V. M. (2020). Host and symbiont cell cycle coordination is mediated by symbiotic state, nutrition, and partner identity in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Mbio* 11:e02626-19. doi: 10.1128/mbio.02626-19
- Tortorelli, G., Belderok, R., Davy, S. K., McFadden, G. I., and van Oppen, M. J. (2020). Host genotypic effect on algal symbiosis establishment in the coral model, the anemone *Exaiptasia diaphana*, from the great barrier reef. *Front. Mar. Sci.* 6:833. doi: 10.3389/fmars.2019.00833
- Valderrama-Cháirez, M. L., Cruz-Hernández, A., and Paredes-López, O. (2002). Isolation of functional RNA from cactus fruit. *Plant Mol. Biol. Report.* 20, 279–286. doi: 10.1007/BF02782463
- Veglia, A. J., Hammerman, N. M., Rivera-Vicéns, R. E., and Schizas, N. V. (2018). *De novo* transcriptome assembly of the coral *Agaricia lamarcki* (Lamarck's sheet coral) from mesophotic depth in southwest Puerto Rico. *Mar. Genomics* 41, 6–11. doi: 10.1016/j.margen.2018.08.003
- Wenger, Y., and Galliot, B. (2013). Punctuated emergences of genetic and phenotypic innovations in eumetazoan, bilaterian, euteleostome, and hominidae ancestors. *Genome Biol. Evol.* 5, 1949–1968. doi: 10.1093/gbe/evt142
- Xiang, T., Lehnert, E., Jinkerson, R. E., Clowez, S., Kim, R. G., DeNofrio, J. C., et al. (2020). Symbiont population control by host-symbiont metabolic interaction in Symbiodiniaceae-cnidarian associations. *Nat. Commun.* 11:108. doi: 10.1038/s41467-019-13963-z




**Conflict of Interest:** JC-P was employed by the company Databiology Ltd.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Hernández-Elizárraga, Olguín-López, Hernández-Matehuala, Caballero-Pérez, Ibarra-Alvarado and Rojas-Molina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

# New Insights into the Toxin Diversity and Antimicrobial Activity of the “Fire Coral” *Millepora complanata*

Víctor Hugo Hernández-Elizárraga <sup>1</sup>, Andrea Ocharán-Mercado <sup>2</sup>, Norma Olgún-López <sup>1</sup>, Rosalina Hernández-Matehuala <sup>2</sup>, Juan Caballero-Pérez <sup>3</sup>, César Ibarra-Alvarado <sup>2</sup> and Alejandra Rojas-Molina <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 76000, Mexico; vhelizarraga@gmail.com (V.H.H.-E.); normita\_39@hotmail.com (N.O.-L.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 76000, Mexico; anmayener@hotmail.com (A.O.-M.); rosalinahm1@yahoo.com.mx (R.H.-M.); cibarra@uaq.mx (C.I.-A.)

<sup>3</sup> European Molecular Biology Laboratory’s European Bioinformatics Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton CB10 1SD, UK; jcaballero@ebi.ac.uk

\* Correspondence: rojasa@uaq.mx



**Citation:** Hernández-Elizárraga, V.H.; Ocharán-Mercado, A.; Olgún-López, N.; Hernández-Matehuala, R.; Caballero-Pérez, J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A. New Insights into the Toxin Diversity and Antimicrobial Activity of the “Fire Coral” *Millepora complanata*. *Toxins* **2022**, *14*, 206. <https://doi.org/10.3390/toxins14030206>

Received: 23 January 2022

Accepted: 11 March 2022

Published: 14 March 2022

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** To date, few studies have been carried out aimed at characterizing the toxins synthesized by hydrocorals of the genus *Millepora*. The purpose of this study was to explore the toxin diversity and antibacterial activity of the “fire coral” *M. complanata* using a transcriptomic data mining approach. In addition, the cytolytic and antibacterial activities of the *M. complanata* nematocyst proteome were experimentally confirmed. Cytolysins were predicted from the transcriptome by comparing against the Animal Toxin Annotation Project database, resulting in 190 putative toxins, including metalloproteases, hemostasis-impairing toxins, phospholipases, among others. The *M. complanata* nematocyst proteome was analyzed by 1D and 2D electrophoresis and zymography. The zymograms showed different zones of cytolytic activity: two zones of hemolysis at ~25 and ~205 kDa, two regions corresponding to phospholipase A2 (PLA2) activity around 6 and 25 kDa, and a proteolytic zone was observed between 50 and 205 kDa. The hemolytic activity of the proteome was inhibited in the presence of PLA2 and proteases inhibitors, suggesting that PLA2s, trypsin, chymotrypsin, serine-proteases, and matrix metalloproteases are responsible for the hemolysis. On the other hand, antimicrobial peptide sequences were retrieved from their transcripts with the amPEPpy software. This analysis revealed the presence of homologs to SK84, cgUbiquitin, Ubiquicidin, TroTbeta4, SPINK9-v1, and Histone-related antimicrobials in the transcriptome of this cnidarian. Finally, by employing disk diffusion and microdilution assays, we found that the nematocyst peptidome of *M. complanata* showed inhibitory activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria including *S. enteritidis*, *P. perfectomarina*, *E. coli*, and *C. xerosis*, among others. This is the first transcriptomic data mining analysis to explore the diversity of the toxins synthesized by an organism of the genus *Millepora*. Undoubtedly, this work provides information that will broaden our general understanding of the structural richness of cnidarian toxins.

**Keywords:** *Millepora complanata*; transcriptomics; toxin diversity; cytolytic; antibacterial peptides

**Key Contribution:** This transcriptomic analysis reveals the diversity of toxins expressed in the “fire coral” *Millepora complanata*. The *M. complanata* nematocyst proteome shows inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

## 1. Introduction

Cnidarians are simple and ancestral organisms considered as the oldest lineage of poisonous animals, which have the ability to synthesize molecules capable of inducing different

toxic effects and lethality [1]. Cnidarian venoms are stored in the nematocysts, specialized organelles for defense and prey capture [2]. These complex chemical mixtures contain mainly peptidic and proteinaceous components, which have been categorized into three principal groups, based on their mechanism of action: (a) enzymes (e.g., metalloproteases and phospholipases A2 (PLA2s)) [1,3]; (b) pore-forming toxins (PFTs) (e.g., actinoporins, jellyfish toxins (JFTs), hydralysins (Hlns), etc.) [4]; and (c) neurotoxins (e.g., toxins that target voltage-gated sodium channels (NaTXs), toxins targeting voltage-gated potassium channels (KTXs), Kunitz peptides, etc.) [5]. PLA2 and metalloprotease activities have been widely described for cnidarian venoms [6]. Particularly, PLA2s have been found in cnidarians of the classes Anthozoa, Scyphozoa, Cubozoa, and Hydrozoa [4].

Cnidarian toxins possess a wide spectrum of biological effects, for instance, PLA2s hydrolyze the *sn*-2 ester bond of glycerophospholipids producing lysophospholipids and fatty acids [7]. These toxins also display other pharmacological effects, such as neurotoxicity [8]. Regarding cnidarian venom metalloproteinases, which are metal-dependent peptidases, they are responsible for several toxic effects, including skin damage, myonecrosis, edema, and inflammation [6]. On the other hand, PFTs play an important role in cnidarians' defense. The cytolysis induced by PFTs involves the formation of transmembrane pores, which leads to cellular disruption due to osmotic imbalance [4,9,10]. The most-studied group of cnidarian PFTs are actinoporins (e.g., equinatoxin II). Cnidarians can also synthesize neuroactive toxins [5], which are employed for immobilizing preys and predators by modulating gating of voltage-dependent sodium channels or blocking voltage-dependent potassium channels during the repolarization stage [11].

In addition to toxins, cnidarians synthesize other types of bioactive molecules, which represent valuable potential sources of lead compounds useful for the development of new drugs [12]. Some of these compounds have antibiotic activity and constitute an important part of the innate immune response of cnidarians, which inhabit hostile environments abundant in bacteria, viruses, and parasites [13]. Thus, these marine organisms use their toxins and antimicrobial compounds to face intra and interspecific competition and to defend themselves against microbial pathogens [14]. In fact, a significant antimicrobial activity against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria has been demonstrated for numerous cnidarian extracts [15]. Interestingly, several peptides from cnidarians, mainly from the Hydrozoa class, have shown significant antimicrobial activity against multi-resistant strains of Gram-positive and -negative bacteria (e.g., Hydramacin-1, Periculin-1, Kazal-2, and Arminin) [13].

Hydrocorals of the genus *Millepora* are very important from an ecological perspective, as they are important builders of coral reefs. These cnidarians, commonly known as "fire corals", are also toxinologically relevant, since when coming into contact with human skin, they induce local and systemic effects that include severe pain, blisters, eruptions, nephrotic syndrome, pulmonary edema, and acute renal failure [16]. To date, few studies have been carried out on the toxins produced by organisms of the genus *Millepora*, compared to the wide range of toxinological investigations that have been carried out on other cnidarians. These studies have revealed that "fire corals" produce similar toxic effects. It has been reported that the venoms of *M. dichotoma* and *M. platyphylla* caused violent seizures and death in less than a minute when administered intravenously in mice, in addition to inducing hemolysis and dermonecrosis [17,18]. Similarly, *M. alaicornis* and *M. tenera* elicited lethal effects, hemolysis, and dermonecrosis in mice [19–21].

Previous studies carried out by our research group demonstrated that the aqueous extract of *M. complanata* elicited calcium-dependent contractions in guinea pig ileum and rat aorta [22]. Moreover, intravenous administration of this extract caused severe seizures and immediate death in mice with a lethal dose 50 (LD50) of 4.62 µg protein/g of body weight. Doses lower than the LD50 induced lung and kidney injury ascribed to the presence of cytolytins [23]. Interestingly, we found evidence that the aqueous extract of *M. complanata* contains heat-stable toxins of non-protein nature, capable of inducing convulsions and lethality in mice [23].

Our group has also been working with another *Millepora* species, *M. alcicornis*. We found that the aqueous extract of this hydrocoral caused hemolysis of rat erythrocytes, displayed PLA2 activity, and induced a concentration-dependent contraction of rat aortic rings. When intravenously administered, the extract was lethal to mice (LD50 of 17 µg protein/g of body weight), and provoked kidney, liver, and lung damage [24]. A direct zymography analysis showed that this extract contained two types of hemolysins; some of them were proteins with molecular mass ranging from 28 to 30 kDa, which possessed PLA2 activity, and the others had a molecular mass of approximately 200 kDa and did not elicit PLA2 activity [24].

Despite their toxicological importance, there is very little information regarding the primary structure of hydrocoral toxins. The amino acid sequence of only one of them has been determined, an 18 kDa protein (MCTx-1) purified from *M. dichotoma*, whose primary structure was deduced from its cDNA. This toxin showed homology with dermatopontins, which are proteins of the extracellular matrix of mammals [25]. Recently, by using a proteomics approach, we identified five toxin-like sequences in the soluble proteome of *M. complanata* corresponding to two PLA2s (acidic PLA2 PA4 and acidic calcium-independent PLA2-like protein), two PFTs (echotoxin-2 and DELTA-actitoxin-Oor1b), and one metalloprotease (Predicted: astacin-like metalloprotease toxin 5) [26]. In addition, we detected putative toxin sequences, including a metalloprotease (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7), a PLA2, and an actitoxin (DELTA-actitoxin-Ate1a like) in the soluble proteome of *M. alcicornis* [27].

Although the lethality and cytolytic activity of *Millepora* crude extracts have been previously described, very few efforts have been addressed in order to characterize the toxins synthesized by these species; at present, their chemical structure and their mechanisms of action have not been fully described. The aim of the present study was to explore the diversity of *M. complanata* toxins and to predict the presence of antimicrobial peptides using a transcriptome data mining approach. In addition, the cytolytic and antibacterial activities of the proteome of *M. complanata* nematocysts were experimentally confirmed.

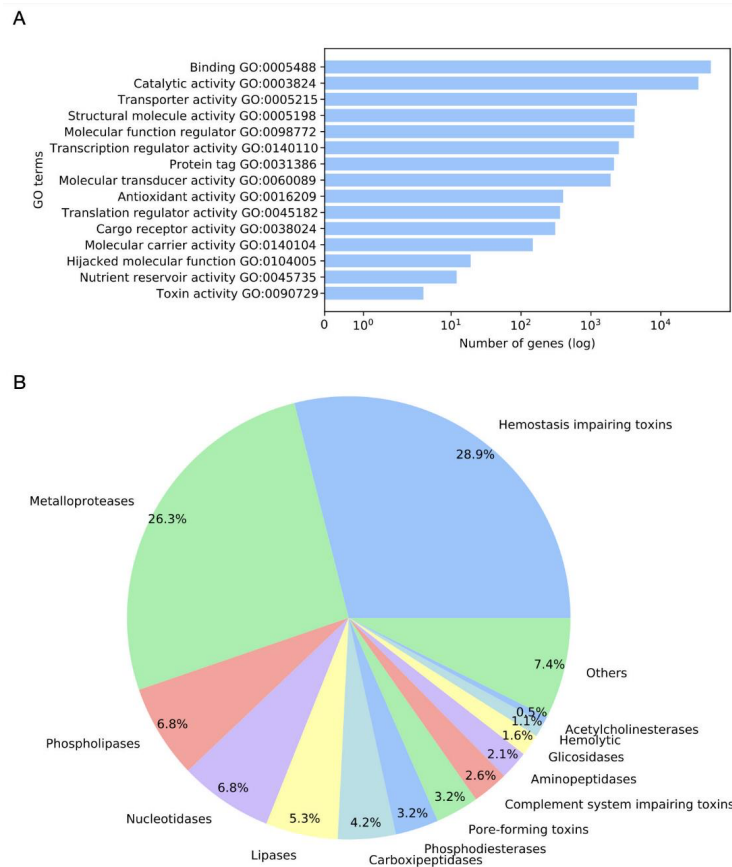
## 2. Results

### 2.1. Annotation and GO Terms Assignment

Overall, 412,660 sequences from the *M. complanata* transcriptome were analyzed (DDBJ/EMBL/GenBank accession GIXC00000000). Annotation by sequence homology against the UniProtKB/Swiss-Prot database resulted in 75,287 hits. The mapping analysis showed ontology candidates for 74,949 sequences. Gene ontology (GO) terms were assigned to 66,788 sequences. Overrepresented GO terms across the molecular function (MF) subontology are displayed in Figure 1A. Binding (GO0005488), catalytic activity (GO0003824), transporter activity (GO0005215), structural molecule activity (GO0005198), molecular function regulator (GO0098772), and transcription regulator activity (GO0140110), among others, were highly represented terms in *M. complanata* transcriptome.

### 2.2. Detected Putative Toxins

The *M. complanata* predicted proteome resulted in 2,475,960 hypothetical proteins. Annotation against the Animal Toxins Annotation Project database showed 3024 hits. After filtering, overall, 190 putative toxins were detected. According to their molecular function, toxins were classified as follows: metalloproteases, hemostasis-impairing toxins, phospholipases, nucleotidases, lipases, carboxypeptidases, phosphodiesterases, PFTs, complement system-impairing toxins, aminopeptidases, glycosidases, acetylcholinesterases, and others. The distribution of identified putative toxins is displayed in Figure 1B. Several *M. complanata* putative toxins showed high sequence similarity with previously reported toxins, two representative alignments of a hemolysin-like toxin and a hydralysin-like toxin are shown in Figure 2.



**Figure 1.** (A) Overrepresented gene ontology (GO) terms across the molecular function (MF) subontology and (B) toxin distribution from the *M. complanata* transcriptome.

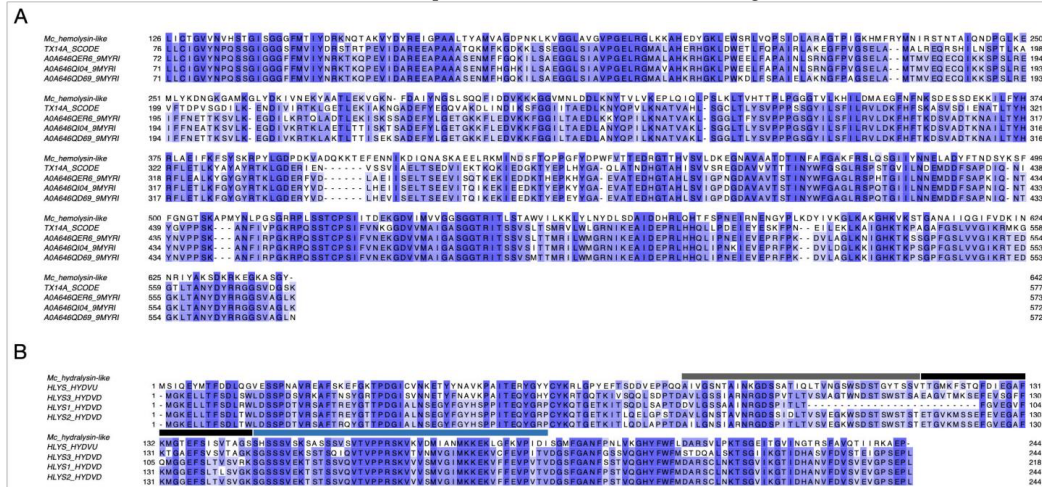
### 2.3. Virtual Screening of Antimicrobial Peptides (AMPs)

Overall, 1,459,793 protein sequences with length smaller than 100 amino acids were analyzed by amPEppy. After prediction of antimicrobial peptides (AMPs), 1,397,261 sequences displayed at least one physicochemical-like property related to antimicrobial activity. Derived from annotation against AMPs databases, 1966 hits were obtained from the APD3 database, whereas 3875 hits were recovered from the DRAMP database. Most of the hits showed sequence similarity with SK84, cgUbiquitin, Ubiquidin, TroTbeta4, SPINK9-v1, and Histone-related antimicrobials. The top ten AMP hits are shown in Table 1.

### 2.4. Electrophoretic Analysis of the *M. complanata* Nematocysts Proteome

Approximately 200 g of *M. complanata* fragments were employed for obtaining the nematocyst proteome. After protein extraction, 1.0 g of lyophilized powder was obtained (yield 0.5%). The total protein content of the lyophilized proteome was  $50 \pm 13$   $\mu$ g of protein per mg. The SDS-PAGE electrophoretic analysis showed that the nematocyst proteome of *M. complanata* contained peptides and proteins with molecular mass ranging from 6 to

200 kDa (Figure 3A). The 2DE analysis allowed the detection of 575 protein spots, which showed isoelectric point (IP) values between 3 to 10 (Figure 3B).



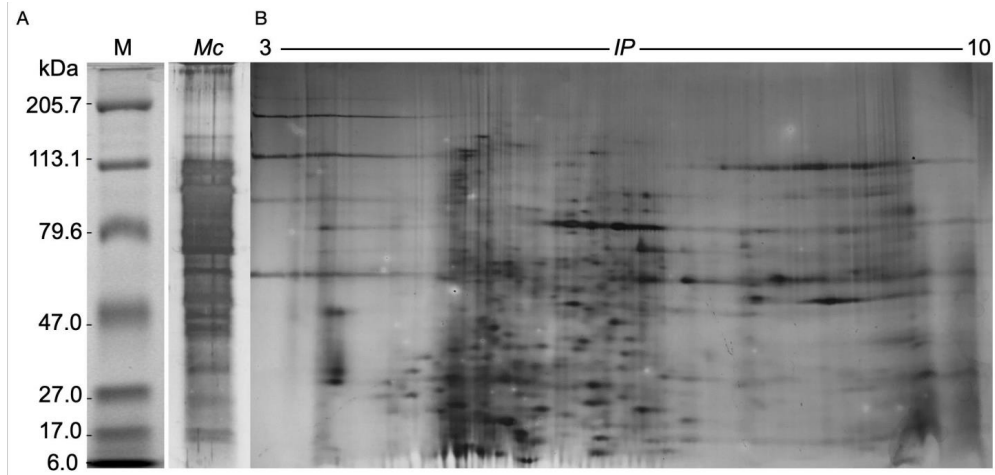
**Figure 2.** (A) Multiple sequence alignment between a hemolysin-like protein from *M. complanata* (Mc\_hemolysin-like) and four centipede toxins (TX14A\_SCODE or Scoloptoxin SSD14, A0A646QER6\_9MYRI, A0A646QI04\_9MYRI, and A0A646QD69\_9MYRI) (Amino acid conservation is highlighted in blue). (B) Multiple sequence alignment between a *M. complanata* hydralysin-like (Mc\_hydralysin-like) toxin with four hydralysins (HLYS\_HYDVU, HLYS1\_HYDVU, HLYS2\_HYDVU, and HLYS3\_HYDVU). Annotations: Upper flanking motif between positions 80–115 (gray line); region responsible for transmembrane pore formation at positions 116–145 (black line); and lower flanking motif within positions 146–190 (blue line). (Amino acid conservation is highlighted in blue).

**Table 1.** Top ten antimicrobial peptides (AMPs) hits from the *M. complanata* predicted peptidome.

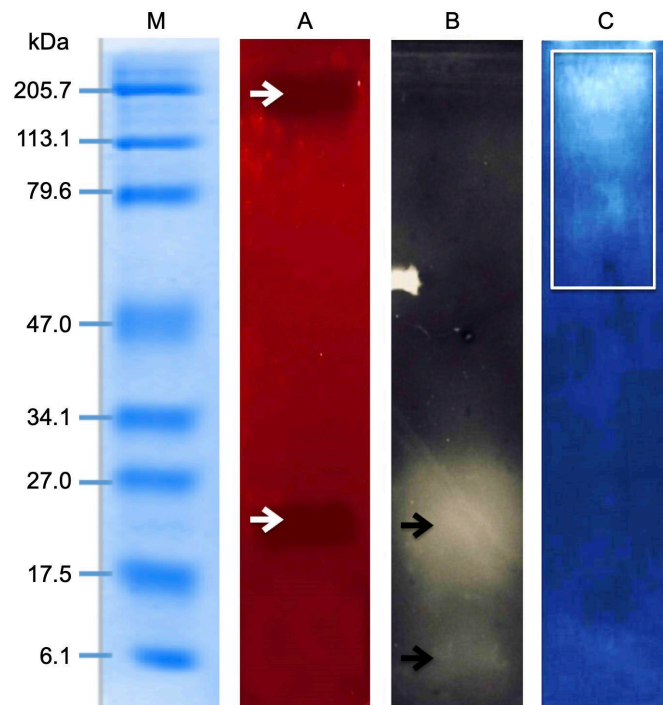
SeqID	Accession	Description	Activity	E-Value	Sequence
Mc1655639	DRAMP03113	SK84	Anti-Gram+; antifungal; antiviral	$1.3 \times 10^{-9}$	LPSFSGSMFNPEGMPGSGAGKGGGGGVSVD AGGSFSGMEEAREEYFRRLQKEQLKSLQHLQDEVDHHERELKQ CGMQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGK PPDQQRLLFAGKQLEDGRITLSDYNIQKESTLHLVLRGRGMQ IFVKTLTGKTITLEVEP
Mc2434582	DRAMP03472	cgUbiquitin	Anti-Gram+; anti-Gram-; antifungal	$1.5 \times 10^{-37}$	PPDQQRLLFAGKQLEDGRITLSDYNIQKESTLHLVLRGRGMQ IFVKTLTGKTITLEVEP
Mc1269566	AP02096	Ubiquicidin	Anti-Gram+; anti-Gram-; anti-MRSA	$6.1 \times 10^{-23}$	GIPNLSTINVAQVLGGKVGHSARAGKVKGQTP KVDKQDKKKKKTGGSHRIQYRNFVNVVPSFGRRRGPNSSNNS
Mc2063087	AP02804	Histone H2A	Anti-Gram+	$2.6 \times 10^{-17}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc1970206	AP02807	Histone H4	Anti-Gram-	$8.6 \times 10^{-23}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc2019202	AP02808	Histone H2B	Anti-Gram-	$1.7 \times 10^{-12}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc1808465	AP02809	Histone H3	Anti-Gram-	$3.3 \times 10^{-36}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc1970206	AP02810	Histone H4	Anti-Gram-	$5.1 \times 10^{-23}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc1775730	AP02896	TroTbeta4	Anti-Gram+; anti-Gram-	$2.8 \times 10^{-11}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI
Mc1329197	AP03038	SPINK9-v1	Anti-Gram-, enzyme inhibitor	$9.5 \times 10^{-7}$	RHLNRTTSHGRVGTAAVYSAILEYLAETAEVLEAG NASKDLKVKRITPRHLQLAARGDEELDAL ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLY ARKRQCKTLVFGCGWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG SREIQAVRLLPGLAKHAVSEGTKAVKYNMAEL YIIKIKQFFFFFFFFFFFIFLISIKP RKLFPQRLVREIAQDFKTLDRFQSTAVMALQEASEAYL VGLFEDTNCAIHAKRVTIMPDKIQLARRIGERATLQTKNGYFYS ETRGLVKFLENVIRDVAVTYTEHARRKVTAMDVLYARKRQCKTLVFGC C*GWGSLEWGEVAVGSPRDAQETNPRMLVG RIIRSAREVVFSCFLFIHQSVVMGDKDPVDSVGTTFDKSKL KKAETQEKNTLPKTEIEQKSGDKVLVCTISTRPLQLQFYSV CKFDKTKCKSSCVLLSKYKCNDKLDYKPCVCSGDRT YSNQCELDLASCNSGKVKVDSGECTNAVHLHQVLNINVAHFTPRQNI

2.5. Zymography Assay

The results from the zymography analysis are displayed in Figure 4. Two zones of hemolysis were detected at ~25 and ~205 kDa (Figure 4A). Zymography assays of PLA2 showed the presence of two protein bands around 6 and 25 kDa (Figure 4B), whereas proteolytic activity was observed within a molecular mass range of 50 to 205 kDa (Figure 4C).



**Figure 3.** (A) SDS-PAGE electrophoretic profile (*Mc*), and (B) Two-dimensional electrophoretic profile of the nematocyst proteome of *M. complanata*. MW—molecular mass (kDa). IP—isoelectric point (pH).

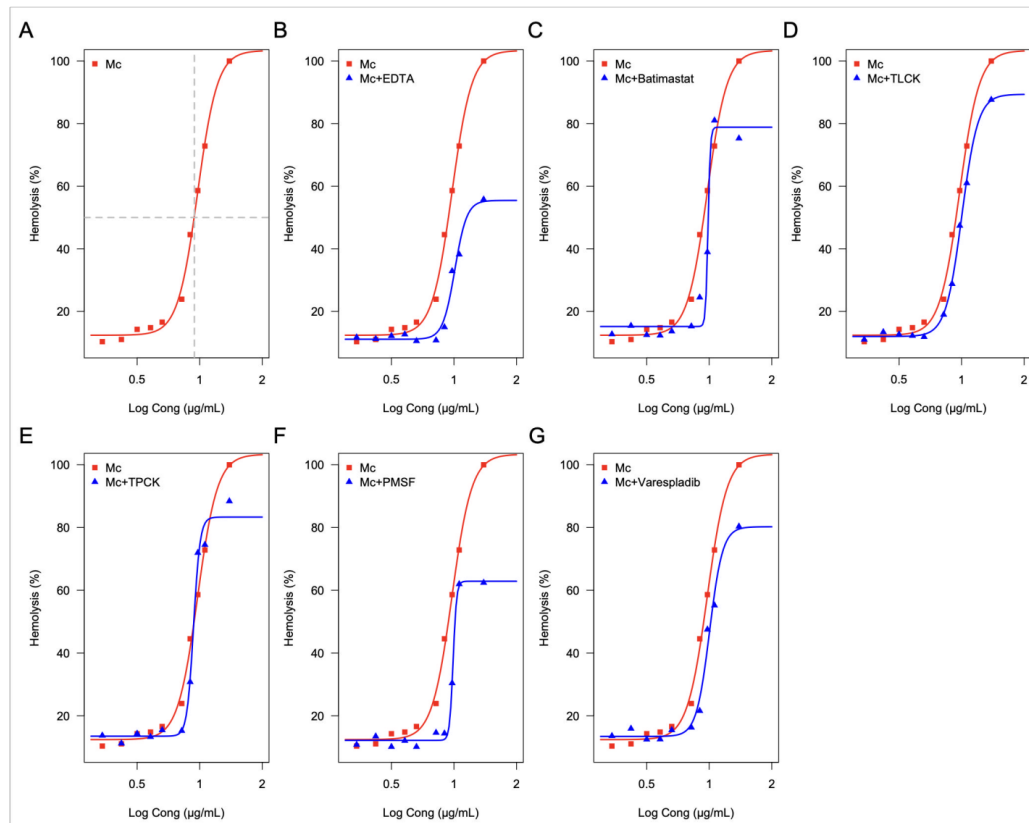


**Figure 4.** Zymographic analysis. (A) Hemolytic activity, two zones of hemolysis at ~25 and ~205 kDa. (B) Regions corresponding to PLA2 activity around 6 and 25 kDa. (C) Proteolytic activity observed within a molecular mass range of 50 to 205 kDa.



### 2.6. Effect of Enzymatic Inhibitors on the Hemolytic Activity of the *M. complanata* Nematocysts Proteome

The proteome of *M. complanata* nematocysts elicited a concentration-dependent hemolysis of human erythrocytes with a hemolytic unit 50 (HU50) value of  $9.49 \pm 1.03$   $\mu\text{g}$  of protein per mL (Figure 5A). All six enzymatic inhibitors diminished the maximal hemolytic activity of the proteome. Inhibition of the hydrocoral nematocysts proteome-mediated hemolysis induced by each inhibitor was: 44.2% for Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, non-selective protease inhibitor) (Figure 5B), 19.68% for BB-94 (2R,3S)-N4-Hydroxy-N1-[(1S)-2-(methylamino)-2-oxo-1-(phenylmethyl)ethyl]-2-(2-methylpropyl)-3-[(2-thienylthio)methyl] butanediamine (Batimastat, matrix metalloprotease inhibitor) (Figure 5C), 12.36% for N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, trypsin inhibitor) (Figure 5D), 11.59% for N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, chymotrypsin irreversible inhibitor) (Figure 5E), 37.59% for Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, serine protease inhibitor) (Figure 5F), and 19.66% for 2-[[3-(2-Amino-2-oxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy]-acetic acid (Varespladib, sPLA2 inhibitor) (Figure 5G).



**Figure 5.** Percentage of the inhibitory effect of enzymatic inhibitors on the hemolytic activity of the proteome of *M. complanata* nematocysts. (A) Hemolytic activity (control), (B) 44.2% for EDTA, (C) 19.68% for Batimastat, (D) 2.36% for TLCK, (E) 11.59% for TPCK, (F) 37.59% for PMSF, and (G) Varespladib with 19.66% inhibition.

### 2.7. Antibacterial Activity Induced by *M. complanata* Nematocysts Peptidome

The susceptibility of bacterial strains to the effect of the *M. complanata* nematocysts peptidome is shown in Table 2. These results showed that this fraction of the nematocyst proteome has antibacterial effects against seven Gram-negative and three Gram-positive bacteria. In the case of Gram-negative bacteria, the largest inhibition zone was  $22 \pm 1$  mm corresponding to *Escherichia coli*, whereas, in the case of Gram-positive bacteria, the largest inhibition zone diameter ( $20 \pm 0.5$  mm) was observed for *Bacillus koreensis*.

**Table 2.** Susceptibility of bacterial strains to the effect of *M. complanata* nematocysts peptidome.

	Species	Antibacterial Activity	Zone Of Inhibition (mm)	MIC <sup>a</sup> (µg/mL)
Gram(−)	<i>Salmonella agona</i>	−	NA	NA
	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	$20 \pm 1$	0.4
	<i>Salmonella enteritidis</i>	+	$18 \pm 0.5$	0.04
	<i>Salmonella infantis</i>	+	$22 \pm 1$	4
	<i>Salmonella typhi</i>	+	$20 \pm 1$	>4
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	$12 \pm 0.5$	4
	<i>Pseudomonas perfectomarina</i>	+	$20 \pm 1.5$	0.04
	<i>Escherichia coli</i>	+	$22 \pm 1$	0.04
Gram(+)	<i>Corynebacterium xerosis</i>	+	$12 \pm 0.5$	0.04
	<i>Kytococcus dedenturius</i>	−	NA	NA
	<i>Exiguobacterium amuntiacum</i>	−	NA	NA
	<i>Bacillus koreensis</i>	+	$20 \pm 0.5$	4
	<i>Micrococcus luteus</i>	−	NA	NA
	<i>Microbacterium oleivorans</i>	+	$17 \pm 0.5$	4
	<i>Staphylococcus colmii</i>	−	NA	NA
	<i>Staphylococcus xylosum</i>	−	NA	NA
	<i>Staphylococcus aureus</i>	−	NA	NA

<sup>a</sup> Minimum inhibitory concentration, (+) Active, (−) No active, (NA) Not assessed.

The antibacterial microdilution method indicated that *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas perfectomarina*, *Escherichia coli*, and *Corynebacterium xerosis* were the most sensitive strains with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 0.004 µg of protein per mL.

## 3. Discussion

### 3.1. Diversity of *M. complanata* Toxins and Prediction of Antimicrobial Peptides

Organisms of the Phylum Cnidaria are respected as the most venomous marine organisms on Earth, whose toxins production is crucial for their survival [28]. Here, we explored the toxin diversity synthesized by the “fire coral” *M. complanata* and predicted the presence of antimicrobial peptides by using a transcriptome data mining approach. After transcriptome annotation and GO analysis, several terms were found across the MF subontology. However, “toxin activity” was within the most overrepresented terms (Figure 1A) and 190 sequences from the transcriptome resembled previously reported toxins. These results support the diversity of toxins synthesized by cnidarians of the genus *Millepora* [16,22,23,26].

In this study, the putative toxins detected in the *M. complanata* nematocysts proteome included: metalloproteases, hemostasis-impairing toxins, phospholipases, nucleotidases, lipases, carboxypeptidases, phosphodiesterases, pore-forming toxins, complement system-impairing toxins, aminopeptidases, glycosidases, and acetylcholinesterases, among others (Figure 1B). However, metalloproteases, hemostasis-impairing toxins, and phospholipases (comprising phospholipases A and B) were predominant. Although hemolytic and phospholipase A2 activities have been previously described for some *Millepora* species [18,29,30], the presence of sequences associated with nucleotidases, lipases, carboxypeptidases, phosphodiesterases, PFTs, complement system-impairing toxins, aminopeptidases, glycosidases, and acetylcholinesterases was evidenced for the first time in an organism of the genus *Millepora*.

Our results showed that more than fifty percent of the putative detected toxins corresponded to metalloproteases and hemostasis-impairing toxins. A previous study, carried out on the tentacle transcriptome of the jellyfish *Chrysaora fuscescens*, revealed highly expressed genes encoding metalloproteases, which have a key role during envenomation and cause inflammation and tissue disruption [31]. Further research study performed on the transcriptome of the jellyfish *Cyanea capillata* indicated the high abundance of transcripts encoding metalloproteases [32]. Our study indicates that metalloproteases are important components of hydrocoral venoms, similar to what happens with other cnidarians such as jellyfishes.

On the other hand, hemostatic and hemorrhagic toxins are common components of the venoms of crustaceans, blood feeding insects, leeches, snakes, and some cnidarians. For example, it was found that in the transcriptome of four cerianthid species (*Pachyercianthus cf. maua*, *Isarachnanthus nocturnus*, *Ceriantheomorpha brasiliensis*, and *Pachyercianthus borealis*), more than 30% of transcripts related to toxin synthesis had homology to transcripts encoding hemostatic or hemorrhagic proteins [33]. The results obtained from the transcriptome analysis of *M. complanata* nematocysts proteome indicate that hemostasis-impairing toxins play an important role in the mechanisms of toxicity induced by the “fire corals” for prey hunting and defense against predators.

One of the main biological effects demonstrated for extracts and venoms obtained from *Millepora* species is the hemolysis that they produce in erythrocytes from different species. However, the chemical structure of hemolysins synthesized by “fire corals” has not been characterized. A putative hemolysin and a putative PFT identified from the *M. complanata* transcriptome were selected for multiple sequence alignment analysis in order to identify conserved structural motifs that are present in PFTs and hemolysins previously identified in hydrozoans and in animals that do not belong to the phylum Cnidaria (Figure 2). Amino acid conservation (highlighted in blue) between a hemolysin-like protein (642 amino acids length) from *M. complanata* (Mc\_hemolysin-like) and four centipede toxins was observed: one from a Thai centipede *Scolopendra dehaani* hemolysin (TX14A\_SCODE or Scoloptoxin SSD14) and three from *Hemiscolopendra marginata* (A0A646QER6\_9MYRI, A0A646QI04\_9MYRI, A0A646QD69\_9MYRI) (Figure 2A). It was previously found that Scoloptoxin SSD14 elicited a dose-dependent human platelet aggregation (maximum response at 3.2 µg/mL) and induced hemolysis on mice and rabbit erythrocytes (35 and 65% at 5 µg/mL, respectively) [34]. In addition, a hydralysin-like toxin (244 amino acids length) was identified from the *M. complanata* transcriptome. This protein sequence was similar to that of hydralysins from the green hydra *Chlorohydra viridissima*. Hydralysins and their homologs share a group of conserved motifs with known pore-forming toxins such as aerolysins [35]. The *M. complanata* hydralysin-like toxin (Mc\_hydralysin-like toxin) detected in this work showed conserved sequence motifs of four hydralysins (HLYS\_HYDVU, HLYS1\_HYDVU, HLYS2\_HYDVU, and HLYS3\_HYDVU) (Figure 2B). Specifically, three characteristic conserved motifs (highlighted in blue) from aerolysins were identified in the Mc\_hydralysin-like toxin: a) the upper flanking motif between positions 80–115 (gray line); b) the region responsible for transmembrane pore formation at positions 116–145 (black line); and c) the lower flanking motif within positions 146–190 (blue line) (Figure 2B) [35]. These results suggest that PFTs, such as hydralysins, may be synthesized by *M. complanata* and they could display mechanisms of pore formation similar to aerolysins. Moreover, it is very likely that proteins structurally related to these types of toxins contribute to the hemolysis induced by *Millepora* venoms.

On the other hand, it has been recognized that cnidarians are valuable sources of antimicrobial peptides [13]. Therefore, a virtual screening for identifying antibacterial peptides in the peptidome of *M. complanata* nematocysts was carried out. Most of the hits from the predicted peptidome showed sequence similarity to SK84, cgUbiquitin, Ubiquicidin, TroTbeta4, SPINK9-v1, and Histone-related antimicrobials (Table 1). After the bioinformatics analysis, the antimicrobial activity of the *M. complanata* nematocysts peptidome against Gram-negative and Gram-positive bacteria was confirmed using the diffusion method. The

results demonstrated that, in fact, the hydrocoral peptidome possessed broad-spectrum antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive groups, with *S. enteritidis*, *P. perfectomarina*, *E. coli*, and *C. xerosis* being the most sensitive strains (Table 2). One of the AMPs identified in this work corresponds to cgUbiquitin. According to a previous study, the AMP cgUbiquitin, found in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, possesses potent antibacterial activity against Gram-positive and -negative bacteria. Particularly, this non-hemolytic AMP elicits an antimicrobial effect (through a non-lytic mechanism) on *Streptococcus iniae* and *Vibrio parahaemolyticus* with a minimal effective concentration of 7.8 and 9.8 µg/mL, respectively [36]. Additionally, homologs to SPINK9-v1 were found in the transcriptome of *M. complanata*. SPINK9 and their variants are epidermal antimicrobial peptides synthesized by human skin that selectively kill *E. coli* by a mechanism that involves cell membrane and cytoplasm targets [37]. Ubiquicidin was another potential AMP detected in the *M. complanata* transcriptome. This peptide displayed significant antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and an avirulent strain of *Yersinia enterocolitica*. Ubiquicidin restricts the intracellular growth of microorganisms in the cytosol of macrophages [38].

Our results constitute the first evidence that *Millepora* species produce antimicrobial compounds, whose chemical structure needs to be elucidated. It is very likely that some peptides structurally related to those found in the putative peptidome are responsible for the antimicrobial activity; however, this hypothesis needs to be experimentally confirmed. Antimicrobial compounds synthesized by hydrocorals might represent novel leads for the development of new anti-infective molecules.

### 3.2. Cytolysins from the Nematocyst Proteome of *M. complanata*

Cnidarian nematocyst venom comprises a complex mixture of toxic proteins and peptides, which are employed for prey paralysis or predator deterrence [39,40]. Similar to what was found in the *Hydra magnipapillata* proteome, the nematocyst proteome of *M. complanata* contained proteins with a molecular mass range between 10 and 70 kDa [31]. However, prominent high molecular mass bands of approximately 200 kDa were observed in the *M. complanata* proteome (Figure 3A). It is estimated that cnidarian venom possesses a high variety of compounds (about 250), mainly of proteinaceous origin [41]. Here, 575 protein spots were detected in the nematocyst proteome of *M. complanata* (Figure 3B). These findings could imply that hydrocorals synthesize a greater structural diversity of toxins compared to other cnidarians such as *Cyanea capillata* (53 putative toxins), *Nemopilema nomurai* (69 putative toxins) [42], *Chrysaora fuscescens* (163 proteins) [43], *Cyanea nozakii* (20 proteins), *Chrysaora caliparea* (12 proteins), and *Lychnorhiza malayensis* (8 proteins) [44].

Although differences in the venom composition of cnidarians belonging to different classes have been observed, cytolytic toxins are very important components of cnidarian venoms [45]. In fact, cytolysis is a well-known effect induced by toxins of cnidarians, including hydrozoans, such as *Physalia physalis*, *Pandea rubra*, *Arctapodema* sp., and *Colobonema sericeum*, among others [46]. Regarding *Millepora* species, potent hemolytic activity has been reported for *M. complanata* [47], *M. alaicornis* [24], *M. dichotoma* [29], and *M. platyphylla* [30]. The zymographic analysis of the nematocyst proteome of *M. complanata* showed two zones of hemolytic activity that were detected at ~25 and ~205 kDa (Figure 4A). These results were in accordance with a previous study carried out by our research group on *M. alaicornis*, which indicated that the venom of this hydrocoral contains hemolysins with molecular mass of ~28–30 kDa (with PLA2 activity) and ~200 kDa [24]. These findings suggest that both hydrocorals synthesize hemolytic proteins with similar molecular mass. The PLA2 zymogram revealed two zymolytic bands at approximately 6 and 25 kDa (Figure 4B). Low molecular mass toxic PLA2s have been found in some cnidarians, including *Adamsia carciniopados* (13.5 kDa) [8], *Bunodosoma caissarum* (14.7 kDa) [48], *Condylactis gigantea* (14.5 kDa) [49], and *Urticina crassicornis* (12.4 kDa) [50]. However, the PLA2s found in these cnidarians had molecular masses greater than 12 kDa. Thus, the presence of a 6 kDa PLA2 in the proteome of *M. complanata* nematocysts could indicate that this hydrocoral

synthesizes PLA2s with structural characteristics different from those of other cnidarian PLA2s, whose structural features remain to be elucidated.

Furthermore, the zymograms of proteolytic enzymes showed bands within a molecular mass range of 50 to 205 kDa (Figure 4C). Proteases with approximate molecular mass of 30 kDa have been described as important constituents of some jellyfish venoms [51]. Particularly, it has been found that proteases of the astacin-like metalloprotease family are ubiquitous components of cnidarian venoms. A 32.3 kDa homolog of astacin-like metalloproteinase was detected in the hydrozoan *Podocoryne carnea* [52]. Another astacin-like toxin of 30.38 kDa has been identified in the venom of *Stomolophus meleagris* [51]. Nevertheless, proteases higher than 50 kDa have not been previously reported for any *Millepora* species. The high molecular mass metalloproteases found in the venom of *M. complanata* could play an important role in capturing prey and digestion.

The results obtained through zymography agree with those derived from the transcriptome analysis, which suggested that the nematocyst proteome of *M. complanata* contains a mixture of hemolysins, proteases, and phospholipases. The presence of various types of toxins in the venom of *M. complanata* indicate that this organism possesses a sophisticated biochemical system involved in efficient capture and digestion of prey. To further characterize the hemolytic activity elicited by the *M. complanata* nematocyst proteome, we assessed the influence of specific enzymatic inhibitors. EDTA was capable of reducing 44.2% of the hemolysis induced by the hydrocoral nematocyst proteome, which implies that almost half of the cytolytic responsible for this activity are divalent ion-dependent toxins. In fact, divalent ions such as  $\text{Ca}^{2+}$  are necessary for conformational changes in enzyme catalysis and toxin activity of cnidarian proteases [53]. Moreover, inhibition of the hemolytic effect by trypsin, chymotrypsin, serine-proteases, and matrix metalloproteases inhibitors indicated the involvement of several proteases in the hemolytic activity elicited by the proteome of *M. complanata* nematocysts. Considering that, in a previous study, our research group identified the astacin-like metalloprotease toxin 5 in the soluble proteome of *M. complanata* [26], it is very likely that some of the proteases responsible for the hemolytic effect induced by the proteome of *M. complanata* nematocysts belong to the astacin family of metalloproteases. Several studies have shown that these types of toxins are common components of cnidarian venoms [54–56], where they act as spreading agents, which facilitate the diffusion of other toxins contained in the same venom.

Although the mechanism of hemolysis induced by cnidarian venoms has not been completely characterized, it has been previously demonstrated that, in the case of *Millepora* species, phospholipase A2 significantly contributes to hemolytic activity. In the present study, we found that the PLA2 inhibitor Varespladib significantly diminished (19.66%) the hemolytic activity of the *M. complanata* nematocyst proteome, confirming that this effect can be partly attributed to the presence of PLA2s.

#### 4. Conclusions

In this study, we determined the toxin diversity of the “fire coral” *M. complanata* using a transcriptome data mining approach. Metalloproteases, hemostasis-impairing toxins, and phospholipases (including phospholipases A and B) were predominant putative components of this “fire coral” venom. The hemolytic activity elicited by the nematocyst proteome of this hydrocoral can be ascribed to the presence of toxic proteases (including trypsin, chymotrypsin, serine-proteases, and metalloproteases) and PLA2s. On the other hand, the prediction of antimicrobial peptides revealed homologs to SK84, cgUbiquitin, Ubiquicidin, TroTbeta4, SPINK9-v1, and Histone-related antimicrobials. Moreover, the *M. complanata* nematocyst peptidome exhibited broad-spectrum antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria including *S. enteritidis*, *P. perfectomarina*, *E. coli*, and *C. xerosis*. This is the first report regarding the toxin diversity and antibacterial activity of the venoms produced by *Millepora* species, which will contribute to broadening our understanding of the mechanisms underlying the toxic effects produced by these impor-

tant cnidarians. Additionally, the potential of these hydrocorals as a valuable source of structurally and functionally diverse biomolecules was evidenced.

## 5. Materials and Methods

### 5.1. Ethics Statement

All experimental procedures described in this study were carried out after obtaining authorization by the ethics committee of the Faculty of Chemistry of the Autonomous University of Queretaro (Permit number CQB19/058). *M. complanata* specimen sampling was authorized by the Mexican Ministry of Environment and Natural Resources-SEMARNAT (Permit number PFP/DGOPA-139/15).

### 5.2. Transcriptomic Data Acquisition

The *M. complanata* assembled transcriptome was downloaded from the NCBI Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) project (DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GIXC00000000.1) (accessed on 1 May 2021) [57].

### 5.3. Functional Annotation and Gene Ontology

Sequences from the transcriptome were annotated using sequence homology against the UniProtKB/Swiss-Prot database (<https://www.uniprot.org/>, accessed on 1 June 2021) with the DIAMOND software (e-value threshold of  $1.0 \times 10^{-6}$ ) [58]. GO terms were assigned for Blastx hits using the Blast2Go software [59]. Briefly, sequences were analyzed employing Mapping and Annotation, and GO terms were grouped into the MF domain. GO terms across MF categories were visualized with Python scripts (code repository: [https://github.com/vhelizarraga/Fire\\_coral\\_analysis.git](https://github.com/vhelizarraga/Fire_coral_analysis.git), accessed on 1 June 2021).

### 5.4. Identification of Putative toxins

*M. complanata* proteome was predicted from transcriptome sequences for all three forward and reverse frames using the Seqinr software [60] (Charif and Lobry, 2007). Thereafter, putative toxins were identified in the predicted proteome using Blastp [61]. Shortly, protein sequences were annotated by sequence homology against the Animal Toxin Annotation Project database version UniProtKB 2021\_01 (<https://www.uniprot.org/program/Toxins>, accessed on 1 July 2021) using an e-value threshold of  $1.0E-6$ . After annotation, the hits were filtered and classified; only sequences with an e-value equal to or smaller than  $1.0E-20$  and matching a length > 10 amino acids were considered toxins.

### 5.5. Multiple Sequence Alignments

Representative putative toxins (one hemolysin and one PFT) were selected for multiple sequence alignment analysis against the related homolog sequences from the UniProtKB/Swiss-Prot protein database. ClustalOmega was used for sequence alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, accessed 1 August 2021) [62] and the results were visualized with the Jalview software version 2.11.1.4 [63].

### 5.6. Prediction of AMPs

Sequences with a length smaller than 100 amino acids were retrieved from the predicted *M. complanata* proteome using Linux (code repository: [https://github.com/vhelizarraga/Fire\\_coral\\_analysis.git](https://github.com/vhelizarraga/Fire_coral_analysis.git), accessed on 2 September 2021). Potential AMPs were identified from these sequences with amPEPpy [64]. The antimicrobial activity was inferred by implementing a random forest classifier using the distribution descriptor set from the Global Protein Sequence Descriptors. Sequences less than 10 amino acids long and containing nonstandard amino acids were not evaluated. Sequences with a predicted probability higher than 0.8 were recovered. Annotations were carried out employing the DIAMOND software [58] against the following two databases: the Data Repository of Antimicrobial Peptides—DRAMP (<http://dramp.cpu-bioinform.org/>, accessed on 30 September 2021) [65];

and the Antimicrobial peptide Database—AP3 (<https://wangapd3.com/main.php>, accessed on 30 September 2021) [66].

#### 5.7. Sample Collection and *M. complanata* Nematocysts Proteome Preparation

Specimens of *M. complanata* were obtained from the Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico in November 2016. Samples were collected using a chisel and hammer at 4 m depth and stored in liquid nitrogen. Extraction of nematocysts content was carried out by osmotic shock as previously described [24]. This procedure is commonly employed for extracting cnidarians toxins and the resulting extract is enriched with soluble peptides and mainly, but not exclusively, from nematocyst origin [67,68]. Briefly, 200 g of hydrocoral sample was placed in a 500 mL beaker and 300 mL of triple distilled deionized water at pH 7 was added. Protein extraction was carried out employing a seesaw shaker for 24 h at 4 °C. The resulting aqueous extract was centrifuged at 12,000 rpm until sediments were not present. Thereafter, the solution was filtered using a Waltman 40 cellulose filter and frozen at −70 °C. Subsequently, the frozen aqueous extract was lyophilized and the protein content was determined using a 2D Quant kit from GE Healthcare as per the manufacturer's instructions.

#### 5.8. One-Dimensional and Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The nematocyst proteome was analyzed employing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously described [27]. The lyophilized powder containing 80 µg of protein was resuspended in proteomic grade water. Samples ( $n = 3$ ) were resolved in 18% polyacrylamide using Tris-glycine as a running buffer (running conditions: 120 V for 1.5 h). In addition, the nematocyst proteome was analyzed by high-resolution two-dimensional electrophoresis (2DE) as previously described [26]. Samples (750 µg of protein;  $n = 3$ ) were solubilized in rehydration buffer (8M urea, 2% SDS, 0.375M Tris-HCl (pH 8.8), 20% glycerol, and 2% DTT (*w/v*)) and separated by isoelectrofocusing. Immobilized pH gradient strips (pH range 3–10) were loaded on an isoelectrofocusing system Bio-Rad PROTEAN<sup>®</sup>i12<sup>™</sup> (Hercules, CA, USA, Bio-Rad) for a total of 20,000 Vh. After isoelectrofocusing, the IPG strips were reduced using equilibration buffer containing 6M urea, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, 50% glycerol, and 2% (*w/v*) dithiothreitol (DTT), and alkylated with 6 M urea, 2% SDS, 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8, 50% glycerol, and 2.5% (*w/v*) iodoacetamide. Thereafter, samples were run on TGXTM 18% polyacrylamide precast SDS-PAGE gels (CA, USA, Bio-Rad) at 150 V for 2 h at 4 °C. Protein bands and spots were visualized by silver staining. The Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA) were used for molecular mass estimation.

#### 5.9. Zymographic Analysis

Hemolytic and PLA2 activities were assessed using indirect zymography. All zymographic analyses were carried out employing 100 µg of protein. Samples were resolved by SDS-PAGE as previously described. After running SDS-PAGE, gels were washed with 100 mM Tris-HCl for 1 h and incubated with 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 on substratum gels. In the case of hemolytic activity, the gels were incubated for 4 h at 37 °C on substratum gels (agar 1.5%), enriched with washed human erythrocytes (3%). For PLA2 activity detection, gels were additionally washed with 100 mM Tris-HCl and 1.0%, Triton X-100 (pH 7.4) for 1 h to remove traces of SDS and incubated for 15 h at 37 °C on an agarose gel (2%) prepared with 50 mM Tris-HCl and 6% egg yolk. PLA2 from honeybee venom (*Apis mellifera*) was employed as a positive control. On the other hand, the protease activity was determined by direct zymography. Then, 12% SDS-PAGE gels containing gelatin (2 mg/mL) or casein (2 mg/mL) were used for protein separation. Afterward, gels were washed twice for 20 min with Triton X-100 2.5% and then were incubated for 17 h at 37 °C in 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4). Next, gels were stained with Coomassie Blue R-250 (0.125%) in methanol (45%) and acetic acid (10%) for 1 h. Finally, gels were cleared with ethanol (40%) and acetic acid (10%). Protein bands

displaying enzymatic activity appeared as clear bands in the zymogram gels. Zymographic analyses were determined in three biological replicates.

#### 5.10. Hemolytic Activity Assay

The hemolytic activity of the *M. complanata* nematocysts proteome was determined as previously reported [24]. In short, samples of human erythrocytes (1%) were suspended in 1 mL Alsever's solution (120 mM D-glucose, 30 mM sodium citrate, 7 mM NaCl, and 2 mM citric acid, pH 7.4). The following protein concentrations were assessed: 2.18, 3.16, 4.5, 6.6, 7.9, 9.56, 11.48, and 24.54  $\mu\text{g}$  of protein per mL. Samples were incubated at 37 °C for 30 min and centrifuged at 2300 rpm. Subsequently, the free hemoglobin in the supernatant was measured spectrophotometrically at 415 nm. The HU50 was determined using the DRC package of R statistical software (code repository: [https://github.com/vhelizarraga/Fire\\_coral\\_analysis.git](https://github.com/vhelizarraga/Fire_coral_analysis.git), accessed on 2 October 2021) [69]. Specific inhibitors of hemolysis were used as controls: N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, trypsin inhibitor), N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, chymotrypsin irreversible inhibitor), BB-94; (2R,3S)-N4-Hydroxy-N1-[(1S)-2-(methylamino)-2-oxo-1-(phenylmethyl)ethyl]-2-(2-methylpropyl)-3-[(2-thienylthio)methyl] butanediamine (Batimastat, matrix metalloprotease inhibitor), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, serine protease inhibitor), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, non-selective protease inhibitor), and 2-[[3-(2-Amino-2-oxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy]acetic acid (Veraspladib, sPLA2 inhibitor). The optimum concentration of each inhibitor was standardized according to previously reported concentrations. Inhibition induced by each inhibitor on the hemolytic activity was measured after incubation for 30 min at 37 °C.

#### 5.11. Antibacterial Activity Assay

The nematocysts proteome of *M. complanata* was filtered using Amicon<sup>®</sup> filter tubes according to the manufacturer's instructions (Amicon<sup>®</sup> Pro Purification System, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Then, the antibacterial activity of this proteome fraction, containing peptides smaller than 10 kDa, was evaluated against 17 species of Gram-positive and Gram-negative bacteria by the disc diffusion method. The following bacteria strains were employed: *Salmonella agona*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas perfectomarina*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium xerosis*, *Kytococcus dedenturius*, *Exiguobacterium amuntiacum*, *Bacillus koreensis*, *Micrococcus luteus*, *Microbacterium oleivorans*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus*, and *Staphylococcus aureus*. In short, plates containing Muller-Hinton agar were inoculated with 10  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension (adjusted to the McFarland standard No.1). Plates were dried for 15 min and then employed for the sensitivity test. Sterile discs were impregnated with *M. complanata* peptidome samples (40  $\mu\text{g}$  protein/disc;  $n = 3$ ) and placed on the Muller-Hinton agar plates. Then, plates were incubated at 37 °C for 24 h. Inhibition zone diameters were determined after incubation. The MIC was assessed by the agar microdilution method using 96-well plates. MIC was determined employing the following protein concentrations: 400, 40, 4, 0.4, 0.04 and 0.004  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . All analyses were carried out in triplicate using bacterial suspensions adjusted to the McFarland standard No. 1. The 96 well plates were incubated at 37 °C for 24 h and the MIC was calculated spectrophotometrically at 600 nm.

**Author Contributions:** V.H.H.-E.: conceptualization, investigation, formal analysis, and writing—original draft preparation. A.O.-M., N.O.-L. and R.H.-M.: investigation. J.C.-P.: supervision, formal analysis, review, and editing. C.I.-A.: supervision, review, and editing. A.R.-M.: conceptualization, project administration, funding acquisition, review, and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by grant 316849 from "Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04)" of the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT), "Fondo Química Somos Todos 2021



(FCQ202108)” of the Faculty of Chemistry of the Autonomous University of Queretaro and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for V.H.-E. graduate grant (CVU: 709502).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidad Autónoma de Querétaro (protocol code CQB19/058, on 1 August 2019) for studies involving animals.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in [https://github.com/vhelizarraga/Fire\\_coral\\_analysis.git](https://github.com/vhelizarraga/Fire_coral_analysis.git) (accessed on 2 October 2021).

**Acknowledgments:** V.H.H.-E. acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for his graduate grant (CVU: 709502). This work was funded by grant 316849 from “Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04)” of the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and “Fondo Química Somos Todos 2021 (FCQ202108)” of the Faculty of Chemistry of the Autonomous University of Queretaro.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Jouiaei, M.; Yanagihara, A.A.; Madio, B.; Nevalainen, T.J.; Alewood, P.F.; Fry, B.G. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* **2015**, *7*, 2251–2271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Özbek, S. The cnidarian nematocyst: A miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma* **2011**, *248*, 635–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nevalainen, T.J.; Peuravuori, H.J.; Quinn, R.J.; Llewellyn, L.E.; Benzie, J.A.; Fenner, P.J.; Winkel, K.D. Phospholipase A<sub>2</sub> in cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *139*, 731–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Podobnik, M.; Anderluh, G. Pore-forming toxins in Cnidaria. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; Volume 72, pp. 133–141. [[CrossRef](#)]
- Mariottini, G.L.; Bonello, G.; Giacco, E.; Pane, L. Neurotoxic and neuroactive compounds from Cnidaria: Five decades of research ... and more. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 74–80. [[CrossRef](#)]
- D’Ambra, I.; Lauritano, C. A Review of Toxins from Cnidaria. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 507. [[CrossRef](#)]
- Burke, J.E.; Dennis, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S237–S242. [[CrossRef](#)]
- Talvinen, K.A.; Nevalainen, T.J. Cloning of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from the cnidarian *Adamsia carciniopados*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *132*, 571–578. [[CrossRef](#)]
- Macrander, J.; Daly, M. Evolution of the cytolytic pore-forming proteins (Actinoporins) in sea anemones. *Toxins* **2016**, *8*, 368. [[CrossRef](#)]
- Rojko, N.; Dalla Serra, M.; Maček, P.; Anderluh, G. Pore formation by actinoporins, cytolytins from sea anemones. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. Pore-Form. Toxins Cell. Eff. Biotech Appl.* **2016**, *1858*, 446–456. [[CrossRef](#)]
- Liao, Q.; Feng, Y.; Yang, B.; Lee, S.M.-Y. Cnidarian peptide neurotoxins: A new source of various ion channel modulators or blockers against central nervous systems disease. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 189–197. [[CrossRef](#)]
- Rocha, J.; Peixe, L.; Gomes, N.C.M.; Calado, R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1860–1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mariottini, G.L.; Grice, I.D. Antimicrobials from Cnidarians. A New Perspective for Anti-Infective Therapy? *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bosch, T.C. The path less explored: Innate immune reactions in cnidarians. In *Innate Immunity of Plants, Animals, and Humans*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2008; pp. 27–42.
- Mariottini, G.L.; Grice, I.D. Natural Compounds and Drug Discovery: Can Cnidarian Venom Play a Role? *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Cent. Nerv. Syst. Agents* **2019**, *19*, 114–118. [[CrossRef](#)]
- Rojas-Molina, A.; García-Arredondo, A.; Ibarra-Alvarado, C.; Bah, M. *Millepora* (“fire corals”) species: Toxinological studies until 2011. *Adv. Environ. Res.* **2012**, *26*, 133–148.
- Radwan, F.F. Comparative toxinological and immunological studies on the nematocyst venoms of the Red Sea fire corals *Millepora dichotoma* and *M. platyphylla*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *131*, 323–334. [[CrossRef](#)]
- Shiomi, K.; Hosaka, M.; Yanaike, N.; Yamanaka, H.; Kikuchi, T. Partial Characterization of Venoms from Two Species of Fire Corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **1989**, *55*, 357–362. [[CrossRef](#)]
- Middlebrook, R.E.; Wittle, L.W.; Scura, E.D.; Lane, C.E. Isolation and purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon* **1971**, *9*, 333–336. [[CrossRef](#)]
- Wittle, L.W.; Scura, E.D.; Middlebrook, R.E. Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: A comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon* **1974**, *12*, 481–482. [[CrossRef](#)]

21. Wittle, L.W.; Middlebrook, R.E.; Lane, C.E. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon* **1971**, *9*, 327–331. [[CrossRef](#)]
22. Rojas, A.; Torres, M.; Rojas, J.I.; Feregrino, A.; Heimer-de la Cotera, E.P. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon* **2002**, *40*, 777–785. [[CrossRef](#)]
23. García-Arredondo, A.; Rojas-Molina, A.; Bah, M.; Ibarra-Alvarado, C.; Gallegos-Corona, M.A.; García-Servín, M. Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *169*, 55–64. [[CrossRef](#)]
24. Hernández-Matehuala, R.; Rojas-Molina, A.; Vuelvas-Solórzano, A.A.; García-Arredondo, A.; Alvarado, C.I.; Olguín-López, N.; Aguilar, M. Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* collected in the Mexican Caribbean and detection of two types of cytolisins. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **2015**, *21*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Iguchi, A.; Iwanaga, S.; Nagai, H. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 107–112. [[CrossRef](#)]
26. Hernández-Elizárraga, V.H.; Olguín-López, N.; Hernández-Matehuala, R.; Ocharán-Mercado, A.; Cruz-Hernández, A.; Guevara-González, R.G.; Caballero-Pérez, J.; Ibarra-Alvarado, C.; Sánchez-Rodríguez, J.; Rojas-Molina, A. Comparative Analysis of the Soluble Proteome and the Cytolytic Activity of Unbleached and Bleached *Millepora complanata* (“Fire Coral”) from the Mexican Caribbean. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 393. [[CrossRef](#)]
27. Olguín-López, N.; Hernández-Elizárraga, V.H.; Hernández-Matehuala, R.; Cruz-Hernández, A.; Guevara-González, R.; Caballero-Pérez, J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A. Impact of El Niño-Southern Oscillation 2015–2016 on the soluble proteomic profile and cytolytic activity of *Millepora alcicornis* (“fire coral”) from the Mexican Caribbean. *PeerJ* **2019**, *7*, e6593. [[CrossRef](#)]
28. Šuput, D. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon Cnidarian Toxins Venoms* **2009**, *54*, 1190–1200. [[CrossRef](#)]
29. García-Arredondo, A.; Rojas-Molina, A.; Ibarra-Alvarado, C.; Iglesias-Prieto, R. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2011**, *396*, 171–176. [[CrossRef](#)]
30. Radwan, F.F.; Aboul-Dahab, H.M. Milleporin-1, a new phospholipase A<sub>2</sub> active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *139*, 267–272. [[CrossRef](#)]
31. Balasubramanian, P.G.; Beckmann, A.; Warnken, U.; Schnölzer, M.; Schüler, A.; Bornberg-Bauer, E.; Holstein, T.W.; Özbek, S. Proteome of *Hydra Nematocyst*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9672–9681. [[CrossRef](#)]
32. Liu, G.; Zhou, Y.; Liu, D.; Wang, Q.; Ruan, Z.; He, Q.; Zhang, L. Global transcriptome analysis of the tentacle of the jellyfish *Cyanea capillata* using deep sequencing and expressed sequence tags: Insight into the toxin-and degenerative disease-related transcripts. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Klompen, A.M.; Macrander, J.; Reitzel, A.M.; Stampar, S.N. Transcriptomic analysis of four cerianthid (Cnidaria, Ceriantharia) venoms. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, Z.-C.; Zhang, R.; Zhao, F.; Chen, Z.-M.; Liu, H.-W.; Wang, Y.-J.; Jiang, P.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Ding, J.-P. Venomic and transcriptomic analysis of centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 6197–6212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sher, D.; Fishman, Y.; Zhang, M.; Lebendiker, M.; Gaathon, A.; Mancheño, J.-M.; Zlotkin, E. Hydralysins, a New Category of  $\beta$ -Pore-forming Toxins in Cnidaria. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22847–22855. [[CrossRef](#)]
36. Seo, J.-K.; Lee, M.J.; Go, H.-J.; Kim, G.D.; Jeong, H.D.; Nam, B.-H.; Park, N.G. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* **2013**, *53*, 88–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wu, Z.; Wu, Y.; Fischer, J.; Bartels, J.; Schröder, J.-M.; Meyer-Hoffert, U. Skin-Derived SPINK9 Kills *Escherichia coli*. *J. Invest. Dermatol.* **2019**, *139*, 1135–1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hiemstra, P.S.; van den Barselaar, M.T.; Roest, M.; Nibbering, P.H.; van Furth, R. Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **1999**, *66*, 423–428. [[CrossRef](#)]
39. Anderluh, G.; Maček, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **2002**, *40*, 111–124. [[CrossRef](#)]
40. García-Arredondo, A.; Rojas-Molina, A.; Ibarra-Alvarado, C.; Lazcano-Pérez, F.; Arreguín-Espinosa, R.; Sánchez-Rodríguez, J. Composition and biological activities of the aqueous extracts of three scleractinian corals from the Mexican Caribbean: *Pseudodiploria strigosa*, *Porites astreoides* and *Siderastrea siderea*. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **2016**, *22*, 32. [[CrossRef](#)]
41. Frazão, B.; Vasconcelos, V.; Antunes, A. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1812–1851. [[CrossRef](#)]
42. Wang, C.; Wang, B.; Wang, B.; Wang, Q.; Liu, G.; Wang, T.; He, Q.; Zhang, L. Unique Diversity of Sting-Related Toxins Based on Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Jellyfish *Cyanea capillata* and *Nemopilema nomurai* (Cnidaria: Scyphozoa). *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 436–448. [[CrossRef](#)]
43. Ponce, D.; Brinkman, D.L.; Potriquet, J.; Mulvenna, J. Tentacle Transcriptome and Venom Proteome of the Pacific Sea Nettle, *Chrysaora fuscescens* (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxins* **2016**, *8*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Riyas, A.; Kumar, A.; Chandran, M.; Jaleel, A.; Biju Kumar, A. The venom proteome of three common scyphozoan jellyfishes (*Chrysaora caliparea*, *Cyanea nozakii* and *Lychnorhiza malayensis*) (Cnidaria: Scyphozoa) from the coastal waters of India. *Toxicon* **2021**, *195*, 93–103. [[CrossRef](#)]

45. Anderluh, G.; Sepčić, K.; Turk, T.; Maček, P. Cytolytic proteins from cnidarians—An overview. *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58*, 724–729. [[PubMed](#)]
46. Mariottini, G.L.; Pane, L. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins* **2014**, *6*, 108–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. García-Arredondo, A.; Murillo-Esquivel, L.J.; Rojas, A.; Sanchez-Rodriguez, J. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora complanata*. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **2014**, *20*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Martins, R.D.; Alves, R.S.; Martins, A.M.C.; Barbosa, P.S.F.; Evangelista, J.S.A.M.; Evangelista, J.J.F.; Ximenes, R.M.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Souza, A.J.F.; et al. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A<sub>2</sub> from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* **2009**, *54*, 413–420. [[CrossRef](#)]
49. Romero, L.; Marcussi, S.; Marchi-Salvador, D.P.; Silva, F.P., Jr.; Fuly, A.L.; Stábéli, R.G.; da Silva, S.L.; González, J.; del Monte, A.; Soares, A.M. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie* **2010**, *92*, 1063–1071. [[CrossRef](#)]
50. Razpotnik, A.; Križaj, I.; Šribar, J.; Kordiš, D.; Maček, P.; Frangež, R.; Kem, W.R.; Turk, T. A new phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis*—Its primary structure and phylogenetic classification. *FEBS J.* **2010**, *277*, 2641–2653. [[CrossRef](#)]
51. Li, R.; Yu, H.; Xue, W.; Yue, Y.; Liu, S.; Xing, R.; Li, P. Jellyfish venomomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *J. Proteom.* **2014**, *106*, 17–29. [[CrossRef](#)]
52. Pan, T.-L.; Gröger, H.; Schmid, V.; Spring, J. A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish *Podocoryne carnea* with a dual role in digestion and development. *Dev. Genes Evol.* **1998**, *208*, 259–266. [[CrossRef](#)]
53. Gusmani, L.; Avian, M.; Galil, B.; Patriarca, P.; Rottini, G. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*. *Toxicon* **1997**, *35*, 637–648. [[CrossRef](#)]
54. Moran, Y.; Praher, D.; Schlesinger, A.; Ayalon, A.; Tal, Y.; Technau, U. Analysis of soluble protein contents from the nematocysts of a model sea anemone sheds light on venom evolution. *Mar. Biotechnol.* **2013**, *15*, 329–339. [[CrossRef](#)]
55. Sher, D.; Knebel, A.; Bsoir, T.; Neshor, N.; Tal, T.; Morgenstern, D.; Cohen, E.; Fishman, Y.; Zlotkin, E. Toxic polypeptides of the hydra—A bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon* **2005**, *45*, 865–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gacesa, R.; Chung, R.; Dunn, S.R.; Weston, A.J.; Jaimes-Becerra, A.; Marques, A.C.; Morandini, A.C.; Hranueli, D.; Starcevic, A.; Ward, M.; et al. Gene duplications are extensive and contribute significantly to the toxic proteome of nematocysts isolated from *Acropora digitifera* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *BMC Genom.* **2016**, *16*, 774. [[CrossRef](#)]
57. Hernández-Elizárraga, V.H.; Olguín-López, N.; Hernández-Matehuala, R.; Caballero-Pérez, J.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A. Comprehensive Metatranscriptome Analysis of the Reef-Building Holobiont *Millepora complanata*. *Front. Mar. Sci.* **2021**, *8*, 149. [[CrossRef](#)]
58. Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 59–60. [[CrossRef](#)]
59. Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J.M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3674–3676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Charif, D.; Lobry, J.R. SeqinR 1.0-2: A contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In *Structural Approaches to Sequence Evolution*; Springer: Heidelberg, Germany, 2007; pp. 207–232.
61. Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T.L. NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W5–W9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sievers, F.; Higgins, D.G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In *Multiple Sequence Alignment Methods*; Springer: Clifton, NJ, USA, 2014; pp. 105–116.
63. Clamp, M.; Cuff, J.; Searle, S.M.; Barton, G.J. The Jalview java alignment editor. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 426–427. [[CrossRef](#)]
64. Lawrence, T.J.; Carper, D.L.; Spangler, M.K.; Carrell, A.A.; Rush, T.A.; Minter, S.J.; Weston, D.J.; Labbé, J.L. amPEPpy 1.0: A portable and accurate antimicrobial peptide prediction tool. *Bioinformatics* **2021**, *37*, 2058–2060. [[CrossRef](#)]
65. Kang, X.; Dong, F.; Shi, C.; Liu, S.; Sun, J.; Chen, J.; Li, H.; Xu, H.; Lao, X.; Zheng, H. DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Sci. Data* **2019**, *6*, 148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1087–D1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Marino, A.; Crupi, R.; Rizzo, G.; Morabito, R.; Musci, G.; La Spada, G. The unusual toxicity and stability properties of crude venom from isolated nematocysts of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa). *Cell. Mol. Biol.* **2007**, *53*, 994–1002.
68. Morabito, R.; Dossena, S.; La Spada, G.; Marino, A. Heavy metals affect nematocysts discharge response and biological activity of crude venom in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa). *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *34*, 244–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Ritz, C.; Baty, F.; Streibig, J.C.; Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0146021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Important declarations

Please remove this info from manuscript text if it is also present there.

### Associated Data

---

**New DNA/RNA/peptide etc. sequences were reported.**

**Sequences supplied by author here:**

The raw data/repositories presented in this study can be found online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ,  
BioProject: PRJNA524427; and  
[https://github.com/vhelizarraga/Effect\\_thermal\\_strees\\_on\\_Mcomplanata.git](https://github.com/vhelizarraga/Effect_thermal_strees_on_Mcomplanata.git).

**Data supplied by the author:**

The raw data/repositories presented in this study can be found online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ,  
BioProject: PRJNA524427; and  
[https://github.com/vhelizarraga/Effect\\_thermal\\_strees\\_on\\_Mcomplanata.git](https://github.com/vhelizarraga/Effect_thermal_strees_on_Mcomplanata.git).

### Required Statements

---

**Competing Interest statement:**

The authors declare that they have no competing interests.

**Funding statement:**

This project was financed by the Autonomous University of Queretaro (Convocatoria Química Somos Todos 2021) and by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) through the grant 316849 from Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04).

## Transcriptomic differences between bleached and unbleached *Millepora complanata* following the 2015-2016 “El Niño” Southern Oscillation 2015-2016 in the Mexican Caribbean

Victor Hugo Hernández-Elizárraga<sup>1</sup>, Norma Olgüín-López<sup>1</sup>, Rosalina Hernández-Matehuala<sup>1</sup>, Juan Caballero-Pérez<sup>2</sup>, César Ibarra-Alvarado<sup>3</sup>, Alejandra Rojas-Molina<sup>Corresp. 3</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

<sup>2</sup> European Bioinformatics Institute, EBI-Hinxton, Cambridge, United Kingdom

<sup>3</sup> Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

Corresponding Author: Alejandra Rojas-Molina  
Email address: rojas@uaq.mx

“El Niño” Southern Oscillation (ENSO) 2015-2016 caused that many *M. complanata* colonies that live in the Mexican Caribbean experienced extensive bleaching. The purpose of this work was to analyze the effect of bleaching on the cellular response of *M. complanata*, employing a transcriptomic approach with RNA-seq. As expected, bleached specimens contained a significantly lower chlorophyll content than unbleached hydrocorals and the presence of algae of the genera *Durusdinium* and *Cladocopium*. was only found in tissues of unbleached *M. complanata*, which could be associated to the greater resistance that these colonies exhibited during bleaching. We found that 299 genes were differentially expressed in *M. complanata* bleached colonies following the 2015-2016 ENSO in the Mexican Caribbean. The differential response of *M. complanata* to bleaching showed enriched terms for functional categories, such as ribosome, RNA polymerase and basal transcription factors, chaperone, oxidoreductase, among others. Our results suggest that the heat-shock response mechanisms displayed by *M. complanata* include: an up-regulation of endogenous antioxidant defenses; a higher expression of heat stress response genes; up-regulation of transcription-related genes, higher expression of genes associated to transport processes, inter alia. This study constitutes the first differential gene expression analysis of the molecular response of a reef-forming hydrozoan during bleaching.

1 **Transcriptomic differences between bleached and unbleached**  
2 ***Millepora complanata* following the 2015-2016 “El Niño” Southern**  
3 **Oscillation 2015-2016 in the Mexican Caribbean**

4

5 Víctor Hugo Hernández-Elizárraga<sup>1</sup>, Norma Olguín-López<sup>1</sup>, Rosalina Hernández-  
6 Matehuala<sup>1</sup>, Juan Caballero-Pérez<sup>3</sup>, César Ibarra-Alvarado<sup>2</sup> and Alejandra Rojas-  
7 Molina<sup>2\*</sup>

8

9 <sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Facultad de Química, Universidad  
10 Autónoma de Querétaro, Qro., México.

11 <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales,  
12 Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., México.

13 <sup>3</sup>EMBL - EBI, Hinxton, United Kingdom.

14

15 \*Corresponding author: Alejandra Rojas-Molina [rojasa@uaq.mx](mailto:rojasa@uaq.mx)

16

17 **Abstract**

18 “El Niño” Southern Oscillation (ENSO) 2015-2016 caused that many *M. complanata*  
19 colonies that live in the Mexican Caribbean experienced extensive bleaching. The  
20 purpose of this work was to analyze the effect of bleaching on the cellular response of  
21 *M. complanata*, employing a transcriptomic approach with RNA-seq. As expected,  
22 bleached specimens contained a significantly lower chlorophyll content than unbleached  
23 hydrocorals and the presence of algae of the genera *Durusdinium* and *Cladocopium*.

24 was only found in tissues of unbleached *M. complanata*, which could be associated to  
25 the greater resistance that these colonies exhibited during bleaching. We found that 299  
26 genes were differentially expressed in *M. complanata* bleached colonies following the  
27 2015-2016 ENSO in the Mexican Caribbean. The differential response of *M.*  
28 *complanata* to bleaching showed enriched terms for functional categories, such as  
29 ribosome, RNA polymerase and basal transcription factors, chaperone, oxidoreductase,  
30 among others. Our results suggest that the heat-shock response mechanisms displayed  
31 by *M. complanata* include: an up-regulation of endogenous antioxidant defenses; a  
32 higher expression of heat stress response genes; up-regulation of transcription-related  
33 genes, higher expression of genes associated to transport processes, inter alia. This  
34 study constitutes the first differential gene expression analysis of the molecular  
35 response of a reef-forming hydrozoan during bleaching.

36

37 **Keywords:** *Millepora complanata*, RNA-seq, transcriptomics, coral bleaching, thermal  
38 stress.

39

#### 40 **Introduction**

41 Coral reefs, built by scleractinian corals and hydrocorals, play a substantial role in  
42 marine ecology and human sustainability. Reef-forming cnidarians establish a  
43 mutualistic symbiosis with photosynthetic algae of the Symbiodiniaceae family  
44 (González-Pech et al. 2019). Cnidaria-Symbiodiniaceae symbiosis is essential for coral  
45 reefs sustenance, since photosynthetic algae supply most of the energetic requirements  
46 of their cnidarian hosts, which enables coral skeleton growth by calcium carbonate



47 deposition (Cziesielski et al. 2019). Nowadays, coral reefs are seriously endangered by  
48 an accelerated human-induced climate change, which has resulted in a drastic  
49 worldwide coral cover decline that seriously threatens marine biodiversity (Hein et al.  
50 2019, Rinkevich 2019). The current increased and prolonged thermal stress causes the  
51 breakdown of Cnidarian-Symbiodiniaceae symbiosis, which triggers coral bleaching.  
52 This phenomenon consists in a decrease or loss of symbionts' population leading to  
53 destabilization of the balance in the symbiotic community of reef-forming holobionts  
54 (Hoegh-Guldberg 1999, Hughes et al. 2017, Lesser 2006; Suggett & Smith 2020). The  
55 large scale climatic phenomenon known as "El Nino southern oscillation" (ENSO)  
56 significantly contributes to coral bleaching events. During a bleaching episode, a state  
57 of oxidative stress, generated by the overproduction of reactive oxygen species (ROS),  
58 causes the expulsion of algae from the host. These perturbations induced by climate  
59 change seriously threaten the integrity and resilience of coral reefs and marine  
60 ecosystems that depend on them (Montero-Serra et al. 2019). In recent years, high  
61 mortality rates of coral reefs all over the world have triggered a rapid deterioration of  
62 reef structures and a far-reaching environmental impact (Eakin et al. 2019). Numerous  
63 scientific studies aimed at understanding the etiology and effects of coral bleaching  
64 have been conducted employing transcriptomics approaches, which have demonstrated  
65 that thermal stress induces the differential expression of genes encoding different  
66 cellular components and diverse molecular processes. Similar studies carried out on  
67 non-reef forming cnidarians have also provided key information about the responses of  
68 these organisms to thermal stress. A study carried out on the sea anemone *Anthopleura*  
69 *elegantissima*, exposed to thermal stress and high UV radiation, evidenced a differential

70 expression of genes that code for cytoskeletal proteins and proteins associated to  
71 biosynthesis, cell proliferation, apoptosis, and transport (Richier et al. 2008). On the  
72 other hand, exposure to heat stress elicited an increase in the expression of transcripts  
73 related to cell death signaling pathways and calcium homeostasis in the symbiotic  
74 *Anemonia viridis* (Moya et al. 2012). Regarding studies performed on reef-forming  
75 cnidarians, a cDNA microarray analysis showed differentially expressed genes related  
76 to oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, cytoskeletal organization, cell death, calcification,  
77 metabolism, protein synthesis, heat shock proteins (HSP), and transposon activity in the  
78 Caribbean coral *Montastraea faveolata* subjected to experimental heat stress (DeSalvo  
79 et al. 2008). An investigation of the effect of thermal stress on *Acropora palmata*  
80 revealed modifications in the expression of genes related to growth arrest, chaperone  
81 activity, nucleic acid stabilization, and removal of damaged macromolecules (DeSalvo et  
82 al. 2010). Some transcriptomic studies have supplied relevant information regarding the  
83 molecular mechanisms underlying the heat tolerance exhibited by certain coral species.  
84 An RNA-Seq experiment indicated a constitutive up-regulation of genes codifying for the  
85 gluconeogenesis enzymes, pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate  
86 carboxykinase, and the lipid beta-oxidation enzyme acyl-CoA dehydrogenase in *Porites*  
87 *astreoides* specimens that lived in warmer coastal areas (Kenkel et al. 2013) An RNA-  
88 Seq-based investigation was performed on bleached and unbleached colonies of  
89 *Obicella faveolata* and several putative immunity genes were identified (Anderson et al.  
90 2016). Interestingly, some species of the Red sea (*Stylophora pistillata*) and the  
91 Mediterranean (*Balanophyllia europaea*), subjected to a long-term gradual temperature  
92 increase, showed a massive up-regulation of genes involved in the generation of

93 metabolic energy, indicating a highly dynamic transcriptome response to thermal stress  
94 (Maor-Landaw et al. 2017). In another study, the transcriptome response of heat-  
95 stressed *Acropora hyacinthus* colonies was assessed. Colonies maintaining higher  
96 expression levels of heat-responsive genes during the experimental time (20 h)  
97 underwent severe bleaching and those genes, whose expression fast returned to  
98 normal levels were associated with low bleaching (Seneca & Palumbi, 2015). Thomas et  
99 al (2019) evaluated the impact of repeated bleaching events on two heat sensitive  
100 *Acropora* species (*Acropora gemmifera* and *Acropora hyacinthus*) living in reefs located  
101 on the southern coast of American Samoa. By examining transcriptome wide changes  
102 in gene expression, they found that recovery from recurrent bleaching events comprises  
103 diverse physiological processes and symbiont shifting (Thomas et al. 2019). Evidently,  
104 whole-transcriptome gene expression studies have allowed a much deeper insight into  
105 complexity of the holobiont's stress response (Mayfield et al. 2014, Kaniewska et al.  
106 2015, González-Pech et al. 2017). The vast majority of investigations aimed at  
107 evaluating the influence of heat stress on the cellular processes of reef forming  
108 cnidarians have focused on Anthozoa species, and to date very little is known about the  
109 cellular response of Hydrozoa species to thermal stress. Two previous proteomics  
110 studies, carried out by our research group, demonstrated that thermal stress induced  
111 changes on the soluble proteome of *M. alvicornis* and *M. complanata*. A differential  
112 expression of proteins related to exocytosis, calcium homeostasis, cytoskeleton  
113 organization, and toxins was detected in *Millepora alvicornis* (Olguín-López et al. 2019),  
114 whereas *Millepora complanata* showed differential expression of proteins related to  
115 primary metabolism, cytoskeleton, signaling, DNA repair, stress response, redox

116 homeostasis, exocytosis, calcium homeostasis, and toxins (Hernández-Elizárraga et al.  
117 2019). Recently, we reported the metatranscriptome of the *M. complanata* holobiont  
118 (Hernández-Elizárraga et al. 2021), however, no prior transcriptomics studies have  
119 addressed the impact of increased ocean temperature on the cellular response of  
120 hydrocorals. Therefore, the objective of this study was to determine the differences  
121 observed at the transcriptomic level between unbleached and bleached *Millepora*  
122 *complanata* holobionts that were exposed to the 2015-2016 "El Niño" Southern  
123 Oscillation in the Mexican Caribbean.

124

#### 125 **Materials & Methods**

##### 126 **Ethics statements**

127 This investigation was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of  
128 Chemistry at the Autonomous University of Querétaro, México (approval code  
129 CBQ19/058). The collection of *M. complanata* specimens was authorized by Secretaría  
130 del Medio Ambiente y Recursos Naturales de México (SEMARNAT) (permit number  
131 PFP-DGOPA-139/15).

132

##### 133 **Hydrocorals sampling**

134 Unbleached (UMc) and bleached (BMc) *M. complanata* fragments were collected in the  
135 Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, México (21°00'00" and  
136 20°48'33" North latitude and 86°53'14.40" and 86°46'38.94" West longitude) in  
137 November 2016, after the ENSO event of 2015–2016. Twenty samples with an  
138 approximate area of 25 cm<sup>2</sup> were collected from the edges of bleached (BMc) and

139 unbleached (UMc) colonies of *M. complanata* located at ~5 m-depth and at a distance  
140 of at least 10 m between them. Each fragment, either bleached or unbleached, was  
141 sampled from different colonies. Collected hydrocoral samples were immediately  
142 preserved in liquid nitrogen.

143

#### 144 **Quantification of chlorophyll content**

145 To assess the degree of bleaching in *M. complanata* samples, the total chlorophyll  
146 content was determined by a spectroscopic method, using a SPAD 502 Plus  
147 Chlorophyll Meter (Tierranegra-García et al. 2011). Briefly, superficial hydrocoral layers  
148 (~25 mm<sup>2</sup> and ~2 mm thickness) were cut from UMc (n = 8) and BMc (n = 8)  
149 specimens. Then, samples were analyzed with the SPAD 502 equipment and  
150 chlorophyll concentration was expressed as  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . The SPAD 502 equipment  
151 determines the relative amount of chlorophyll by assessing the transmittance of the  
152 samples at 650 nm (the wavelength at which chlorophyll absorbs light), and at 940 nm,  
153 which is a reference wavelength used to adjust for non-specific variances between  
154 samples. This instrument calculates a SPAD-value (0-100), which is directly related to  
155 the amount of chlorophyll. Statistical significance difference in chlorophyll contents  
156 between UMc and BMc samples was assessed with a Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

157

#### 158 **Genomic DNA extraction and Symbiodiniaceae detection by rDNA markers**

159 Genomic DNA was extracted from three UMc and BMc biologically independent *M.*  
160 *complanata* samples with a CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) adapted  
161 method (Dellacorte, 1994). In brief, coral fragments were powdered with mortar and

162 pestle in liquid nitrogen. Extractions were carried out with 0.1 g of hydrocoral tissue and  
163 1 mL of CTAB buffer (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 0.2 M, and Tris-HCl 0.1 M pH 8.8).  
164 Afterward, 500  $\mu$ L of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) were added. Extracted DNA  
165 samples were precipitated with a 4 M sodium acetate buffer and resuspended in purified  
166 water. Symbiodiniaceae genotypes were determined with specific primers for PCR  
167 amplifications of rDNA markers according to the Symbiodiniaceae identification method  
168 proposed by Correa and Mieog (Correa et al. 2009, Mieog et al. 2007). Primers  
169 employed for the genera *Symbiodinium* (ITS2 locus), *Cladocopium* (ITS1 locus),  
170 *Durusdinium* (ITS1 locus), and *Breviolum* (LSU-28S locus) are listed in Supplemental  
171 Table S1. PCR reactions were performed in 20  $\mu$ L volumes containing 7.5  $\mu$ L of sterile  
172 water, 2  $\mu$ L of 10X Taq Buffer with KCl, 1.5  $\mu$ L MgCl 25 mM, 2  $\mu$ L of genomic DNA, 2.5  
173  $\mu$ L of 2.5 M forward and reverse primers, and 0.5 U/ $\mu$ L of Taq polymerase. Reactions  
174 were carried out in a T100 Bio-rad thermocycler under the following conditions: step 1,  
175 95 °C during 10 min; step 2, 35 cycles consisting of 95 °C during 30 s, 60 °C during 30  
176 s, and 72 °C during 30 s; step 3, 72 °C during 10 min. Amplification products were  
177 resolved in 4% agarose gels for 45 min at 75 V and were sent to the IPICyT (Instituto  
178 Potosino de Investigación Científica) for DNA sequencing with a 3130 Genetic Analyzer  
179 by Applied Biosystems. The amplification of rDNA markers was confirmed by alignment  
180 of the sequences to the Non-redundant NCBI database (accessed May 29, 2019) using  
181 Blastn with an e-value threshold of 1.0E-6. rDNA sequences from the detected  
182 Symbiodiniaceae haplotypes were used to perform a phylogenetic analysis by the  
183 Neighbor-Joining tree inference method to explore the relationship of *M. complanata*

184 symbionts and other symbionts, whose rDNA sequences are deposited in the  
185 GeneBank.

186

187 **RNA isolation, sequencing, and metatranscriptome assembly**

188 RNA was isolated from biologically independent UMc (n = 3) and BMC (n = 5)  
189 specimens (0.1 g of tissue per sample) according to a method previously reported  
190 (Hernández-Elizárraga et al. 2021). Briefly, hydrocoral tissue samples were mixed with  
191 1 mL of extraction buffer (150 mM Tris base, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, and 100  
192 mM EDTA pH 7.5 with saturated boric acid). Then, 100 µL of potassium acetate 5 M,  
193 250 µL of absolute ethanol, and 500 µL of chloroform-isoamyl alcohol (25:1) were  
194 added and vortexed for 1 min. Samples were centrifuged at 12 000 rpm for 10 min,  
195 afterward, the top layer was transferred to a new tube and 500 µL of LiCl 8 M were  
196 added. RNA was precipitated overnight. Extracted RNA was centrifuged at 12 000 rpm  
197 for 10 min, washed with 250 µL of ethanol 70% and resuspended in sterile water.  
198 RNA quality was assessed with an Agilent™ Eukaryote Total RNA Nano chip (Mueller et  
199 al. 2004). cDNA libraries were constructed using the TruSeq RNA Library prep kit as per  
200 manufacturer instructions. Subsequently, cDNA libraries (multiplexed) were sequenced  
201 on the Illumina NextSeq platform using 2 x 150 bp (four lanes). Raw reads were  
202 analyzed with FASTQC for quality control (Brown et al. 2017). Raw data were submitted  
203 to the Sequence Read Archive (SRA) of the NCBI as Bioproject: PRJNA524427 and  
204 Biosample: SAMN11026413. To get a better isoform reconstruction from the RNA-seq  
205 data, each cDNA library (per sample) was independently assembled using SPAdes-  
206 RNA (Bankevich et al. 2012). Then, a combined base metatranscriptome was made by

207 clustering contig sequences with CD HIT-EST to reduce sequence redundancy (Li et al.  
208 2006, Fu et al. 2012). Assembled metatranscriptome was submitted to the  
209 Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) repository from the NCBI. Thereafter, Kallisto  
210 (Bray et al. 2016) was used to quantify expression levels of each library and an  
211 abundance table was created. Additionally, data were grouped into two expression  
212 tables comprising effective counts (CPM) and transcripts per million (TPM). Statistics of  
213 the assembly were calculated with Python and R custom scripts (The scripts used in  
214 this study are found in  
215 [https://github.com/vhelizarraga/Effect\\_thermal\\_strees\\_on\\_Mcomplanata.git](https://github.com/vhelizarraga/Effect_thermal_strees_on_Mcomplanata.git)).  
216 Information on biological replicates used to achieve the claimed statistical power is  
217 displayed in Supplemental Table S4. The statistical power for this experimental design  
218 was calculated with RNASeqPower in R. A power > 0.66 was retrieved for a fold-change  
219 of 2 using a 10% probability of a Type 1 error occurring ( $\alpha = 0.1$ ). To explore the  
220 variation among unbleached and bleached samples, we carried out a Multidimensional  
221 Scaling analysis (MDS) to visualize differences between unbleached and bleached  
222 hydrocorals, using CPM data in R and the edgeR package (Robinson et al. 2010).  
223  
224 **Functional annotation, gene ontology terms assignment, and KEGG analysis**  
225 Sequences were annotated by sequence similarity using the Blastx software against the  
226 non-redundant NCBI protein database with an e-value threshold of  $1.0E-6$ . After  
227 functional annotation, Blastx (e-value threshold <  $1.0E-6$ ) hits were employed to perform  
228 the taxonomy analysis with MEGAN v. 6.19.8 ([https://uni-](https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-)  
229 [tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-](https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-)



230 fakultaet/fachbereiche/informatik/lehrstuehle/algorithms-in-  
231 bioinformatics/software/megan6/) (Huson et al. 2007). First, the distribution of  
232 sequences at Domain rank was determined. Then, Top-20 hit species distributions were  
233 retrieved. Transcripts belonging to cnidarian, symbiont, and microbiome were separated  
234 using Blastx hits as follows: cnidarian sequences were obtained from Metazoa cores;  
235 symbiont contigs were retrieved from Sar supergroup, and sequences from Bacteria,  
236 Archaea, and Virus ranks were assigned as microbiome elements. Statistics of  
237 separated sequences were obtained with Python and R scripts (  
238 [https://github.com/vhelizarraga/Effect\\_thermal\\_strees\\_on\\_Mcomplanata.git](https://github.com/vhelizarraga/Effect_thermal_strees_on_Mcomplanata.git)). Completeness  
239 analysis for split host, symbiont, and microbiome transcriptomes were assessed by  
240 comparing the transcripts with sets of the Benchmarking Universal Single-Copy ortholog  
241 (BUSCO) v. 4.1.2 corresponding to Eukaryota, Metazoa, and Bacteria ortholog sets  
242 from the OrthoDB v10 database (Simão et al. 2015). Finally, Blastx hits were employed  
243 to retrieve gene ontology terms using Blast2GO (Conesa et al. 2005) for the following  
244 sub-ontology groups: molecular function (MF), biological process (BP), and cellular  
245 component (CC). Significant gene number differences between bleached and  
246 unbleached samples were calculated with the Chi-square test. Finally, the pathways  
247 from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database were retrieved  
248 for UMc and BMc with Blast2GO (Conesa et al. 2005).

249

#### 250 **Differential gene expression analysis**

251 To detect the transcriptomic differences between bleached and unbleached *Millepora*  
252 *complanata* holobionts following the 2015-2016 "El Niño" Southern Oscillation in the

253 Mexican Caribbean, a pairwise differential expression analysis was carried out using  
254 edgeR (Robinson et al. 2010) for BMC. CPM values from the data sets were calculated  
255 and samples were filtered using a CPM value of 3 and thereafter, they were normalized  
256 using the TMM method (Robinson et al. 2010). Then, a likelihood ratio test (GLM) was  
257 employed and the number of differentially expressed genes (DEGs) was retrieved using  
258 a false discovery rate (FDR) < 0.05. An enrichment analysis, based on hypergeometric  
259 distribution followed by FDR correction, and a gene network analysis were carried out  
260 for DEGs from bleached samples to describe the relationship between enriched  
261 pathways detected for bleached samples, using ShinyGO v0.66 (Ge et al. 2020).

262

#### 263 **Validation of DEGs by semi-quantitative PCR**

264 Five DEGs were randomly selected for gene expression validation using semi-  
265 quantitative PCR. Primers for PCR amplifications targeting myosin heavy chain,  
266 superoxide dismutase, 10 kDa heat shock protein, zinc-metalloproteinase, and voltage-  
267 dependent L-type calcium channel subunit beta-2 were designed with Primer3Plus  
268 (Supplemental Table S2). PCR reactions were performed in 20  $\mu$ L (7.5  $\mu$ L of sterile  
269 water, 2  $\mu$ L of 10X Taq Buffer with KCl, 1.5  $\mu$ L MgCl 25 mM, 2  $\mu$ L of cDNA, 2.5  $\mu$ L of  
270 2.5 M forward and reverse primers, and 0.5 U/ $\mu$ L of Taq polymerase). Each  
271 amplification was carried out in a T100 Bio-rad thermocycler under the following  
272 conditions: a) 95 °C during 10 min; b) 35 cycles consisting of 95 °C during 30 s, 60 °C  
273 during 30 s, and 72 °C during 30 s; and c) 72 °C during 10 min. Amplification products  
274 were resolved in 4% agarose gels for 1 h at 75 V. Images from electrophoresis gels  
275 were obtained with a ChemidocMP (Bio-Rad, CA, USA) equipment and processed with  
276 the ImageLab software v6.0.1 (Bio-Rad, CA, USA). Briefly, intensity of the signals (n = 3

277 for each gene obtained from unbleached and bleached hydrocoral samples) were  
278 filtered, and analyzed using Quantity Tools. The normalized data, expressed as a  
279 function of pixel density (AU unities) were used to determine the statistical significance  
280 of relative expression between selected DEGs with a Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

281

## 282 **Results**

### 283 **Degree of bleaching and Symbiodiniaceae genotypes**

284 Fragments from unbleached (UMc) and bleached (BMc) *Millepora complanata*  
285 specimens were collected in the Mexican Caribbean after the 2015-2016 "El Niño" event  
286 in November 2016. The corresponding seawater temperature records, including  
287 maximum and minimum temperatures during November 2016 at the Parque Nacional  
288 Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico are displayed in Figure 1a;  
289 temperature values were compared with the average temperature of this region from  
290 2007 to 2015 (source: <http://seatemperature.info>). Representative *M. complanata*  
291 fragments (~5 cm length) are shown in Figure 1b. BMC specimens were almost  
292 colorless compared to UMc samples. The chlorophyll content in *M. complanata* tissues  
293 was measured to determine the degree of bleaching of hydrocoral colonies. As  
294 expected, BMC samples showed a significantly lower chlorophyll content ( $46.29 \pm 12.95$   
295  $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) than that of UMc samples ( $255.91 \pm 40.67 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) ( $p < 0.05$ , intermediate  
296 degrees of freedom = 6) (Figure 1c). The Symbiodiniaceae genotypes identified based  
297 on the rDNA markers (best hits) are presented in Table 1. UMc specimens showed the  
298 presence of four Symbiodiniaceae genera: *Symbiodinium* spp. (MH612580.1),  
299 *Breviolum* spp. (DQ200698.1), *Cladocopium* spp. (AF360576.1), and *Durusdinium* spp.

300 (JQ516983.1), while only *Symbiodinium* spp. (MH612580.1) and *Breviolum* spp.  
301 (DQ200698.1) were found in BMC. A phylogenetic tree showing agglomerative neighbor-  
302 joining (bottom-up) for *Symbiodinium* spp., *Breviolum* spp., *Cladocopium* spp., and  
303 *Durusdinium* spp. is shown in Supplemental Figure S1.

304

#### 305 **Single-copy orthologs from the metatranscriptome**

306 General analysis from *De novo* assembly of *M. complanata*'s base metatranscriptome  
307 containing both UMc and BMC transcripts resulted in 412 660 contigs. These sequences  
308 possessed an average size of 412 pb, a maximal assembled contig of 37 774 pb, and a  
309 GC content of 43.0%. The assembled holobiont metatranscriptome was deposited in  
310 GenBank under the accession GIXI00000000. From the metatranscriptome 169, 236  
311 sequences were annotated by sequence similarity using the non-redundant NCBI  
312 database. After sequence separation, summarized benchmarks in BUSCO notation for  
313 host, symbiont, and microbiome subsets were retrieved (Figure 2a). This analysis  
314 showed that 86.9% of the core genes were detected, including complete and partial  
315 BUSCOs, for the host database; 56.86% for the symbiont database; and 20.97% of  
316 BUSCOs corresponded to the microbial database.

317

#### 318 **Contribution of the transcripts in the holobiont**

319 Taking into account taxonomy-assigned contigs using MEGAN (Huson et al. 2007)  
320 (169, 236 sequences with an e-value < 1.0E<sup>-6</sup>), the assembled transcripts corresponded  
321 to Eukaryotic (84.9%), Bacteria (14.8%), Archaea (0.2%), and Virus (0.2%) sequences.  
322 Hit sequences were classified as follows: cnidarian sequences (37.8%), symbiont  
323 sequences (37.4%), and sequences from the microbiome (15.1%) (Figure 2b). In

324 addition, top-20 hit by species (based on the number of sequences matching species)  
325 showed that *M. complanata* metatranscriptome mainly contained putative homologs to  
326 *Symbiodinium microadriaticum* and *Hydra vulgaris* (Supplemental Figure S2). Summary  
327 statistics of sequences before and after splitting is shown in Table 2.  
328 Employing Blast2GO, gene ontology terms were assigned to cnidarian, symbiont, and  
329 microbiome subsets under unbleached and bleached conditions. Figure 3 displays the  
330 overrepresented terms across BP, CC, and MF sub-ontologies (left panel) and  
331 significant terms, based on gene numbers per subset under unbleached and bleached  
332 conditions (right panel). On the other hand, annotations were subjected to the KEGG  
333 pathway analysis for unbleached and bleached samples. The most represented  
334 metabolic pathways (based on the number of sequences per pathway) for UMc and  
335 BMC are shown in Supplemental Figure S3. We found that 147 KEGG pathways were  
336 retrieved from the *M. complanata* holobiont. Regarding bleached samples, pathways  
337 comprising the highest number of gene products included: thiamine metabolism  
338 (map00730), sucrose metabolism (map00500), and arginine and proline metabolism  
339 (map00330), among others.

340

#### 341 **Intra-specific variation during bleaching**

342 The arrangement of points derived from the MDS analysis indicated a better clustering  
343 for unbleached samples than that obtained for bleached specimens (Supplemental  
344 Figure S4). Genes whose expression was modified in bleached *M. complanata* were  
345 determined. Pairwise expression analysis ( $p < 0.05$ ) resulted in 299 significantly  
346 differentially expressed genes, from which 265 were up-regulated and 34 were down-

347 regulated in BMc (Figure 4a). Annotated DEGs are shown in Supplemental Table S3.  
348 Enrichment analysis based on hypergeometric distribution followed by FDR correction  
349 for DEGs showed overrepresented functional categories in bleached samples (p-value  
350 cutoff of 0.05), which included ribosome, RNA polymerase, chaperone, oxidoreductase,  
351 and basal transcription factors, among others. Gene networks explaining the  
352 relationship between enriched GO terms detected in BMc are presented in Figure 4b.  
353 Networks represent the hierarchical clustering summarizing the correlation between  
354 enriched pathways. The relative expression of five randomly selected DEGs (myosin  
355 heavy chain, superoxide dismutase, 10 kDa heat shock protein, zinc-metalloproteinase,  
356 and voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2) was validated using  
357 semi-quantitative PCR. The expression levels of all the DEGs subjected to validation  
358 were consistent with the pairwise expression analysis (Supplemental Figure S5).  
359

## 360 Discussion

### 361 Symbiont diversity

362 Although hydrocorals are considered the second most important reef builders (Lewis et  
363 al. 2006), they have been poorly studied. Particularly, the effect of climate change on  
364 *Millepora* species has not been comprehensively addressed. Here, we describe for the  
365 first time, differences observed at the transcriptomic level between unbleached and  
366 bleached *M. complanata* holobionts that were exposed to the 2015-2016 "El Niño"  
367 Southern Oscillation in the Mexican Caribbean, which caused an exceptional rise in the  
368 ocean temperature that resulted in massive episodes of coral bleaching worldwide  
369 (Romero-Torres et al. 2020). *M. complanata* has been recognized as a very sensitive

370 species to temperature stress, according to records of bleaching and mortality observed  
371 during 1987, 1993, 1995, 1998, 2003, and 2005 (McClanahan et al. 2009). In the  
372 present study, we demonstrated that bleached *M. complanata* specimens showed a  
373 significant reduction (calculated p value < 0.001, degrees of freedom = 6) in total  
374 chlorophyll content due to the loss of symbionts (Figure 1c). Interestingly, despite the  
375 high temperatures recorded in November 2016 (Figure 1a), some hydrocoral samples,  
376 collected simultaneously from colonies located at the same zone and depth in the  
377 Mexican Caribbean did not experience bleaching (Figure 1b), which indicates intra-  
378 species variation in *M. complanata* bleaching tolerance. A known mechanism of coral  
379 resistance is linked to the diversity and abundance of Symbiodiniaceae algae (Swain et  
380 al. 2018). It has been demonstrated in Anthozoa species that the presence of heat-  
381 tolerant Symbiodiniaceae genera (e.g. *Durusdinium* and *Cladocopium*) improves the  
382 resistance to coral bleaching (Qin et al. 2019, Chen et al. 2020, Poquita-Du et al. 2020).  
383 However, a high variation related to thermotolerance can be observed within strains of  
384 the same genera. Even though *M. complanata* has been recognized as a vulnerable  
385 species to thermal stress and bleaching, the susceptibility of Symbiodiniaceae species  
386 hosted by this hydrocoral has not been previously described. The occurrence of  
387 *Symbiodinium* spp. and *Breviolum* spp. was expected (samples Mc1, Mc2, Mc3, BMC3,  
388 and BMC5), since previous studies indicated that *M. complanata* from Mexico, Belize,  
389 Barbados, and Colombia harbors these Symbiodiniaceae genera. However,  
390 endosymbionts from the genera *Cladocopium* and *Durusdinium* had not been previously  
391 identified in *M. complanata* from the Caribbean Sea (LaJeunesse, 2002; Banaszak et al.  
392 2006, Finney et al. 2010, Grajales & Sanchez 2016). Former research has shown that

393 endosymbiont dominance strongly depends on the geographic location (LaJeunesse  
394 2002, Finney et al. 2010, Grajales & Sanchez 2016). For example, *Breviolum* spp. is a  
395 dominant endosymbiont in *M. complanata* and *M. alaicornis* living in coral reefs of The  
396 Bahamas, whereas *Symbiodinium* spp. endosymbionts are prevalent in hydrocorals  
397 found in the Belize Barrier Reef (Samayoa et al. 2017). Moreover, it has been  
398 demonstrated that depth influences the diversity in Symbiodiniaceae hosted by *M.*  
399 *complanata* (Finney et al. 2016). Evidently, Symbiodiniaceae diversity in hydrocorals  
400 depends on the reef habitat, as in the case of reef-forming cnidarians of the Anthozoa  
401 class. In the present study, the presence of *Durusdinium* spp. and *Cladocopium* spp. in  
402 unbleached *M. complanata* tissues could be associated to the greater resistance that  
403 these hydrocorals showed to bleaching, as it has been observed in Anthozoa corals  
404 (Pettay & Lajeunesse, 2009; Stat & Gates, 2011) nevertheless, this hypothesis needs to  
405 be proved.

406

#### 407 ***Millepora* holobiont composition**

408 Orthologous groups of BUSCO cores were detected for host, symbiont, and microbiome  
409 from the *M.complanata* holobiont. Contig-based taxonomic classification showed an  
410 approximate hydrocoral-symbiont-microbiome ratio of 2:2:1 (Figure 2b). These results  
411 suggest that *Millepora* holobionts mainly comprise cnidarians and Symbiodiniaceae  
412 components, while the microbiome represents a smaller fraction of the holobiont's  
413 population. A similar host/symbiont composition has been observed for scleractinian  
414 corals, such as *Porites australiensis* (Shinzato et al. 2014). There is growing evidence  
415 demonstrating the important contribution of the microbiome to the coral holobiont



416 survival and performance (Sogin et al. 2017, Osman et al. 2020). Here, we present the  
417 first report of the microbial contribution to the *M. complanata* holobiont, however,  
418 considering the low representation of bacteria sequences found in the present  
419 investigation, future RNA-seq research targeting procaryote RNA is needed in order to  
420 improve the characterization of the microbiome of the *Millepora* spp. holobiont.  
421 Gene Ontology terms retrieved from the split sequences of the different components of  
422 the holobiont under unbleached and bleached conditions showed differences across the  
423 BP, CC, and MF sub-ontologies. A subsequent KEGG pathway analysis for BMC  
424 evidenced that gene products from thiamine metabolism (map00730), sucrose  
425 metabolism (map00500), and arginine and proline metabolism (map00330) were the  
426 most prevalent pathways. These results represent the first snapshot of the metabolic  
427 processes occurring within the *M. complanata* holobiont during bleaching.  
428

429 **Transcriptomic differences between bleached and unbleached *M. complanata***  
430 **holobionts**

431 The DEGs analysis revealed significant (FDR < 0.05) changes in the expression of 299  
432 genes in BMC specimens, which had experienced bleaching during the 2015-2016 "El  
433 Niño" (Figure 4a). Enriched functional categories (p-value cutoff of 0.05) from DEGs  
434 included: ribosome, chaperone, oxidoreductase, helicase, RNA polymerase, among  
435 others (Figure 4b). Representative enriched categories for bleached samples and some  
436 of their corresponding DEGs are discussed below.  
437

438 **Translation and transcription**

439 The present study provides evidence that BMC samples showed significant  
440 transcriptomic changes associated to protein biosynthesis (Figure 4b). Ribosome was  
441 one of the enriched functional categories (p-value cutoff of 0.05) in BMC. The majority of  
442 differentially expressed genes related to protein biosynthesis (e.g. 40S ribosomal  
443 protein S20, 60S ribosomal protein L15, 40S ribosomal protein S14, among many  
444 others) were up-regulated, and only three of these genes exhibited a diminished  
445 expression (Elongation factor 1-alpha, Signal peptidase complex catalytic subunit  
446 SEC11C, and 60S acidic ribosomal protein P0). A reduced expression of protein  
447 biosynthesis genes has been observed in the anthozoans *Orbicella faveolata* and  
448 *Montastraea faveolata* as part of their immediate response to thermal stress (Voolstra et  
449 al. 2009, Pinzón et al. 2015). Whereas, some ribosomal structural components (e.g  
450 ribosomal protein L24) were up-regulated in *M. faveolata* (Rosic et al. 2011). On the  
451 other hand, several transcriptomic studies have proved that transcriptional regulation is  
452 directly affected during coral bleaching (DeSalvo et al. 2008, DeSalvo et al. 2010, Rosic  
453 et al. 2011, Souter et al. 2011) In fact, several transcriptional modules related to  
454 important cellular functions and activities (sequence-specific DNA binding, motor  
455 activity, and extracellular matrix structure) have been recognized as significantly  
456 correlated with bleaching (Thomas et al. 2017). Our results showed that RNA  
457 polymerase and basal transcription factors were enriched (p-value cutoff of 0.05) in  
458 bleached samples. Particularly, seven genes involved in transcriptional processes were  
459 up-regulated in the BMC specimens (general transcription factor IIF subunit 2, DNA-  
460 directed RNA polymerase II subunit RPB2, ATP-dependent RNA helicase DDX18,  
461 protein arginine N-methyltransferase 1, KAT8 regulatory NSL complex subunit 3,

462 putative transcription elongation factor B polypeptide 1, and circadian locomotor output  
463 cycles protein kaput-like isoform X2) and no genes were down-regulated. These results  
464 indicate that bleached *M. complanata* specimens did not show a low expression of  
465 genes related to transcription and translation processes, unlike what has been observed  
466 in corals of the Anthozoa class. This could imply a different response to thermal stress  
467 between reef-forming hydrozoans and organisms of the Anthozoa class.

468

#### 469 **Cellular Transport**

470 Seven cell transport-related genes were up-regulated in bleached *M. complanata*  
471 specimens: ATP-binding cassette sub-family A member 2, protein RER1, protein  
472 transport protein Sec61 subunit beta, charged multivesicular body protein 7, GTP-  
473 binding protein SAR1a, vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog, and  
474 Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2. This finding is in agreement  
475 with a previous study carried out in *Pocillopora damicornis* subjected to thermal stress,  
476 which showed an up-regulation of ion transporters, such as voltage-gated calcium  
477 channels (Crowder et al. 2017). It has been observed that Ca<sup>2+</sup>-channels participate in  
478 the calcification process of some scleractinian species. Particularly, voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-  
479 channels have been directly associated to transepithelial calcium transport and calcium  
480 carbonate formation (Zoccola et al. 1999). Earlier investigations provided evidence that  
481 blockade of voltage-gated Ca<sup>2+</sup>-channel Ca<sub>v</sub>1 significantly diminished calcification in  
482 *Stylophora pistillata* and *Galaxea fascicularis* (Marshall 1996, Tanbutté et al. 2015).  
483 Therefore, it is likely that up-regulation of genes associated with Ca<sup>2+</sup> transport and

484 signaling in BMC specimens is related to an optimization of cellular pathways involved in  
485 regulating calcium carbonate deposition.

486

487 **Antioxidant and thermal stress responses**

488 It has been widely demonstrated that antioxidant enzymes constitute the first line of  
489 defense of reef-forming anthozoans against thermal stress and UV radiation.  
490 Particularly, superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase play a key role  
491 in both, host and symbiont antioxidant response during bleaching (Lesser et al. 1990,  
492 Lesser, 1997, Downs et al. 2002, Lesser 2011, Hawkins et al. 2015, Krueger et al.  
493 2015, Oakley et al. 2018). These enzymes importantly contribute to the maintenance of  
494 cnidarian-Symbiodiniaceae homeostasis by neutralizing ROS to counteract oxidative  
495 damage (Szabó et al. 2020). Investigations conducted on *Acropora millepora* and  
496 *Montipora digitata* indicated that thermal stress induced an augmented expression of  
497 antioxidant enzymes (Souter et al. 2011, Krueger et al 2015). In this study,  
498 oxidoreductases (p-value cutoff of 0.05) were enriched and we observed an up-  
499 regulation of the antioxidant enzyme superoxide dismutase in *M. complanata*  
500 specimens that had experienced bleaching. This stress response is similar to that of  
501 Anthozoa species (Downs et al. 2002). In addition to augmented expression of  
502 antioxidant enzymes, an up-regulation of HSPs has been considered a ubiquitous  
503 molecular response of scleractinian corals to heat stress (Rosic et al. 2011). HSPs are  
504 responsible for maintaining critical cellular functions, including protein transport,  
505 degradation, aggregation, unfolding, and folding under stress conditions (Sørensen et  
506 al. 2003). Furthermore, these chaperone proteins play a crucial role in cellular

507 protection against damage caused by temperature stress (Black et al. 1995, Hayes &  
508 King 1995, Fang et al. 1997). In this study, we found that the expression of a 10 kDa-  
509 heat shock protein was up-regulated (p-value cutoff of 0.05) in BMC. Recently, Seveso  
510 et al. demonstrated that the coral species *Goniopora lobata*, *Porites lobata*, *Seriatopora*  
511 *hystrix*, and *Stylophora pistillata* showed a significant species-specific modulation of  
512 HSPs expression in response to bleaching (Seveso et al. 2020). Moreover, one HSP70  
513 (PdHSP70), whose expression was induced by high temperature, has been considered  
514 an essential element in the prevention of bleaching of the stony coral *Pocillopora*  
515 *damicornis* (Zhang et al. 2018). Up-regulation of genes related to both antioxidant and  
516 heat shock response in bleached *M. complanata* are indicative of the cellular responses  
517 of hydrocorals to defend themselves against the damage caused by thermal stress.  
518 Superoxide dismutase and 10 kDa-heat shock protein could represent important  
519 biochemical markers of heat stress in species of the genus *Millepora*.

520

#### 521 **Future of bleaching studies in *Millepora* species**

522 Although *Millepora* species are among the most severely affected reef-building  
523 organisms by anthropogenic environmental disturbances, up to now very little is known  
524 about the cellular mechanisms by which these organisms cope with the stress induced  
525 by increased ocean temperature and ultraviolet radiation. Our findings suggest that,  
526 even in the absence of Symbiodiniaceae algae, hydrocorals are capable of carrying out  
527 essential biochemical and molecular mechanisms, including ribosome, RNA polymerase  
528 and basal transcription factors, chaperone, oxidoreductase, transport, among others.

529 This is a pioneering study about the transcriptional response of hydrozoan species  
530 during heat bleaching, which will contribute to future researches aimed at gaining  
531 deeper insight into the overall cellular response mechanisms of reef forming hydrozoans  
532 and their adaptation and acclimatization strategies against disturbances such as climate  
533 change.

534

#### 535 **Acknowledgements**

536 V. H-E. acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for his  
537 graduate grant (CVU: 709502). The authors acknowledge the computer facilities  
538 provided by Databiology Ltd. This project was financed by the Autonomous University of  
539 Queretaro (Convocatoria "Química Somos Todos 2021) and by the National Council of  
540 Science and Technology of Mexico (CONACYT) through the grant 316849 from "Fondo  
541 de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04)".

542

#### 543 **Conflicts of Interest**

544 The authors declare neither conflict of interest nor competing financial interest.

545

#### 546 **REFERENCES**

- 547 Anderson DA, Walz ME, Weil E, Tonellato P, Smith MC (2016) RNA-Seq of the  
548 Caribbean reef-building coral *Orbicella faveolata* (Scleractinia-Merulinidae) under  
549 bleaching and disease stress expands models of coral innate immunity. PeerJ.  
550 4:e1616.
- 551 Banaszak AT, Santos MGB, LaJeunesse TC, Lesser MP (2006) The distribution of  
552 mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic

- 553 dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *J Exp Mar Biol*  
554 *Ecol.* 337:131–146.
- 555 Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, et al. (2012) SPAdes: a new  
556 genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J*  
557 *Comput Biol.* 19:455–477.
- 558 Black NA, Voellmy R, Szmant AM (2016) Heat shock protein induction in *Montastraea*  
559 *faveolata* and *Aiptasia pallida* exposed to elevated temperatures. *Biol Bull.*  
560 188:234–240.
- 561 Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq  
562 quantification. *Nat Biotechnol.* 34: 525.
- 563 Brown J, Pirrung M, McCue LA (2017) FQC Dashboard: integrates FastQC results into  
564 a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool.  
565 *Bioinformatics.* 33:3137–3139.
- 566 Chen B, Yu K, Qin Z, Liang J, Wang G, et al. (2020) Dispersal, genetic variation, and  
567 symbiont interaction network of heat-tolerant endosymbiont *Durussdinium trenchii*:  
568 Insights into the adaptive potential of coral to climate change. *Sci Total Environ.*  
569 723:138026.
- 570 Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a  
571 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics  
572 research. *Bioinformatics.* 21:3674–3676.
- 573 Correa AM, McDonald MD, Baker AC (2009) Development of clade-specific  
574 *Symbiodinium* primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to  
575 detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Mar Biol.* 156:2403–2411.

- 576 Crowder CM, Meyer E, Fan TY, Weis VM (2017) Impacts of temperature and lunar day  
577 on gene expression profiles during a monthly reproductive cycle in the brooding  
578 coral *Pocillopora damicornis*. *Mol Ecol.* 26:3913–3925.
- 579 Cziesielski MJ, Schmidt-Roach S, Aranda M (2019) The past, present, and future of  
580 coral heat stress studies. *Ecol Evol.* 9:10055–10066.
- 581 DeSalvo MK, Sunagawa S, Voolstra CR, Medina M (2010) Transcriptomic responses to  
582 heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology*  
583 *Progress Series.* 402:97-113.
- 584 DeSalvo MK, Voolstra CR, Sunagawa S, Schwarz JA, Stillman JH, et al. (2008)  
585 Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the  
586 Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Mol Ecol.* 17:3952–3971.
- 587 Dellacorte C (1994). Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis*  
588 *gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue Cell.* 26:613–619.
- 589 Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J, Woodley CM (2002) Oxidative  
590 stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic Biol Med.* 33:533–543.
- 591 Eakin CM, Sweatman HPA, Brainard RE (2019) The 2014–2017 global-scale coral  
592 bleaching event: insights and impacts. *Coral Reefs.* 38:539–545.
- 593 Fang L, Huang S, Lin K (1997) High temperature induces the synthesis of heat-shock  
594 proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*.  
595 *Coral Reefs.* 16, 127–131.
- 596 Finney JC, Pettay DT, Sampayo EM, Warner ME, Oxenford HA, LaJeunesse TC (2010)  
597 The relative significance of host–habitat, depth, and geography on the ecology,  
598 endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*.



- 599        Microb Ecol. 60:250–263.
- 600    Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-  
601        generation sequencing data. *Bioinformatics*. 28.23, 3150-3152.
- 602    Ge SX, Jung D, Yao R (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for  
603        animals and plants. *Bioinformatics*. 36:2628–2629.
- 604    González-Pech RA, Bhattacharya D, Ragan MA, Chan CX (2019) Genome Evolution of  
605        Coral Reef Symbionts as Intracellular Residents. *Trends Ecol Evol*. 34:799–806.
- 606    González-Pech RA, Vargas S, Francis WR, Wörheide G (2017) Transcriptomic  
607        resilience of the *Montipora digitata* holobiont to low pH. *Front Mar Sci*. 4: 403.
- 608    Grajales A & Sanchez JA (2016) Holobiont assemblages of dominant coral species  
609        (*Symbiodinium* types and coral species) shape Caribbean reef community  
610        structure. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Físicas Nat*. 40: 300.
- 611    Hawkins TD, Krueger T, Wilkinson SP, Fisher PL, Davy SK (2015) Antioxidant  
612        responses to heat and light stress differ with habitat in a common reef coral.  
613        *Coral Reefs*. 34:1229–1241.
- 614    Hayes RL, King CM (1995) Induction of 70-kD heat shock protein in scleractinian corals  
615        by elevated temperature: significance for coral bleaching. *Mol Mar Biol*  
616        *Biotechnol*. 4:36–42.
- 617    Hein MY, Birtles A, Willis BL, Gardiner N, Beeden R, Marshall NA (2019) Coral  
618        restoration: Socio-ecological perspectives of benefits and limitations. *Biol*  
619        *Conserv*. 229:14–25.
- 620    Hernández-Eliázrraga VH, Olguín-López N, Hernández-Matehuala R, Caballero-Pérez  
621        J, Ibarra-Alvarado C, et al. (2021) Comprehensive metatranscriptome analysis of

- 622 the reef-building holobiont *Millepora complanata*. *Front Mar Sci.* 8:149.
- 623 Hernández-Elizárraga VH, Olgún-López N, Hernández-Matehuala R, Ocharán-  
624 Mercado A, Cruz-Hernández A, et al. (2019) Comparative analysis of the soluble  
625 proteome and the cytolytic activity of unbleached and bleached *Millepora*  
626 *complanata* ("Fire Coral") from the Mexican Caribbean. *Mar Drugs.* 17, 393.
- 627 Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's  
628 coral reefs. *Mar Freshw Res.* 50:839–866.
- 629 Hughes TP, Kerry JT, Álvarez-Noriega M, Álvarez-Romero JG, Anderson KD, Baird AH,  
630 et al. (2017) Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature.*  
631 543:373–377.
- 632 Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data.  
633 *Genome Res.* 17:377–386.
- 634 Kaniewska P, Chan CKK, Kline D, Ling EYS, Rosic N, et al. (2015) Transcriptomic  
635 changes in coral holobionts provide insights into physiological challenges of  
636 future climate and ocean change. *PLoS One.* 10:e0139223.
- 637 Kenkel CD, Meyer E, Matz MV (2013) Gene expression under chronic heat stress in  
638 populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different thermal  
639 environments. *Mol Ecol.* 22, 4322–4334.
- 640 Krueger T, Hawkins TD, Becker S, Pontasch S, Dove S, et al. (2015) Differential coral  
641 bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in  
642 symbiotic partners under thermal stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr*  
643 *Physiol.* 190:15–25.
- 644 LaJeunesse T (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates

- 645 from Caribbean coral reefs. *Mar Biol.* 141:387–400.
- 646 Lesser MP (2001) Coral Bleaching: Causes and mechanisms. In: Dubinsky Z., Stambler  
647 N. (eds) *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer Netherlands,  
648 Dordrecht, pp 405–419.
- 649 Lesser MP (1997) Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated  
650 temperatures. *Coral Reefs.* 16:187–192.
- 651 Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and  
652 physiological ecology. *Annu Rev Physiol.* 68:253–278.
- 653 Lesser MP, Stochaj WR, Tapley DW, Shick JM (1990) Bleaching in coral reef  
654 anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the  
655 activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs.* 8:225–232.
- 656 Lewis JB (2006) Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs.  
657 *Advances in Marine Biology.* 50:1-55.
- 658 Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of  
659 protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 22:1658–1659.
- 660 Maor-Landaw K, Waldman Ben-Asher H, Karako-Lampert S, Salmon-Divon M, Prada F,  
661 Caroselli E, et al. (2017) Mediterranean versus Red sea corals facing climate  
662 change, a transcriptome analysis. *Sci Rep.* 7:42405.
- 663 Marshall AT (1996) Calcification in hermatypic and ahermatypic corals. *Science.*  
664 271:637–639.
- 665 Mayfield AB, Wang YB, Chen CS, Lin CY, Chen SH (2014) Compartment-specific  
666 transcriptomics in a reef-building coral exposed to elevated temperatures. *Mol*  
667 *Ecol.* 23:5816–5830.

- 668 McClanahan TR, Weil E, Cortés J, Baird AH, Ateweberhan M (2009) Consequences of  
669 coral bleaching for sessile reef organisms. *Coral bleaching*. Springer. 121–138.
- 670 Mieog JC, van Oppen MJH, Cantin NE, Stam WT, Olsen JL (2007) Real-time PCR  
671 reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four  
672 scleractinian corals across the Great Barrier Reef: implications for symbiont  
673 shuffling. *Coral Reefs*. 26:449–457.
- 674 Montero-Serra I, Garrabou J, Doak DF, Ledoux JB, Linares C (2019) Marine protected  
675 areas enhance structural complexity but do not buffer the consequences of  
676 ocean warming for an overexploited precious coral. *J Appl Ecol*. 56:1063–1074.
- 677 Moya A, Ganot P, Furla P, Sabourault C (2012) The transcriptomic response to thermal  
678 stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea  
679 anemone *Anemonia viridis*. *Mol Ecol*. 21:1158–1174.
- 680 Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A (2004) RNA integrity number (RIN)—standardization  
681 of RNA quality control. *Agil Appl Note Publ*. 1:1–8.
- 682 Oakley CA & Davy SK (2018) Cell Biology of Coral Bleaching. In *Coral bleaching*.  
683 Springer International Publishing, Cham, pp 189–211.
- 684 Olguín-López N, Hernández-Elizárraga VH, Hernández-Matehuala R, Cruz-Hernández  
685 A, Guevara-González R, et al. (2019) Impact of El Niño-Southern Oscillation  
686 2015-2016 on the soluble proteomic profile and cytolytic activity of *Millepora*  
687 *alcicornis* ("fire coral") from the Mexican Caribbean. *PeerJ*. 7:e6593.
- 688 Osman EO, Suggett DJ, Voolstra CR, Pettay DT, Clark DR, Pogoreutz C, Smith DJ  
689 (2020) Coral microbiome composition along the northern Red Sea suggests high  
690 plasticity of bacterial and specificity of endosymbiotic dinoflagellate communities.

- 691 Microbiome. 8(1):1-16.
- 692 Pettay DT, Lajeunesse TC (2009) Microsatellite loci for assessing genetic diversity,  
693 dispersal and clonality of coral symbionts in 'stress-tolerant 'clade D  
694 *Symbiodinium*. Mol Ecol Resour. 9:1022–1025.
- 695 Pinzón JH, Kamel B, Burge CA, Harvell CD, Medina M, et al. (2015) Whole  
696 transcriptome analysis reveals changes in expression of immune-related genes  
697 during and after bleaching in a reef-building coral. R Soc Open Sci. 2, 140214.
- 698 Poquita-Du RC, Huang D, Chou LM, Todd PA (2020) The contribution of stress-tolerant  
699 endosymbiotic dinoflagellate *Durusdinium* to *Pocillopora acuta* survival in a highly  
700 urbanized reef system. Coral Reefs. 39.3:45-755.
- 701 Qin Z, Yu K, Chen B, Wang Y, Liang J, et al. (2019) Diversity of Symbiodiniaceae in 15  
702 coral species from the southern South China Sea: potential relationship with  
703 coral thermal adaptability. Front Microbiol. 10:2343.
- 704 Richier S, Rodriguez-Lanetty M, Schnitzler CE, Weis VM (2008) Response of the  
705 symbiotic cnidarian *Anthopleura elegantissima* transcriptome to temperature and  
706 UV increase. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics. 3:283–289.
- 707 Rinkevich B (2019) The Active Reef Restoration Toolbox is a Vehicle for Coral  
708 Resilience and Adaptation in a Changing World. J Mar Sci Eng. 7:201.
- 709 Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for  
710 differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics.  
711 26:139–140.
- 712 Romero-Torres M, Acosta A, Palacio-Castro AM, Trembl EA, Zapata FA, et al. (2020)  
713 Coral reef resilience to thermal stress in the Eastern Tropical Pacific. Glob

- 714 Change Biol. 26.7, 3880-3890.
- 715 Rosic NN, Pernice M, Dove S, Dunn S, Hoegh-Guldberg O (2011). Gene expression  
716 profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic  
717 dinoflagellates in response to thermal stress: possible implications for coral  
718 bleaching. *Cell Stress Chaperones*. 16:69–80.
- 719 Samayoa A, Reyes S, Karim YB, Roge-Jones L, Rueth M, Tepper C (2017) Patterns of  
720 Millepore-*Symbiodinium* associations at two Caribbean locations: San Salvador,  
721 the Bahamas and south water Caye, Belize. In Proceedings of the First Joint  
722 Natural History and Geology Symposium.
- 723 Seneca FO, Palumbi SR (2015) The role of transcriptome resilience in resistance of  
724 corals to bleaching. *Mol Ecol*. 24:1467–1484.
- 725 Seveso D, Arrigoni R, Montano S, Maggioni D, Orlandi I, et al. (2020) Investigating the  
726 heat shock protein response involved in coral bleaching across scleractinian  
727 species in the central Red Sea. *Coral Reefs*. 39:85–98.
- 728 Shinzato C, Inoue M, Kusakabe M (2014) A snapshot of a coral "holobiont": a  
729 transcriptome assembly of the scleractinian coral, *Porites*, captures a wide  
730 variety of genes from both the host and symbiotic zooxanthellae. *PloS One*.  
731 9:e85182.
- 732 Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO:  
733 assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy  
734 orthologs. *Bioinformatics*. 31:3210–3212.
- 735 Sogin EM, Putnam HM, Nelson CE, Anderson P, Gates RD (2017) Correspondence of  
736 coral holobiont metabolome with symbiotic bacteria, archaea and *Symbiodinium*

- 737 communities. Environ Microbiol Rep. 9:310–315.
- 738 Souter P, Bay LK, Andreakis N, Cszaszar N, Seneca FO, Van Oppen MJH (2011) A  
739 multilocus, temperature stress-related gene expression profile assay in *Acropora*  
740 *millepora*, a dominant reef-building coral. Mol Ecol Resour. 11:328–334.
- 741 Stat M, Gates RD (2011) Clade D *Symbiodinium* in scleractinian corals: a “nugget” of  
742 hope, a selfish opportunist, an ominous sign, or all of the above? J Mar Biol  
743 2011.
- 744 Suggett D J & Smith DJ (2020) Coral bleaching patterns are the outcome of complex  
745 biological and environmental networking. Glob Change Biol. 26:68–79.
- 746 Swain TD, Westneat MW, Backman V, Marcelino LA (2018). Phylogenetic analysis of  
747 symbiont transmission mechanisms reveal evolutionary patterns in  
748 thermotolerance and host specificity that enhance bleaching resistance among  
749 vertically transmitted *Symbiodinium*. European Journal of Phycology. 53(4):443-  
750 459.
- 751 Szabó M, Larkum AW, Vass I (2020) A Review: The role of reactive oxygen species in  
752 mass coral bleaching. Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological  
753 Mechanisms. Springer, pp 459–488.
- 754 Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role  
755 of heat shock proteins. Ecol Lett. 6:1025–1037.
- 756 Tanbutté É, Allemand D, Mueller E, Jaubert J (1996) A compartmental approach to the  
757 mechanism of calcification in hermatypic corals. J Exp Biol. 199:1029–1041.
- 758 Thomas L & Palumbi SR (2017) The genomics of recovery from coral bleaching. Proc R  
759 Soc B Biol Sci. 284: 20171790.

- 760 Thomas L, López EH, Morikawa MK, Palumbi SR (2019) Transcriptomic resilience,  
761 symbiont shuffling, and vulnerability to recurrent bleaching in reef-building corals.  
762 Mol Ecol. 28:3371–3382.
- 763 Tierranegra-García N, Salinas-Soto P, Torres-Pacheco I, Ocampo-Velázquez RV, Rico-  
764 García E, et al. (2011) Effect of foliar salicylic acid and methyl jasmonate  
765 applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*).  
766 Phytoparasitica. 39:137–144.
- 767 Voolstra CR, Schnetzer J, Peshkin L, Randall CJ, Szman AM, et al. (2009) Effects of  
768 temperature on gene expression in embryos of the coral *Montastraea faveolata*.  
769 BMC Genomics. 10:627.
- 770 Zhang Y, Zhou Z, Wang L, Huang B (2018) Transcriptome, expression, and activity  
771 analyses reveal a vital heat shock protein 70 in the stress response of stony coral  
772 *Pocillopora damicornis*. Cell Stress Chaperones. 23:711–721.
- 773 Zoccola D, Tambutté E, Sénégas-Balas F, Michiels JF, Failla JP, et al. (1999) Cloning  
774 of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*.  
775 Gene. 227:157–167.

776

777 **Figure captions**

- 778 **Figure 1. Sample collection and quantification of total chlorophyll.** a) Seawater  
779 temperature records at Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo,  
780 Mexico during November 2016 (the average temperature was calculated from years  
781 2007-2015). b) Representative fragments of *M. complanata* specimens collected in the  
782 Mexican Caribbean. UMC: Unbleached *M. complanata*. BMC: Bleached *M. complanata*.



783 c) Quantification of total chlorophyll content from UMc and BM specimens (n = 8).

784

785 **Figure 2. Annotation of the sequences.** a) Summarized benchmarking in BUSCO  
786 notation for *M. complanata* subsets. b) *M. complanata* holobiont composition based on  
787 taxonomy-assigned contigs.

788

789 **Figure 3. Gene anthology terms for a) host, b) symbiont, and c) microbiome**  
790 **subsets.** Right panel: Gene Ontology terms across Biological Process (BP), Cellular  
791 Component (CC), and Molecular Function (MF) sub-ontologies under unbleached and  
792 bleached conditions. Left panel: GO terms with significant gene number differences  
793 ( $p < 0.05$ ).

794

795 **Figure 4. Differential gene expression analyses.** a) Volcano plot showing  
796 differentially expressed genes (DEGs) in bleached *M. complanata* determined with  
797 edgeR. b) Gene network displaying enriched Gene Ontology terms from DEGs in  
798 bleached *M. complanata*. Two pathways (nodes) are connected if they share 20% or  
799 more genes. Darker nodes are more significantly enriched gene sets. Bigger nodes  
800 represent larger gene sets. Thicker edges represent more overlapped genes.

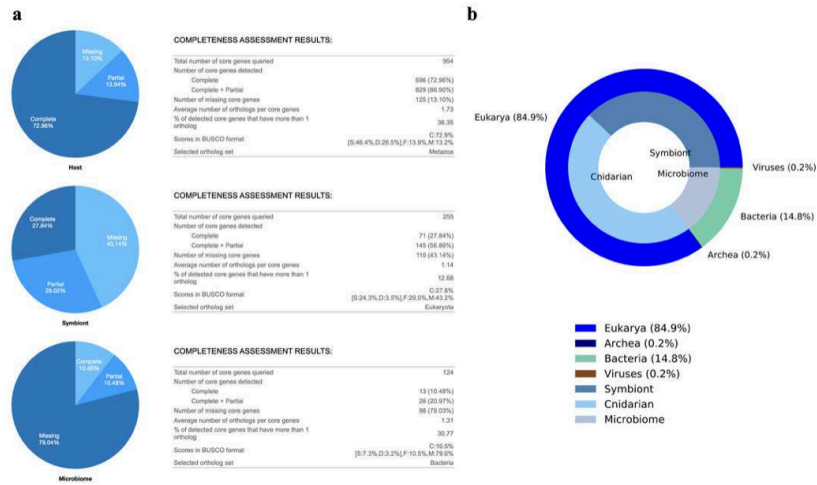
## Figure 1

Sample collection and quantification of total chlorophyll



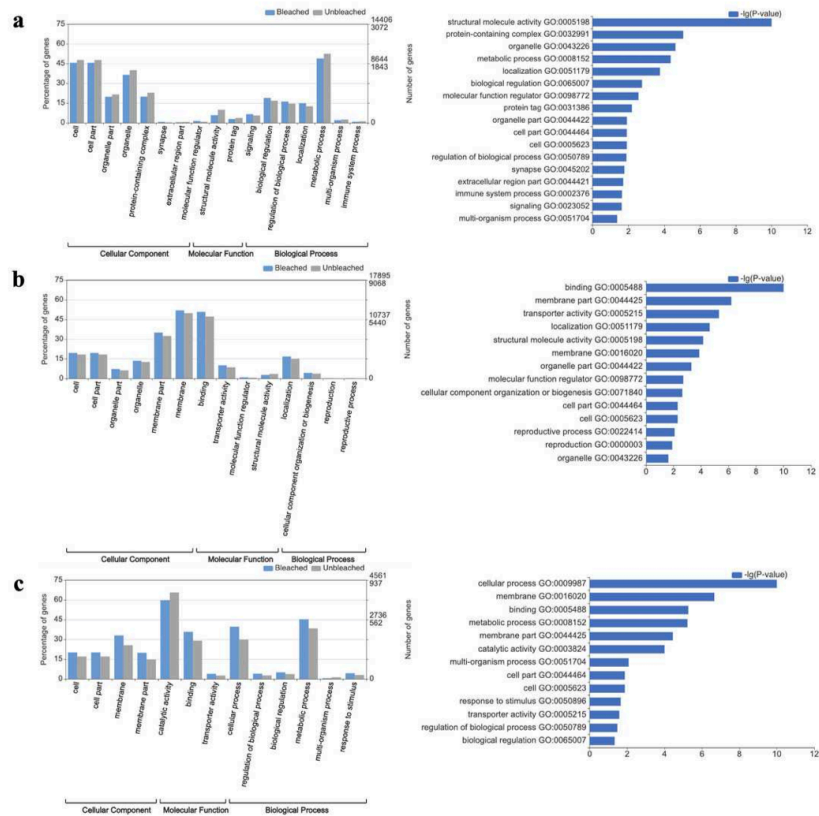
## Figure 2

Annotation of the sequences



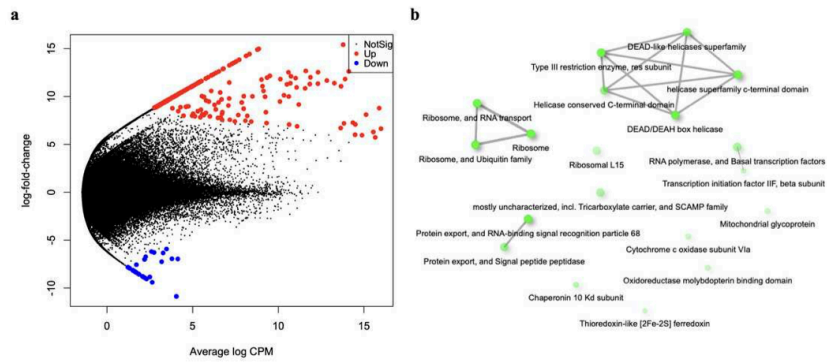
## Figure 3

Gene anthology terms for a) host, b) symbiont, and c) microbiome subsets



## Figure 4

Differential gene expression analyses



**Table 1** (on next page)

Symbiodiniaceae identification with Blastn

1 **Table 1. Symbiodiniaceae identification with Blastn.**

Hit description	Scientific name	Samples	Max Score	Query cover	E value	Per. Ident.	Hit accession
<i>Symbiodinium</i> sp. isolate CV94 internal transcribed spacer 1	<i>Symbiodinium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> clade A)	Mc1; Mc2; Mc3; BMc3	268	87%	1E-67	89.72 %	MH612580.1
s15b1 p 28S large subunit ribosomal RNA gene	<i>Breviolum</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> type B clone)	Mc1; Mc2; Mc3; BMc5;	187	98%	1E-43	97.30 %	DQ200698.1
<i>Symbiodinium</i> sp. clade_C 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1	<i>Cladocopium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> sp. clade C)	Mc1; Mc2; Mc3	45	51%	1E-17	89.47 %	AF360576.1
Uncultured clade D <i>Symbiodinium</i> sp. clone 0907_ZHM3_5	<i>Durisdinium</i> sp. (formerly <i>Symbiodinium</i> sp. clade D)	Mc1; Mc2; Mc3	78.7	59%	4E-11	97.78 %	JQ516983.1

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

**Table 2** (on next page)

Summary statistics of sequences before and after splitting



1 **Table 2. Summary statistics of sequences before and after splitting.**

<b>Holobiont sequences (Metaorganism)</b>	
Number of total paired-end reads	181,710,932
Number of filtered and assembled contigs	412,660
Maximum contig length	37,774 bp
Mean contig length	412.3 bp
Mean GC content	43.0%
Taxonomy-assigned counts	169,236
<b>Cnidarian sequences (<i>Millepora</i>)</b>	
Number of contigs	64,077
Maximum contig length	37,754 bp
Mean contig length	616.2 bp
Mean GC content	40.9%
<b>Symbiont sequences (Symbiodiniaceae)</b>	
Number of contigs	63,400
Maximum contig length	10,204 bp
Mean contig length	499.7 bp
Mean GC content	51.1%
<b>Microbiome sequences</b>	
Number of contigs	25,561
Maximum contig length	8,965 bp
Mean contig length	382.9 bp
Mean GC content	51.9%

2

## 12. REFERENCIAS

- Ainsworth, T. D., Hoegh-Guldberg, O., Heron, S. F., Skirving, W. J., & Leggat, W. (2008). Early cellular changes are indicators of pre-bleaching thermal stress in the coral host. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *364*(2), 63–71.
- Ainsworth, T. D., & Brown, B. E. (2021). Coral bleaching. *Current Biology*, *31*(1), R5–R6.
- Amreen Nisa, S., Vinu, D., Krupakar, P., Govindaraju, K., Sharma, D., & Vivek, R. (2021). Jellyfish venom proteins and their pharmacological potentials: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *176*, 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.074>
- Anderson, D. A., Walz, M. E., Weil, E., Tonellato, P., & Smith, M. C. (2016). RNA-Seq of the Caribbean reef-building coral *Orbicella faveolata* (Scleractinia-Merulinidae) under bleaching and disease stress expands models of coral innate immunity. *PeerJ*, *4*, e1616.
- Anthony, K. R. N., Kline, D. I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., & Hoegh-Guldberg, O. (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(45), 17442–17446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804478105>
- Avian, M., & Ramšak, A. (2021). Phylum Cnidaria: Classes Scyphozoa, Cubozoa, And Staurozoa. En *Invertebrate Zoology* (pp. 149–172). CRC Press.
- Baird, A. H., Bhagooli, R., Ralph, P. J., & Takahashi, S. (2009). Coral bleaching: The role of the host. *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(1), 16–20.
- Baker, A. C., Glynn, P. W., & Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *80*(4), 435–471.
- Balasubramanian, P. G., Beckmann, A., Warnken, U., Schnölzer, M., Schüler, A., Bornberg-Bauer, E., Holstein, T. W., & Özbek, S. (2012). Proteome of Hydra Nematocyst. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(13), 9672–9681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328203>

- Banaszak, A. T., Santos, M. G. B., LaJeunesse, T. C., & Lesser, M. P. (2006). The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337(2), 131–146.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., & Prjibelski, A. D. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455–477.
- Barott, K. L., Venn, A. A., Perez, S. O., Tambutté, S., & Tresguerres, M. (2015). Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2), 607–612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413483112>
- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., & Panconesi, E. (1988). Coral Ulcer as a Vasculitis. *International Journal of Dermatology*, 27(7), 506–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1988.tb00932.x>
- Black, N. A., Voellmy, R., & Szmant, A. M. (1995). Heat Shock Protein Induction in *Montastraea faveolata* and *Aiptasia pallida* Exposed to Elevated Temperatures. *The Biological Bulletin*, 188(3), 234–240. <https://doi.org/10.2307/1542301>
- Blackstone, N. W., & Cartwright, P. (2021). Phylum Cnidaria: Class Hydrozoa. In *Invertebrate Zoology* (pp. 193–204). CRC Press.
- Boja, E. S., Kinsinger, C. R., Rodriguez, H., & Srinivas, P. (2014). Integration of omics sciences to advance biology and medicine. *Clinical Proteomics*, 11(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-45>
- Bosmans, F., & Tytgat, J. (2007). Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 49(4), 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.029>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 34(5), 525.

- Brener-Raffalli, K., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Rey, O., Romans, P., Bonhomme, F., Pratlong, M., Haguenaer, A., Pillot, R., Feuillassier, L., Claereboudt, M., Magalon, H., Gélin, P., Pontarotti, P., Aurelle, D., Mitta, G., & Toulza, E. (2022). Gene expression plasticity and frontloading promote thermotolerance in *Pocillopora* corals. *Peer Community Journal*, 2. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.79>
- Brinkman, D., & Burnell, J. (2007). Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 50(6), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.016>
- Brinkman, D. L., Konstantakopoulos, N., McInerney, B. V., Mulvenna, J., Seymour, J. E., Isbister, G. K., & Hodgson, W. C. (2014). *Chironex fleckeri* (Box Jellyfish) Venom Proteins EXPANSION OF A CNIDARIAN TOXIN FAMILY THAT ELICITS VARIABLE CYTOLYTIC AND CARDIOVASCULAR EFFECTS. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 4798–4812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534149>
- Brown, J., Pirrung, M., & McCue, L. A. (2017). FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*, 33(19), 3137–3139.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Tyson, G. W., & Schenk, P. M. (2012). Application of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiological Methods*, 91(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.011>
- Castañeda, O., & Harvey, A. L. (2009). Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon*, 54(8), 1119–1124. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.032>
- Charif, D., & Lobry, J. R. (2007). SeqinR 1.0-2: A contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. En *Structural approaches to sequence evolution* (pp. 207–232). Springer.
- Chen, B., Yu, K., Qin, Z., Liang, J., Wang, G., Huang, X., Wu, Q., & Jiang, L. (2020). Dispersal, genetic variation, and symbiont interaction network of heat-tolerant

- endosymbiont *Durusdinium trenchii*: Insights into the adaptive potential of coral to climate change. *Science of the Total Environment*, 723, 138026.
- Chi, V., Pennington, M. W., Norton, R. S., Tarcha, E. J., Londono, L. M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S. K., Lakey, J. T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C., & Chandy, K. G. (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*, 59(4), 529–546. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.016>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Chung, J. J., Ratnapala, L. A., Cooke, I. M., & Yanagihara, A. A. (2001). Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon*, 39(7), 981–990. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00237-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00237-3)
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., & Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3), 426–427.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676.
- Correa, A. M., McDonald, M. D., & Baker, A. C. (2009). Development of clade-specific Symbiodinium primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Marine Biology*, 156(11), 2403–2411.
- Črnigoj Kristan, K., Viero, G., Dalla Serra, M., Maček, P., & Anderluh, G. (2009). Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon*, 54(8), 1125–1134. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.026>
- Crowder, C. M., Meyer, E., Fan, T.-Y., & Weis, V. M. (2017). Impacts of temperature and lunar day on gene expression profiles during a monthly reproductive cycle in the brooding coral *Pocillopora damicornis*. *Molecular ecology*, 26(15),

3913–3925.

- de Oliveira, J. S., Zaharenko, A. J., de Freitas, J. C., Konno, K., de Andrade, S. A., Portaro, F. C. V., Richardson, M., Sant'Anna, O. A., & Tambourgi, D. V. (2006). Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: Purification and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1760*(3), 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.018>
- Dellacorte, C. (1994). Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa). *Tissue & Cell*, *26*(4), 613–619.
- DeSalvo, M. K., Sunagawa, S., Voolstra, C. R., & Medina, M. (2010). Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*. <https://doi.org/10.3354/meps08372>
- DeSalvo, M. K., Voolstra, C. R., Sunagawa, S., Schwarz, J. A., Stillman, J. H., Coffroth, M. A., Szmant, A. M., & Medina, M. (2008). Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology*, *17*(17), 3952–3971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03879.x>
- Douglas, A. E. (2003). Coral bleaching—How and why? *Marine Pollution Bulletin*, *46*(4), 385–392.
- Downs, C. A., Fauth, J. E., Halas, J. C., Dustan, P., Bemiss, J., & Woodley, C. M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(4), 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00907-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3)
- Dube, A., Singh, N., Saxena, A., & Lakshmi, V. (2007). Antileishmanial potential of a marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick) against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, *101*(2), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0469-z>
- Eakin, C. M., Sweatman, H. P. A., & Brainard, R. E. (2019). The 2014–2017 global-scale coral bleaching event: Insights and impacts. *Coral Reefs*, *38*(4), 539–

545. <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01844-2>
- Fang, L., Huang, S., & Lin, K. (1997). High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. *Coral Reefs*, *16*(2), 127–131. <https://doi.org/10.1007/s003380050066>
- Finney, J. C., Pettay, D. T., Sampayo, E. M., Warner, M. E., Oxenford, H. A., & LaJeunesse, T. C. (2010). The Relative Significance of Host–Habitat, Depth, and Geography on the Ecology, Endemism, and Speciation of Coral Endosymbionts in the Genus *Symbiodinium*. *Microbial Ecology*, *60*(1), 250–263. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9681-y>
- Fitt, W. K. (2012). Bleaching of the fire corals *Millepora*. *Proceedings of 12th International Coral Reef Symposium, ICRS2012\_9A\_4*.
- Fitt, W. K., Brown, B. E., Warner, M. E., & Dunne, R. P. (2001). Coral bleaching: Interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs*, *20*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1007/s003380100146>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, *45*(8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>
- Fransolet, D., Roberty, S., & Plumier, J.-C. (2012). Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and *Symbiodinium*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *420*, 1–7.
- Frazão, B., Vasconcelos, V., & Antunes, A. (2012). Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine Drugs*, *10*(8), 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C., & Vega, R. C. R. de la. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*(1), 483–511. <https://doi.org/10.1146/>

annurev.genom.9.081307.164356

- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Bah, M., Ibarra-Alvarado, C., Gallegos-Corona, M. A., & García-Servín, M. (2015). Systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 169(Supplement C), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.12.004>
- García-Arredondo, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., & Iglesias-Prieto, R. (2011). Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 396(2), 171–176.
- Garrido, A. G., Machado, L. F., Zilberberg, C., & Leite, D. C. de A. (2021). Insights into ‘Symbiodiniaceae phycosphere’ in a coral holobiont. *Symbiosis*, 83(1), 25–39. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00735-3>
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gleason, D. F., & Wellington, G. M. (1993). Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature*, 365(6449), 836–838. <https://doi.org/10.1038/365836a0>
- Glynn, P. W., & D’Croz, L. (1990). Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El Niño-coincident coral mortality. *Coral Reefs*, 8(4), 181–191. <https://doi.org/10.1007/BF00265009>
- González-Pech, R. A., Vargas, S., Francis, W. R., & Wörheide, G. (2017). Transcriptomic resilience of the *Montipora digitata* holobiont to low pH. *Frontiers in Marine Science*, 4, 403.



- Grajales, A., & Sanchez, J. A. (2016). Holobiont assemblages of dominant coral species (Symbiodinium types and coral species) shape Caribbean reef community structure. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 300. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.294>
- Hawkins, T. D., Krueger, T., Wilkinson, S. P., Fisher, P. L., & Davy, S. K. (2015). Antioxidant responses to heat and light stress differ with habitat in a common reef coral. *Coral Reefs*, 34(4), 1229–1241.
- Hayes, R. L., & King, C. M. (1995). Induction of 70-kD heat shock protein in scleractinian corals by elevated temperature: Significance for coral bleaching. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(1), 36–42.
- Hernández-Elizárraga, V. H., Olgúin-López, N., Hernández-Matehuala, R., Ocharán-Mercado, A., Cruz-Hernández, A., Guevara-González, R. G., Caballero-Pérez, J., Ibarra-Alvarado, C., Sánchez-Rodríguez, J., & Rojas-Molina, A. (2019). Comparative Analysis of the Soluble Proteome and the Cytolytic Activity of Unbleached and Bleached *Millepora complanata* (“Fire Coral”) from the Mexican Caribbean. *Marine Drugs*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/md17070393>
- Hernández-Matehuala, R., Rojas-Molina, A., Vuelvas-Solórzano, A. A., Garcia-Arredondo, A., Alvarado, C. I., Olgúin-López, N., & Aguilar, M. (2015). Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora alcicornis* collected in the Mexican Caribbean and detection of two types of cytotoxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21, 36. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0035-6>
- Hill, R. A. (2011). Marine natural products. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B: Org. Chem.*, 107, 138–156.
- Hill, R., & Ralph, P. (2007). *Post-bleaching viability of expelled zooxanthellae from the scleractinian coral Pocillopora damicornis*. <https://opus.lib.uts.edu.au/research/handle/10453/3805>
- Hill, R., Szabó, M., ur Rehman, A., Vass, I., Ralph, P. J., & Larkum, A. W. D. (2014).

- Inhibition of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in the coral *Pocillopora damicornis* and its relationship to thermal bleaching. *The Journal of Experimental Biology*, 217(Pt 12), 2150–2162. <https://doi.org/10.1242/jeb.100578>
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and freshwater research*, 50(8), 839–866.
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., Babcock, R. C., Beger, M., Bellwood, D. R., Berkelmans, R., Bridge, T. C., Butler, I. R., Byrne, M., Cantin, N. E., Comeau, S., Connolly, S. R., Cumming, G. S., Dalton, S. J., Diaz-Pulido, G., ... Wilson, S. K. (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature*, 543(7645), 373–377. <https://doi.org/10.1038/nature21707>
- Hume, B., D'Angelo, C., Burt, J., Baker, A. C., Riegl, B., & Wiedenmann, J. (2013). Corals from the Persian/Arabian Gulf as models for thermotolerant reef-builders: Prevalence of clade C3 Symbiodinium, host fluorescence and ex situ temperature tolerance. *Marine pollution bulletin*, 72(2), 313–322.
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., & Tappu, R. (2016). MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS computational biology*, 12(6), e1004957.
- Ibarra-Alvarado, C., García, J. A., Aguilar, M. B., Rojas, A., Falcón, A., & de la Cotera, E. P. H. (2007). Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 511–518.
- Iguchi, A., Iwanaga, S., & Nagai, H. (2008). Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochemical and biophysical research communications*, 365(1), 107–112.
- Jaimes-Becerra, A., Chung, R., Morandini, A. C., Weston, A. J., Padilla, G., Gacesa, R., Ward, M., Long, P. F., & Marques, A. C. (2017). Comparative proteomics reveals recruitment patterns of some protein families in the venoms of

- Cnidaria. *Toxicon*, 137(Supplement C), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.012>
- Jobes, D. V., Hurley, D. L., & Thien, L. B. (1995). Plant DNA isolation: A method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *TAXON*, 44(3), 379–386. <https://doi.org/10.2307/1223408>
- Jokiel, P. L., & Coles, S. L. (1990). Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral reefs*, 8(4), 155–162.
- Jouiaei, M., Yanagihara, A. A., Madio, B., Nevalainen, T. J., Alewood, P. F., & Fry, B. G. (2015). Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*, 7(6), 2251–2271. <https://doi.org/10.3390/toxins7062251>
- Joyce, A. R., & Palsson, B. Ø. (2006). The model organism as a system: Integrating “omics” data sets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3), 198–210. <https://doi.org/10.1038/nrm1857>
- Kaniewska, P., Chan, C.-K. K., Kline, D., Ling, E. Y. S., Rosic, N., Edwards, D., Hoegh-Guldberg, O., & Dove, S. (2015). Transcriptomic changes in coral holobionts provide insights into physiological challenges of future climate and ocean change. *PLoS One*, 10(10), e0139223.
- Kenkel, C. D., Meyer, E., & Matz, M. V. (2013). Gene expression under chronic heat stress in populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different thermal environments. *Molecular ecology*, 22(16), 4322–4334.
- Kitchen, S. A., Crowder, C. M., Poole, A. Z., Weis, V. M., & Meyer, E. (2015). De novo assembly and characterization of four anthozoan (phylum Cnidaria) transcriptomes. *G3: Genes, genomes, genetics*, 5(11), 2441–2452.
- Klumpen, A. M. L., Macrander, J., Reitzel, A. M., & Stampar, S. N. (2020). Transcriptomic Analysis of Four Cerianthid (Cnidaria, Ceriantharia) Venoms. *Marine Drugs*, 18(8), 413. <https://doi.org/10.3390/md18080413>
- Knowlton, N., Brainard, R. E., Fisher, R., Moews, M., Plaisance, L., & Caley, M. J. (2010). Coral reef biodiversity. *Life in the world's oceans: diversity distribution and abundance*, 65–74.
- Krueger, T., Hawkins, T. D., Becker, S., Pontasch, S., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O.,

- Leggat, W., Fisher, P. L., & Davy, S. K. (2015). Differential coral bleaching—Contrasting the activity and response of enzymatic antioxidants in symbiotic partners under thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *190*, 15–25.
- LaJeunesse, T. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, *141*(2), 387–400. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0829-2>
- Langebrake, C., Guenther, K., Lauber, J., & Reinhardt, D. (2006). Preanalytical mRNA Stabilization of Whole Bone Marrow Samples. *Blood*, *108*(11), 4407–4407. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.4407.4407>
- Lee, H., Jung, E., Kang, C., Yoon, W. D., Kim, J.-S., & Kim, E. (2011). Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon*, *58*(3), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.06.007>
- Lesser, M. P. (1997). Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral reefs*, *16*(3), 187–192.
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, *68*, 253–278.
- Lesser, M. P. (2011). Coral Bleaching: Causes and Mechanisms. En Z. Dubinsky & N. Stambler (Eds.), *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition* (pp. 405–419). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4\\_23](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_23)
- Lesser, M. P., Stochaj, W. R., Tapley, D. W., & Shick, J. M. (1990). Bleaching in coral reef anthozoans: Effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs*, *8*(4), 225–232.
- Lewis, J. B. (2006). Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Advances in marine biology*, *50*, 1–55.
- Li, J., Long, L., Zou, Y., & Zhang, S. (2021). Microbial community and transcriptional responses to increased temperatures in coral *Pocillopora damicornis* holobiont. *Environmental Microbiology*, *23*(2), 826–843. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15168>

- Li, R., Yu, H., Xue, W., Yue, Y., Liu, S., Xing, R., & Li, P. (2014). Jellyfish venomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomics*, *106*, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.011>
- Li, T., Ding, T., & Li, J. (2017). Medicinal Purposes: Bioactive Metabolites from Marine-derived Organisms. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170927113143>
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *22*(13), 1658–1659.
- Lilley, R. McC., Ralph, P. J., & Larkum, A. W. D. (2010). The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga *Symbiodinium* sp. By manganese chemiluminescence and its response to short-term thermal stress of the alga. *Plant, Cell & Environment*, *33*(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02121.x>
- Liu, G., Eakin, C. M., Chen, M., Kumar, A., De La Cour, J. L., Heron, S. F., Geiger, E. F., Skirving, W. J., Tirak, K. V., & Strong, A. E. (2018). Predicting Heat Stress to Inform Reef Management: NOAA Coral Reef Watch's 4-Month Coral Bleaching Outlook. *Frontiers in Marine Science*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00057>
- Liu, G., Zhou, Y., Liu, D., Wang, Q., Ruan, Z., He, Q., & Zhang, L. (2015). Global Transcriptome Analysis of the Tentacle of the Jellyfish *Cyanea capillata* Using Deep Sequencing and Expressed Sequence Tags: Insight into the Toxin- and Degenerative Disease-Related Transcripts. *PLOS ONE*, *10*(11), e0142680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142680>
- Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovцова, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., & Ferrari, R. (2018). Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(2), 286–302. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw114>
- Maor-Landaw, K., & Levy, O. (2016). Gene expression profiles during short-term heat stress; branching vs. Massive Scleractinian corals of the Red Sea.

*PeerJ*, 4, e1814.

- Maor-Landaw, K., Waldman Ben-Asher, H., Karako-Lampert, S., Salmon-Divon, M., Prada, F., Caroselli, E., Goffredo, S., Falini, G., Dubinsky, Z., & Levy, O. (2017). Mediterranean versus Red sea corals facing climate change, a transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 7, 42405. <https://doi.org/10.1038/srep42405>
- Marshall, A. T. (1996). Calcification in hermatypic and ahermatypic corals. *Science*, 271(5249), 637–639.
- Mayfield, A. B., Chen, Y.-J., Lu, C.-Y., & Chen, C.-S. (2018). Exploring the environmental physiology of the Indo-Pacific Reef Coral *Seriatopora hystrix* with differential proteomics. *Open Journal of Marine Science*, 8(2), 223–252.
- Mayfield, A. B., Wang, Y.-B., Chen, C.-S., Lin, C.-Y., & Chen, S.-H. (2014). Compartment-specific transcriptomics in a reef-building coral exposed to elevated temperatures. *Molecular Ecology*, 23(23), 5816–5830.
- McClanahan, T. R., Weil, E., Cortés, J., Baird, A. H., & Ateweberhan, M. (2009). Consequences of coral bleaching for sessile reef organisms. En *Coral bleaching* (pp. 121–138). Springer.
- McCowan, D. M., PRATCHETT, M. S., PALEY, A. S., Seeley, M., & BAIRD, A. H. (2011). A comparison of two methods of obtaining densities of zooxanthellae in *Acropora millepora*. *Galaxea, Journal of Coral Reef Studies*, 13(1), 29–34.
- Middlebrook, R. E., Wittle, L. W., Scura, E. D., & Lane, C. E. (1971). Isolation and purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon*, 9(4), 333–336. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(71\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(71)90130-9)
- Mieog, J. C., van Oppen, M. J. H., Cantin, N. E., Stam, W. T., & Olsen, J. L. (2007). Real-time PCR reveals a high incidence of Symbiodinium clade D at low levels in four scleractinian corals across the Great Barrier Reef: Implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs*, 26(3), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0244-8>
- Moya, A., Ganot, P., Furla, P., & Sabourault, C. (2012). The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet

- radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Molecular Ecology*, 21(5), 1158–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x>
- Moya, A., Tambutté, S., Tambutté, E., Zoccola, D., Caminiti, N., & Allemand, D. (2006). Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: Implications for 'light-enhanced calcification'. *Journal of Experimental Biology*, 209(17), 3413–3419. <https://doi.org/10.1242/jeb.02382>
- Muller-Parker, G., D'Elia, C. F., & Cook, C. B. (2015). Interactions Between Corals and Their Symbiotic Algae. En C. Birkeland (Ed.), *Coral Reefs in the Anthropocene* (pp. 99–116). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5_5)
- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., & Nakajima, T. (2002). Novel proteinaceous toxins from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* Kwietniewski. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(4), 760–763. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00547-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00547-8)
- Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Ito, E., Miyake, M., Noda, M., & Nakajima, T. (2000). Novel Proteinaceous Toxins from the Box Jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea rastonii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(2), 582–588. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3353>
- Neal, B. P., Khen, A., Treibitz, T., Beijbom, O., O'Connor, G., Coffroth, M. A., Knowlton, N., Kriegman, D., Mitchell, B. G., & Kline, D. I. (2017). Caribbean massive corals not recovering from repeated thermal stress events during 2005–2013. *Ecology and Evolution*, 7(5), 1339–1353. <https://doi.org/10.1002/ece3.2706>
- Nevalainen, T. J., Peuravuori, H. J., Quinn, R. J., Llewellyn, L. E., Benzie, J. A., Fenner, P. J., & Winkel, K. D. (2004). Phospholipase A2 in cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(4), 731–735.
- Norton, R. S., Pennington, M. W., & Wulff, H. (2004). Potassium Channel Blockade by the Sea Anemone Toxin ShK for the Treatment of Multiple Sclerosis and

- Other Autoimmune Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 11(23), 3041–3052. <https://doi.org/10.2174/0929867043363947>
- Oakley, C. A., & Davy, S. K. (2018). Cell Biology of Coral Bleaching. En M. J. H. van Oppen & J. M. Lough (Eds.), *Coral Bleaching: Patterns, Processes, Causes and Consequences* (pp. 189–211). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75393-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75393-5_8)
- Obura, D. O. (2009). Reef corals bleach to resist stress. *Marine Pollution Bulletin*, 58(2), 206–212.
- O'Hara, E. P., Wilson, D., & Seymour, J. E. (2021). The influence of ecological factors on cnidarian venoms. *Toxicon: X*, 9–10, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100067>
- Onyango, C. A., Glassom, D., & MacDonald, A. (2021). De novo assembly of the transcriptome of scleractinian coral, *Anomastrea irregularis* and analyses of its response to thermal stress. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2083–2092. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06184-5>
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., & Nagai, H. (2004). A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Actinaria villosa*. *Toxicon*, 43(2), 225–228. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.017>
- 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.
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(1), 91–142. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>
- Petrou, K., Nunn, B. L., Padula, M. P., Miller, D. J., & Nielsen, D. A. (2021). Broad scale proteomic analysis of heat-destabilised symbiosis in the hard coral *Acropora millepora*. *Scientific Reports*, 11(1), 19061. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98548-x>



- Pettay, D. T., & Lajeunesse, T. C. (2009). Microsatellite loci for assessing genetic diversity, dispersal and clonality of coral symbionts in 'stress-tolerant' clade D Symbiodinium. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 1022–1025.
- Pinzón, J. H., Kamel, B., Burge, C. A., Harvell, C. D., Medina, M., Weil, E., & Mydlarz, L. D. (2015). Whole transcriptome analysis reveals changes in expression of immune-related genes during and after bleaching in a reef-building coral. *Royal Society open science*, 2(4), 140214.
- Poquita-Du, R. C., Huang, D., Chou, L. M., & Todd, P. A. (2020). The contribution of stress-tolerant endosymbiotic dinoflagellate *Durusdinium* to *Pocillopora acuta* survival in a highly urbanized reef system. *Coral Reefs*, 1–11.
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Qin, Z., Yu, K., Chen, B., Wang, Y., Liang, J., Luo, W., Xu, L., & Huang, X. (2019). Diversity of Symbiodiniaceae in 15 coral species from the southern South China Sea: Potential relationship with coral thermal adaptability. *Frontiers in microbiology*, 10, 2343.
- Radwan, F. F., & Aboul-Dahab, H. M. (2004). Milleporin-1, a new phospholipase A 2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 267–272.
- Raina, J. B., Lutz, A., Motti, C. A., Miller, D. J., & van Oppen, M. J. H. (2015). *Host Coenzyme Q Redox State Is an Early Biomarker of Thermal Stress in the Coral Acropora millepora*.
- Rädecker, N., Pogoreutz, C., Gegner, H. M., Cárdenas, A., Roth, F., Bougoure, J., Guagliardo, P., Wild, C., Pernice, M., Raina, J.-B., Meibom, A., & Voolstra, C. R. (2021). Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(5), e2022653118.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2022653118>

- Ricaurte, M., Schizas, N. V., Ciborowski, P., & Boukli, N. M. (2016). Proteomic analysis of bleached and unbleached *Acropora palmata*, a threatened coral species of the Caribbean. *Marine pollution bulletin*, *107*(1), 224–232.
- Richier, S., Rodriguez-Lanetty, M., Schnitzler, C. E., & Weis, V. M. (2008). Response of the symbiotic cnidarian *Anthopleura elegantissima* transcriptome to temperature and UV increase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, *3*(4), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cbcd.2008.08.001>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J. I., Feregrino, A., & Heimer-de la Coteria, E. P. (2002). Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*, *40*(6), 777–785.
- Rojas-Molina, A., García-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., & Bah, M. (2012). *Millepora* (“fire corals”) species: Toxinological studies until 2011. *Advances in environmental research*, *26*, 133–148.
- Romero, L., Marcussi, S., Marchi-Salvador, D. P., Silva Jr., F. P., Fuly, A. L., Stábeli, R. G., da Silva, S. L., González, J., Monte, A. del, & Soares, A. M. (2010). Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*, *92*(8), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.007>
- Romero-Torres, M., Acosta, A., Palacio-Castro, A. M., Treml, E. A., Zapata, F. A., Paz-García, D. A., & Porter, J. W. (2020). Coral reef resilience to thermal stress in the Eastern Tropical Pacific. *Global change biology*.
- Rosado, C. J., Kondos, S., Bull, T. E., Kuiper, M. J., Law, R. H. P., Buckle, A. M., Voskoboinik, I., Bird, P. I., Trapani, J. A., Whisstock, J. C., & Dunstone, M. A. (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, *10*(9), 1765–1774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01191.x>

- Rosic, N. N., Pernice, M., Dove, S., Dunn, S., & Hoegh-Guldberg, O. (2011). Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: Possible implications for coral bleaching. *Cell Stress & Chaperones*, *16*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0222-x>
- Roth, M. S. (2014). The engine of the reef: Photobiology of the coral–algal symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00422>
- Sagi, A., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., & Hauben, D. J. (1987). ‘The fire coral’(*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: A case report. *Burns*, *13*(4), 325–326.
- Samayoa, A., Reyes, S., Karim, Y. B., Roge-Jones, L., Rueth, M., & Tepper, C. (2017). Patterns of Millepore-Symbiodinium associations at two Caribbean locations: San Salvador, The Bahamas and South Water Caye, Belize. *Proceedings of the First Joint Natural History and Geology Symposium*.
- 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>
- Selegim, M. H. R., Lira, S. P., Kossuga, M. H., Batista, T., Berlinck, R. G. S., Hajdu, E., Muricy, G., Rocha, R. M. da, Nascimento, G. G. F. do, Silva, M., Pimenta, E. F., Thiemann, O. H., Oliva, G., Cavalcanti, B. C., Pessoa, C., Moraes, M. O. de, Galetti, F. C. S., Silva, C. L., Souza, A. O. de, & Peixinho, S. (2007). Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *17*(3), 287–318. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300002>
- Seneca, F. O., & Palumbi, S. R. (2015). The role of transcriptome resilience in resistance of corals to bleaching. *Molecular Ecology*, *24*(7), 1467–1484. <https://doi.org/10.1111/mec.13125>

- Seveso, D., Arrigoni, R., Montano, S., Maggioni, D., Orlandi, I., Berumen, M. L., Galli, P., & Vai, M. (2020). Investigating the heat shock protein response involved in coral bleaching across scleractinian species in the central Red Sea. *Coral Reefs*, *39*(1), 85–98.
- Sher, D., Fishman, Y., Melamed-Book, N., Zhang, M., & Zlotkin, E. (2008). Osmotically driven prey disintegration in the gastrovascular cavity of the green hydra by a pore-forming protein. *The FASEB Journal*, *22*(1), 207–214. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9133com>
- Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebediker, M., Gaathon, A., Mancheño, J.-M., & Zlotkin, E. (2005). Hydralysins, a New Category of  $\beta$ -Pore-forming Toxins in Cnidaria. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 22847–22855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503242200>
- Shinzato, C., Inoue, M., & Kusakabe, M. (2014). A snapshot of a coral “holobiont”: A transcriptome assembly of the scleractinian coral, *Porites*, captures a wide variety of genes from both the host and symbiotic zooxanthellae. *PloS one*, *9*(1), e85182.
- Shiomi, K., Hosaka, M., Yanaike, N., Yamanaka, H., & Kikuchi, T. (1989). Partial Characterization of Venoms from Two Species of Fire Corals *Millepora platyphylla* and *Millepora dichotoma*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, *55*(2), 357–362. <https://doi.org/10.2331/suisan.55.357>
- Shontz, E. C., Souders, C. L., Schmidt, J. T., & Martyniuk, C. J. (2018). Domperidone upregulates dopamine receptor expression and stimulates locomotor activity in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Genes, Brain and Behavior*, *17*(4), e12460. <https://doi.org/10.1111/gbb.12460>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. En *Multiple sequence alignment methods* (pp. 105–116). Springer.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, *31*(19), 3210–3212.

- Sloan, R., & Sawyer, S. (2016). The role of cellular signaling during bleaching in the sea anemone, *Aiptasia pallida*. *Proceedings of the West Virginia Academy of Science*, 88(1). <http://pwvas.org/index.php/pwvas/article/view/23>
- Sogin, E. M., Putnam, H. M., Nelson, C. E., Anderson, P., & Gates, R. D. (2017). Correspondence of coral holobiont metabolome with symbiotic bacteria, archaea and Symbiodinium communities. *Environmental Microbiology Reports*, 9(3), 310–315. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12541>
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology letters*, 6(11), 1025–1037.
- Souter, P., Bay, L. K., Andreakis, N., Csaszar, N., Seneca, F. O., & Van Oppen, M. J. H. (2011). A multilocus, temperature stress-related gene expression profile assay in *Acropora millepora*, a dominant reef-building coral. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 328–334.
- Stat, M., & Gates, R. D. (2011). Clade D Symbiodinium in scleractinian corals: A “nugget” of hope, a selfish opportunist, an ominous sign, or all of the above? *Journal of Marine Biology*, 2011.
- Steele, R. E., David, C. N., & Technau, U. (2011). A genomic view of 500 million years of cnidarian evolution. *Trends in Genetics*, 27(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.10.002>
- Studivan, M. S., Shatters, A., Dodge, D. L., Beal, J. L., & Voss, J. D. (2021). Synergistic Effects of Thermal Stress and Estuarine Discharge on Transcriptomic Variation of *Montastraea cavernosa* Corals in Southeast Florida. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2021.662220>
- Šuput, D. (2009). In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon*, 54(8), 1190–1200. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.001>
- Swain, T. D., Westneat, M. W., Backman, V., & Marcelino, L. A. (2018). Phylogenetic analysis of symbiont transmission mechanisms reveal evolutionary patterns in thermotolerance and host specificity that enhance bleaching resistance among vertically transmitted Symbiodinium. *European Journal of Phycology*,

53(4), 443–459.

- Szabó, M., Larkum, A. W., & Vass, I. (2020). A Review: The Role of Reactive Oxygen Species in Mass Coral Bleaching. En *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms* (pp. 459–488). Springer.
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science*, 13(4), 178–182.
- Tanbutté, É., Allemand, D., Mueller, E., & Jaubert, J. (1996). A compartmental approach to the mechanism of calcification in hermatypic corals. *Journal of Experimental Biology*, 199(5), 1029–1041.
- Tchernov, D., Kvitt, H., Haramaty, L., Bibby, T. S., Gorbunov, M. Y., Rosenfeld, H., & Falkowski, P. G. (2011). Apoptosis and the selective survival of host animals following thermal bleaching in zooxanthellate corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(24), 9905–9909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106924108>
- Therneau, T., Hart, S., & Kocher, J. P. (2020). Calculating sample size estimates for RNA Seq studies. *R package version*, 1(0).
- Thomas, L., López, E. H., Morikawa, M. K., & Palumbi, S. R. (2019). Transcriptomic resilience, symbiont shuffling, and vulnerability to recurrent bleaching in reef-building corals. *Molecular ecology*.
- Thomas, L., & Palumbi, S. R. (2017). The genomics of recovery from coral bleaching. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1865), 20171790.
- Tierranegra-García, N., Salinas-Soto, P., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R. V., Rico-García, E., Mendoza-Díaz, S. O., Feregrino-Pérez, A. A., Mercado-Luna, A., Vargas-Hernandez, M., & Soto-Zarazúa, G. M. (2011). Effect of foliar salicylic acid and methyl jasmonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*). *Phytoparasitica*, 39(2), 137–144.
- Tolleter, D., Seneca, F. O., DeNofrio, J. C., Krediet, C. J., Palumbi, S. R., Pringle, J. R., & Grossman, A. R. (2013). Coral Bleaching Independent of Photosynthetic Activity. *Current Biology*, 23(18), 1782–1786. <https://doi.org/>

10.1016/j.cub.2013.07.041

- Tomanek, L. (2011). Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. *Annual Review of Marine Science*, 3(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142729>
- Tran, C. (2022). Coral–microbe interactions: Their importance to reef function and survival. *Emerging Topics in Life Sciences*, 6(1), 33–44. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210229>
- Turk, T., & Kem, W. R. (2009). The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*, 54(8), 1031–1037. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.031>
- Upadhyay, S. K., Eckel-Mahan, K. L., Mirbolooki, M. R., Tjong, I., Griffey, S. M., Schmunk, G., Koehne, A., Halbout, B., Iadonato, S., Pedersen, B., Borrelli, E., Wang, P. H., Mukherjee, J., Sassone-Corsi, P., & Chandy, K. G. (2013). Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), E2239–E2248. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221206110>
- Valderrama-Cháirez, M. L., Cruz-Hernández, A., & Paredes-López, O. (2002). Isolation of functional RNA from cactus fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 279–286. <https://doi.org/10.1007/BF02782463>
- Venn, A. A., Loram, J. E., & Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1069–1080.
- Venn, A. A., Wilson, M. A., Trapido-Rosenthal, H. G., Keely, B. J., & Douglas, A. E. (2006). The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, Symbiodinium. *Plant, Cell & Environment*, 29(12), 2133–2142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.001587.x>
- Voolstra, C. R., Schnetzer, J., Peshkin, L., Randall, C. J., Szmant, A. M., & Medina, M. (2009). Effects of temperature on gene expression in embryos of the coral *Montastraea faveolata*. *BMC Genomics*, 10(1), 627. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-627>

- Voolstra, C. R., Valenzuela, J. J., Turkarslan, S., Cárdenas, A., Hume, B. C. C., Perna, G., Buitrago-López, C., Rowe, K., Orellana, M. V., Baliga, N. S., Paranjape, S., Banc-Prandi, G., Bellworthy, J., Fine, M., Frias-Torres, S., & Barshis, D. J. (2021). Contrasting heat stress response patterns of coral holobionts across the Red Sea suggest distinct mechanisms of thermal tolerance. *Molecular Ecology*, *30*(18), 4466–4480. <https://doi.org/10.1111/mec.16064>
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2010). Perforin: Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological Reviews*, *235*(1), 35–54. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x>
- Voytas, D. (2000). Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology*, *51*(1), 2–5.
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: Stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, *211*(19), 3059–3066.
- Weston, A. J., Dunlap, W. C., Beltran, V. H., Starcevic, A., Hranueli, D., Ward, M., & Long, P. F. (2015). Proteomics links the redox state to calcium signaling during bleaching of the scleractinian coral *Acropora microphthalma* on exposure to high solar irradiance and thermal stress. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *14*(3), 585–595. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043125>
- Wilson, S. K., Graham, N. a. J., Pratchett, M. S., Jones, G. P., & Polunin, N. V. C. (2006). Multiple disturbances and the global degradation of coral reefs: Are reef fishes at risk or resilient? *Global Change Biology*, *12*(11), 2220–2234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01252.x>
- Williams, A., Pathmanathan, J. S., Stephens, T. G., Su, X., Chiles, E. N., Conetta, D., Putnam, H. M., & Bhattacharya, D. (2021). Multi-omic characterization of the thermal stress phenome in the stony coral *Montipora capitata*. *PeerJ*, *9*, e12335. <https://doi.org/10.7717/peerj.12335>
- Wittle, L. W., Middlebrook, R. E., & Lane, C. E. (1971). Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon*, *9*(4), 327–331.



- Wittle, L. W., Scura, E. D., & Middlebrook, R. E. (1974). Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: A comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon*, *12*(5), 481–482.
- Yan, F., Cheng, X., Ding, X., Yao, T., Chen, H., Li, W., Hu, S., Yu, Z., Sun, Y., Zhang, Y., & Xia, L. (2014). Improved Insecticidal Toxicity by Fusing Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* with Av3 of *Anemonia viridis*. *Current Microbiology*, *68*(5), 604–609. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0516-1>
- Yellowlees, D., Rees, T. A. V., & Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, cell & environment*, *31*(5), 679–694.
- Zhang, M., Fishman, Y., Sher, D., & Zlotkin, E. (2003). Hydralysin, a Novel Animal Group-Selective Paralytic and Cytolytic Protein from a Noncnidocystic Origin in Hydra,. *Biochemistry*, *42*(30), 8939–8944. <https://doi.org/10.1021/bi0343929>
- Zhang, Y., Ip, J. C.-H., Xie, J. Y., Yeung, Y. H., Sun, Y., & Qiu, J.-W. (2022). Host–symbiont transcriptomic changes during natural bleaching and recovery in the leaf coral *Pavona decussata*. *Science of The Total Environment*, *806*, 150656. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150656>
- Zhang, Y., Zhou, Z., Wang, L., & Huang, B. (2018). Transcriptome, expression, and activity analyses reveal a vital heat shock protein 70 in the stress response of stony coral *Pocillopora damicornis*. *Cell Stress and Chaperones*, *23*(4), 711–721.
- Zhang, Y., Yang, Q., Ling, J., Long, L., Huang, H., Yin, J., Wu, M., Tang, X., Lin, X., Zhang, Y., & Dong, J. (2021). Shifting the microbiome of a coral holobiont and improving host physiology by inoculation with a potentially beneficial bacterial consortium. *BMC Microbiology*, *21*(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02167-5>
- Zoccola, D., Tambutté, E., Sénégas-Balas, F., Michiels, J.-F., Failla, J.-P., Jaubert, J., & Allemand, D. (1999). Cloning of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene*, *227*(2), 157–167.