



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (ICML, UNAM) - UNIDAD ACADÉMICA DE
SISTEMAS ARRECIFALES PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO.**

**EFFECTO DE LAS ALGAS SIMBIONTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD
BACTERIANA Y EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ASOCIADOS A LA
TRANSFERENCIA DE CARBONO EN LA MEDUSA *CASSIOPEA XAMACHANA***

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA
M. EN C. NATALIA CHÁVEZ CARABANTES¹**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. PATRICIA E. THOMÉ ORTÍZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM – CAMPUS PUERTO MORELOS, Q. ROO.**

**COMITÉ TUTOR
DR. MARCO ANTONIO VILLANUEVA MÉNDEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM – CAMPUS PUERTO MORELOS, Q. ROO.
DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
(UNAM) EN SISAL, YUCATÁN.
DRA. TANIA ISLAS FLORES
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM – CAMPUS PUERTO MORELOS, Q. ROO.
DR. JOSÉ Q. GARCÍA MALDONADO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. UNIDAD
MÉRIDA, YUCATÁN.**

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO., 29 JUNIO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML, UNAM) - Unidad Académica de
Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, Quintana Roo.

T E S I S

**EFFECTO DE LAS ALGAS SIMBIONTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD
BACTERIANA Y EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ASOCIADOS A LA
TRANSFERENCIA DE CARBONO EN LA MEDUSA *Cassiopea xamachana***

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Natalia Chávez Carabantes¹

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz^{1,2}

COMITÉ TUTOR

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez^{1,2}

Dra. Alejandra Prieto Davó³

Dra. Tania Islas Flores¹

Dr. José Q. García Maldonado⁴

1. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Campus Puerto Morelos, Q. Roo.
2. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Campus Puerto Morelos, Q. Roo.
3. Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Sisal, Yucatán.
4. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Mérida, Yucatán.

29-junio-2022



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML, UNAM) - Unidad Académica de
Sistemas Arrecifales Puerto Morelos, Quintana Roo.

T E S I S

EFFECTO DE LAS ALGAS SIMBIONTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA Y EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ASOCIADOS A LA TRANSFERENCIA DE CARBONO EN LA MEDUSA *Cassiopea xamachana*

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Natalia Chávez Carabantes¹

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Patricia E. Thomé Ortiz^{1,2}

COMITÉ TUTOR

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez^{1,2}

Dra. Alejandra Prieto Davó³

Dra. Tania Islas Flores¹

Dr. José Q. García Maldonado⁴

1. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Campus Puerto Morelos, Q. Roo.
2. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Campus Puerto Morelos, Q. Roo.
3. Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Sisal, Yucatán.
4. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Mérida, Yucatán.

29-junio-2022

DEDICATORIA

A mi mamá, mi papá, hermana, hermano y sobrinos.

¡Gracias por estar siempre conmigo a la distancia!

A Iváncito con cariño.

Gracias por siempre estar presente, por el apoyo moral y las palabras de motivación.

¡Gracias eternamente por todo el apoyo incondicional!

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca con número: 703128 (CVU: 544689), otorgada durante los cuatro años de mis estudios de doctorado. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT proyecto IN204318. Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. Y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM en Puerto Morelos, en donde se realizó este trabajo.

En especial, agradezco infinitamente a la Dra. Patricia E. Thomé, mi directora de tesis, por otorgarme el gran honor y privilegio de ser su estudiante. Por compartirme sus conocimientos, guiarme en todo momento, por sus valiosos consejos, por sus comentarios para mejorar mi trabajo, por su tiempo y paciencia. Y muchas gracias, en especial, por brindarme su bonita amistad, y por su calidez como persona con sus estudiantes.

A mi jurado de doctorado, Dr. Marco A. Villanueva Méndez, Dra. Alejandra Prieto Davó, Dra. Tania Islas Flores y Dr. José García Maldonado, muchas gracias a cada uno por su tiempo, paciencia, por compartirme sus conocimientos en cada evaluación, y por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio a quienes admiro y les tengo un gran cariño, Dr. Parmenio Suescún Bolívar, gracias por el apoyo, consejos y guiarme en cada momento. A la Dra. Victoria Grosso y Dra. Patricia Cabrales Arellano, quienes me guiaron con paciencia y compartieron sus conocimientos. A cada uno les agradezco infinitamente!

A la Dra. Mónica Medina de Penn State University, y al Dr. Aki Ohdera de California Institute of Technology (Goentoro Lab), por facilitarnos el acceso a los datos del genoma de la medusa *Cassiopea xamachana*. Al Dr. Daniel Cerqueda-García, por el apoyo en los análisis bioinformáticos. Al Dr. José Q. García-Maldonado, por el apoyo en la herramienta de secuenciación. A la Dra. Tania Islas-Flores por su asesoría y colaboración durante los experimentos de expresión de genes. Al M. en I. Miguel Ángel Gómez Reali por el apoyo técnico con el equipo de RT-PCR. A la M. en C. Abril Gamboa, por su apoyo en el procesamiento de muestras para secuenciación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Filo cnidaria.....	5
2.2 Filogenia y distribución de la medusa <i>Cassiopea xamachana</i>	6
2.3 Morfología de <i>C. xamachana</i>	6
2.4 Ciclo de vida de <i>Cassiopea</i> spp.....	7
2.5 Dinoflagelados simbiosites de la familia Symbiodiniaceae.....	9
2.6 Simbiosis <i>C. xamachana</i> - <i>S. microadriaticum</i>	10
2.7 Microbiota asociada a la capa superficial de mucus en cnidarios.....	11
2.8 Transporte de moléculas a través de las membranas biológicas.....	12
2.9 Intercambio metabólico en la relación simbiótica cnidario-Symbiodiniaceae.....	15
2.10 Proteínas transportadoras de fotosintetatos potenciales en cnidarios.....	16
2.11 Estructura de las proteínas transportadoras de glucosa GLUT.....	18
2.12 Intercambio de glucosa mediante transportadores GLUT.....	19
2.13 Transportadores de glicerol Acuagliceroporinas: AQGP.....	20
2.14 Intercambio de glicerol mediante transportadores Acuagliceroporinas.....	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	24
V. HIPÓTESIS	24
VI. OBJETIVOS	24
6.1 General.....	24
6.2 Específicos.....	24
CAPÍTULO I: ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA	25
MÉTODOS	25
1. Organismos y condiciones experimentales.....	25

1.1 Blanqueamiento artificial de <i>C. xamachana</i> para el análisis de la comunidad bacteriana.....	25
1.2 Colecta de mucus y agua de mar para el análisis de la comunidad bacteriana.....	26
1.3 Electroforesis en gel de agarosa	27
1.4 Preparación de las bibliotecas 16S ARNr Illumina MiSeq.....	27
1.5 Análisis bioinformático.....	28
1.6 Análisis estadísticos.....	29
RESULTADOS	30
ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA	30
1.7 Blanqueamiento experimental de <i>C. xamachana</i>	30
1.8 Extracción de ADN bacteriano del mucus en <i>C. xamachana</i> y de agua de mar y amplificación mediante PCR punto final de las regiones V3 y V4 del gen 16S ARNr.....	32
1.9 Composición y diversidad de la comunidad bacteriana del mucus.....	34
1.10 Estructura de la comunidad bacteriana por condición simbiótica y estación.....	38
DISCUSIÓN	42
Análisis de la comunidad bacteriana.....	42
CONCLUSIÓN	46
CAPÍTULO II: EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y GLICEROL	47
MÉTODOS	47
2.1 Identificación de ARN mensajeros que codifican para proteínas transportadoras <i>GLUT</i> y <i>AQGP</i> en el transcriptoma de <i>C. xamachana</i>	47
2.2 Identificación de motivos conservados en proteínas transportadoras <i>GLUT</i> y <i>AQGP</i>	50
2.3 Diseño de cebadores para amplificar el fragmento identificado de los genes que codifican para transportadores <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i>	57

2.4 Blanqueamiento de <i>C. xamachana</i> para el análisis de la expresión génica de proteínas transportadoras.....	59
2.5 Extracción de ARN para el análisis de la expresión de proteínas transportadoras.....	61
2.6 Amplificación mediante PCR del fragmento identificado del gen <i>FE1α</i> usado como gen de referencia (housekeeping).....	61
2.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	61
2.8 Secuenciación para corroborar la identificación de los fragmentos amplificados de los genes que codifican para proteínas <i>GLUT-3</i> y <i>GLUT-8</i>	62
2.9 Clonación y ligado de los amplicones de los fragmentos de los genes <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i>	62
2.10 Transformación: <i>AQGP-9</i> en <i>Escherichia coli</i>	62
2.11 Determinación de la expresión de genes codificantes para transportadores mediante PCR cuantitativa (RT-PCR).....	63
RESULTADOS	64
EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y GLICEROL	64
2.12 Blanqueamiento experimental de <i>C. xamachana</i>	64
2.13 Extracción de ARN total para la síntesis a ADN complementario (cADN).....	66
2.14 Comprobación de la síntesis de ADN complementario (cADN).....	66
2.15 Amplificación del fragmento identificado del gen que codifica para la proteína Factor de Elongación 1 alfa.....	68
2.16 Secuenciación para la identificación de los fragmentos codificantes de los genes <i>GLUT-3</i> y <i>GLUT-8</i>	68
2.17 Identificación de los fragmentos amplificados de los genes que codifican para <i>GLUT-3</i> y <i>GLUT-8</i> de <i>C. xamachana</i>	70
2.18 Identificación de los fragmentos amplificados de los genes <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i>	72
2.19 Secuenciación para la identificación de <i>AQGP-9</i> en <i>C. xamachana</i>	74
2.20 Detección de la concentración de cADN para los ensayos de RT-PCR.....	77
2.21 Ensayo RT-PCR: Gráficas de cinética de amplificación de secuencias correspondientes a los genes <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> , <i>AQGP-9-gen2</i> y <i>FE1α</i>	78

2.22	Curvas de fusión (disociación o curva melting) de amplificación del fragmento de los genes que codifican para <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-1</i> , <i>AQGP-9-2</i> y <i>FE1a</i>	82
2.23	Niveles de expresión de los fragmentos de los genes codificantes para transportadores <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i> en medusas simbióticas y blanqueadas.....	84
	DISCUSIÓN	88
	2.24 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA <i>GLUT-3</i>, <i>GLUT-8</i> Y GLICEROL <i>AQGP-9</i>	88
	CONCLUSIÓN	96
	CAPÍTULO III: DISCUSIÓN GENERAL	97
	CAMBIOS EN LA ESTRUCTURACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL MUCUS Y EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL TRANSPORTE DE CARBONO EN <i>C. xamachana</i>	97
	REFERENCIAS	99
	ANEXO 1	115
	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN DE TENTÁCULOS DE <i>C. xamachana</i>	115
	ANEXO 2	117
	ALINEAMIENTO MÚLTIPLE E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUCIDAS DE LOS GENES <i>GLUT-3</i> Y <i>GLUT-8</i> DE <i>C. xamachana</i>	117
	ALINEAMIENTO MÚLTIPLE E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS TRADUCIDAS DE LOS GENES <i>AQGP-9-gen1</i> Y <i>AQGP-9-gen2</i> DE <i>C. xamachana</i>	118
	ANEXO 3	119
	ANOVA DE UNA VÍA: VALORES DE AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL FRAGMENTO DE GENES TRANSPORTADORES.....	119
	ANEXO 4	124
	ANOVA DE UNA VÍA: DENSIDAD DE SIMBIONTES EN MEDUSAS BLANQUEADAS.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rasgos morfológicos de los cnidarios.....	6
Figura 2. Rasgos morfológicos en el color de los apéndices foliáceos (a.f.) y forma de los tentáculos de la medusa <i>Cassiopea</i> spp.....	7
Figura 3. Ciclo de vida de la medusa <i>C. xamachana</i>	8
Figura 4. Micrografía electrónica de una zoosfera (célula móvil) de <i>Symbiodinium</i> sp...	9
Figura 5. Tipos de transporte en membranas biológicas.....	14
Figura 6. Tipos de proteínas integrales de membrana que transportan moléculas.....	14
Figura 7. Metabolitos intercambiados en la simbiosis cnidario-simbionte.....	16
Figura 8. Esquema de la estructura de los transportadores GLUT.....	18
Figura 9. Transporte de glucosa en cnidarios mediante el transportador GLUT.....	20
Figura 10. Esquema de la estructura de los transportadores AQGP.....	21
Figura 11. Transporte de glicerol en cnidarios mediante transportadores AQGP.....	22
Figura 12. Blanqueamiento experimental y sus efectos sobre la densidad de simbioses en <i>C. xamachana</i>	30
Figura 13. Gráfico de la densidad celular de simbioses y su efecto en la talla de medusas <i>C. xamachana</i>	31
Figura 14. Imágenes de microscopía de fluorescencia de tentáculos de <i>C. xamachana</i> ...	31
Figura 15. Fotografías de la respuesta fenotípica de las medusas antes del tratamiento con azúcares y medusas control.....	32
Figura 16. ADN bacteriano del mucus de <i>C. xamachana</i> y de muestras de agua.....	33
Figura 17. PCR. Amplificación de las regiones V3 y V4 del gen ribosomal 16S ARNr..	33
Figura 18. Gráfico de coordenadas principales (PCoA) con la distancia Unifrac ponderada de muestras de mucus y agua de mar.....	34
Figura 19. Gráfico de coordenadas principales (PCoA) con la distancia Unifrac ponderada de muestras de mucus.....	35
Figura 20. Diagrama de caja que muestra las métricas de diversidad alfa y ASV observados.....	36
Figura 21. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de clase.....	38
Figura 22. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de familia.....	38
Figura 23. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de género.....	39
Figura 24. Análisis discriminante lineal (LEfSe, en inglés) a nivel de género por condición simbiótica.....	40

Figura 25. Análisis discriminante lineal (LEfSe, en inglés) a nivel de género por estación.....	40
Figura 26. Motivos conservados GR, GRR y PETK para el transportador GLUT.....	50
Figura 27. Motivos conservados para el transportador AQGP.....	50
Figura 28. Alineamiento de secuencias de aminoácidos para el transportador GLUT-3..	52
Figura 29 Alineamiento de secuencias de aminoácidos para el transportador GLUT-8...	53
Figura 30. Árbol filogenético generado para el transportador GLUT-3.....	54
Figura 31. Árbol filogenético generado para el transportador GLUT-8.....	54
Figura 32. Alineamiento de secuencias de aminoácidos para el transportador AQGP-9- <i>gen1</i>	55
Figura 33. Árbol filogenético generado para el transportador AQGP- <i>gen1</i>	55
Figura 34. Alineamiento de secuencias de aminoácidos para el transportador AQGP-9- <i>gen2</i>	56
Figura 35. Árbol filogenético generado para el transportador AQGP- <i>gen2</i>	56
Figura 36. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito >>TRINITY_DN109051, del transportador de glucosa <i>GLUT-3</i> en <i>C. xamachana</i>	57
Figura 37. Figura 37. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito Transcript (3204bp)/CDS Sequence (1545 bp)), del transportador de glucosa <i>GLUT-8</i> en <i>C. xamachana</i>	57
Figura 38. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito Transcript (807 bp)/CDS Sequence (807 bp)), del transportador de glicerol <i>AQGP-9-gen1</i> en <i>C. xamachana</i>	58
Figura 39. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito (Transcript (945 bp)/CDS Sequence (945 bp)) del transportador de glicerol <i>AQGP-9-gen2</i> en <i>C. xamachana</i>	58
Figura 40. Blanqueamiento experimental y sus efectos sobre la densidad de simbiontes en <i>C. xamachana</i>	65
Figura 41. Fotografías de la respuesta fenotípica en medusas blanqueadas y control.....	65
Figura 42. Extracción de ARN total de tentáculos de <i>C. xamachana</i>	66
Figura 43. Amplificación del fragmento identificado de los genes que codifican para proteínas <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> , <i>AQGP-9-gen2</i> mediante PCR punto final usando cADN de <i>C. xamachana</i> como molde.....	67
Figura 44. Amplificación de <i>FE1α</i> en gradiente.....	68

Figura 45. Amplificación del fragmento de la secuencia correspondiente al fragmento del gen que codifica para <i>GLUT-3</i>	69
Figura 46. Amplificación, clonación y secuenciación del fragmento del gen que codifica para la proteína <i>GLUT-8</i>	69
Figura 47. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos traducidas de <i>GLUT-3</i> y <i>GLUT-8</i> a partir del transcriptoma de <i>C. xamachana</i>	71
Figura 48. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de <i>GLUT-3</i> del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> el fragmento secuenciado.....	72
Figura 49. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de <i>GLUT-8</i> del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> con el fragmento secuenciado.....	72
Figura 50. Amplificación, clonación y secuenciación de <i>AQGP-9-gen1</i>	73
Figura 51. Amplificación, clonación y secuenciación de <i>AQGP-9-gen2</i>	74
Figura 52. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos traducidas de <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i> traducidos a partir del transcriptoma de <i>C. xamachana</i>	76
Figura 53. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la <i>AQGP-gen1</i> del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> con el fragmento secuenciado para cada gen.....	76
Figura 54. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de <i>AQGP-9-gen2</i> del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> con el fragmento secuenciado para cada gen.....	77
Figura 55. Detección de la concentración de cADN usado como templado para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR).....	77
Figura 56. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> y <i>FE1α</i>	79
Figura 57. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> y <i>FE1α</i>	79
Figura 58. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> y <i>FE1α</i>	80
Figura 59. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>FE1α</i>	80
Figura 60. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>FE1α</i>	81
Figura 61. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de las proteínas tipo <i>AQGP-9-gen2</i> y <i>FE1α</i>	81
Figura 62. Curvas de disociación de productos específicos de RT-PCR con el par de oligonucleótidos para los fragmentos amplificados de las proteínas tipo	

<i>FE1α</i> (A-B), <i>GLUT-3</i> (C-D), <i>GLUT-8</i> (E-F), <i>AQGP-9-1</i> (G-H) y <i>AQGP-2</i> (I-J).....	83
Figura 63. Niveles de expresión genética de secuencias de los fragmentos amplificados de <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP9-gen2</i> en medusas simbióticas (Control) y blanqueadas (Bleach) y cuantificación celular de Symbiodiniaceae.....	87
Figura 64. Representación esquemática del metabolismo celular de las reservas energéticas mediante el proceso de lipólisis (digestión de lípidos) en medusas blanqueadas.....	95
Figura 65. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de <i>GLUT-3</i> y <i>GLUT-8</i> traducidas del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> con secuencias cnidarios con mayor identidad.....	117
Figura 66. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i> traducidas del transcriptoma de <i>C. xamachana</i> con secuencias de cnidarios con mayor identidad.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de transporte en membrana celular.....	13
Tabla 2. Proteínas de membrana celular asociadas al transporte de fotosintetatos potenciales en cnidarios.....	17
Tabla 3. Genes que codifican a proteínas potenciales transportadoras de glucosa y glicerol a evaluar en <i>C. xamachana</i>	18
Tabla 4. Métricas de diversidad alfa.....	37
Tabla 5. Análisis PERMANOVA de la comunidad bacteriana del mucus en medusas blanqueadas y control.....	41
Tabla 6. Análisis PERMANOVA por covarianza basado en la distancia disimilitud y la matriz de distancia filogenética a partir de los datos de abundancia relativa de la comunidad bacteriana por condición simbiótica y estación.....	41
Tabla 7. Identidad de secuencias de los portadores de soluto, miembros de la familia 2 transportadores facilitadores de glucosa tipo <i>GLUT-3</i> en cnidarios.....	48
Tabla 8. Identidad de secuencias de los portadores de soluto, miembros de la familia 2 transportadores facilitadores de glucosa <i>GLUT-8</i> en cnidarios.....	48
Tabla 9. Identidad de secuencias en cnidarios del transportador facilitador de glicerol: acuagliceroporina <i>AQGP-9-gen1</i>	49

Tabla 10. Identidad de secuencias en cnidarios del transportador facilitador de glicerol: acuagliceroporina <i>AQGP-9-gen2</i>	49
Tabla 11. Secuencias de cebadores específicos para amplificar los fragmentos de las secuencias de genes que codifican para proteínas GLUT-3, GLUT-8, <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i>	59
Tabla 12. Ligación de las ampliificaciones de las <i>AQGP-9</i>	62
Tabla 13. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador facilitador de glucosa <i>GLUT-3</i> en <i>C. xamachana</i> en comparación con secuencias de otros cnidarios.....	70
Tabla 14. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador facilitador de glucosa <i>GLUT-8</i> en <i>C. xamachana</i> en comparación con secuencias de otros cnidarios.....	71
Tabla 15. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador de glicerol <i>AQGP-9-gen1</i> en <i>C. xamachana</i> en comparación con secuencias de otros cnidarios.....	75
Tabla 16. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador de glicerol <i>AQGP-9-gen2</i> en <i>C. xamachana</i> en comparación con secuencias de otros cnidarios.....	75
Tabla 17. Valores de C_T del método comparativo (ΔC_T) del fragmento de la proteína de referencia <i>FE1α</i> con los genes blanco al día 0 (T0), día 14 (T14) y día 21 (T21).....	84
Tabla 18. Valores de C_T del método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) de las cuantificaciones de los genes blanco con las muestras tratadas al día 0 (T0), día 14 (T14) y día 21 (T21).....	86

RESUMEN

Cassiopea xamachana es un organismo modelo en estudios biológicos y ecológicos debido a la simbiosis que mantiene con el dinoflagelado fotosintético *Symbiodinium microadriaticum*. La comunidad microbiana asociada a la medusa, protege al hospedero y contribuye en el reciclaje de nutrientes. Además, el carbono orgánico proveniente del simbiote como fotosintetatos libres potenciales que son principalmente glucosa y glicerol han sido durante mucho tiempo un foco de investigación debido a su contribución para el sostén de esta simbiosis. En este estudio, caracterizamos por primera vez la comunidad bacteriana en la capa superficial de la mucosa de *C. xamachana* y evaluamos los niveles de expresión de dos genes *GLUT* y *AQGP* de la medusa, encargados del transporte de glucosa y glicerol, respectivamente. Las medusas fueron colectadas en la laguna Nichupté, México y mantenidas en cautiverio. Disminuimos experimentalmente la densidad de simbioses de algas utilizando una mezcla de azúcares y evaluamos su efecto en la comunidad bacteriana nativa a través de la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S ARNr. También, evaluamos el efecto de la disminución de simbioses sobre los niveles de ARN mensajeros de algunos transportadores de glucosa y glicerol. El género bacteriano *Endozoicomonas* dominó en el mucus de medusas simbióticas, sin embargo, debido a la disminución de simbioses (blanqueamiento) se hizo evidente la presencia de patógenos potenciales como *Vibrio*. La ausencia de simbioses en la medusa, produjo cambios en la comunidad bacteriana del mucus y condujo a cambios en los niveles de expresión de los fragmentos amplificados de los genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosa y glicerol.

Palabras clave: medusa simbiótica, comunidad bacteriana, 16S ARNr, capa superficial de mucus, fotosintetatos potenciales, glucosa, glicerol, expresión génica.

ABSTRACT

Cassiopea xamachana is a model organism for biological and ecological studies due to the symbiosis it sustains with the photosynthetic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. Its associated microbial community protects the host and supports the recycling of nutrients, thus contributing to its health. Furthermore, free potential photosynthetates that are mainly glucose and glycerol are transferred from their symbiont and have long been a focus of research due to their contribution to sustaining this symbiosis. We characterized for the first time the bacterial community in the superficial mucous layer of *C. xamachana* and evaluated the expression levels of two genes *GLUT* and *AQGP*, responsible for the transport of glucose and glycerol, respectively. The jellyfish were collected from the Nichupté lagoon, Mexico and maintained in captivity. We experimentally decreased the density of algal symbionts by a mixture of sugars and evaluated their effect on the native bacterial community via high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. Also, we evaluated the effect of symbiont depletion on mRNA levels of some glucose and glycerol transporters. The bacterial genus *Endozoicomonas* was dominant in the mucus of symbiotic jellyfish, however, due to the decrease in symbionts (bleaching), the presence of potential pathogens such as *Vibrio* was evident. The absence of symbionts in the jellyfish produced changes in the bacterial community of the mucus and changes in the expression levels of the amplified fragments of the genes that code for glucose and glycerol transport proteins.

Keywords: symbiotic jellyfish, bacterial community, 16S rRNA, mucus surface layer, potential photosynthetates, glucose, glycerol, gene expression.

ABREVIATURAS

16S ARNr Subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal	Ctrl Control	kDa Kilodalton
ADN Ácido desoxirribonucleico	CHCl₃ Cloroformo	K_m Constante Michaelis-Menten
AGQP Acuagliceroporina	DADA2 Algoritmo de eliminación de ruido de amplicón divisivo	LDA Análisis discriminante lineal
ANOVA Análisis de varianza	DIC Carbono Inorgánico Disuelto	LEfSe Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal
AQGP Acuaporina	DIN Nitrato Inorgánico Disuelto	LiCl Cloruro de litio
AQGP/GF Acuagliceroporinas Facilitadores de glicerol	DOM Materia Orgánica Disuelta	M Marcador de peso molecular
ASVs Variantes de secuencias de amplicones	EDTA Ácido etilendiaminotetraacético.	mg L⁻¹ miligramos por litro
ATP Adenosín trifosfato	ExPASy Sistema Experto de Análisis de Proteínas	MgCl₂ Cloruro de Magnesio
BLAST Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local	FE1α Factor de elongación 1 alfa	min minuto
Bleach Blanqueadas	G3P Gliceraldehído 3-fosfato.	mL mililitro
cADN ADN complementario	ggplot2 Gramática de los gráficos	MS Mezcla de azúcares
CO₂ Dióxido de carbono	GLUT Transportador de glucosa (Glucose transporter, en inglés).	NADPH Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
COOH- carboxilo	HCO₃- Bicarbonato	NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica
		ng nanogramos

NH₂
amino

NH₄
Amonio

NO₃NH₄
Nitrato amonio

NPA-NPA/RD
N= asparagina, P= prolina,
A= alanina, R= arginina y
D= ac. Aspártico

OTUs
Unidades taxonómicas
operativas

pb
pares de bases

PCoA
Análisis de coordenadas
principales

PCR
Reacción en cadena de la
polimerasa

PERMANOVA
Análisis permutacional
multivariado de varianza

PETK
P= prolina, E= ácido
glutámico, T= treonina y K=
lisina

Phyloseq
Secuenciación filogenética

POM
Materia Orgánica Particulada

RT-PCR
PCR cuantitativa

QIIME 2
Programa de manejo de
bases de secuencias

QLS
Q= glutamina; L= leucina;
S= serina

RTM
Regiones transmembrana

SILVA 132
Silva América base de datos

Sim
Simbiótica

SLCA2
Súper familia de proteínas
acarreadoras de soluto

SML
Capa superficial de mucus
Superifical mucus layer, en
Inglés

I. INTRODUCCIÓN

La simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, es una de las simbiosis más reconocidas en los mares sub-tropicales en donde habitan grandes ecosistemas llamados arrecifes de coral, los cuales albergan una gran diversidad de vida marina y sostienen la productividad primaria y secundaria en los ecosistemas coralinos (Muscatine *et al.*, 1991; Davy *et al.*, 2012). Las regiones arrecifales se caracterizan por ubicarse en aguas pobres en nutrientes (oligotróficas) en donde la producción oceánica primaria y secundaria están limitadas por bajas concentraciones de nitrógeno, fósforo y hierro (Smith y Douglas, 1987). Muchos eucariontes heterótrofos obtienen los nutrientes de fuentes externas, pero los heterótrofos en simbiosis dependen en gran medida de sus microalgas fotosimbiontes como fuente de moléculas para subsistir (Moya *et al.*, 2008). Por ende, los mutualismos son un foco importante en la investigación a nivel celular y molecular en la búsqueda de comprender mejor los procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos, que permiten su establecimiento y supervivencia bajo distintas condiciones ambientales (Smith y Smith, 2009).

La estrecha relación conocida como simbiosis se define como la asociación mutua permanente o duradera entre dos o más organismos de especies diferentes (definida por De Bary en 1879, Paracer y Ahmadjian, 1987; Muscatine y Porter, 1977). Las simbiosis mutualistas son asociaciones beneficiosas entre dos o más individuos de especies diferentes que “trabajan juntos”. De este modo han logrado establecer una adaptación bioquímica que les permite el intercambio celular de nutrientes (Muscatine, 1990; Burriesci *et al.*, 2012). Lo más interesante en dichos mutualismos es la eficiencia de ambos socios para reciclar los nutrientes disponibles bajo distintas condiciones ambientales que individualmente no podrían lograr (Stanley, 2006; Yellowless *et al.*, 2008).

Los cnidarios son organismos claves para el estudio de la simbiosis en ambientes marinos, ya que son un grupo diverso. Entre ellos se encuentra el grupo de las medusas del subfilo Medusozoa, comprendidos por los Cubozoa y Scyphozoa; el grupo de los Hydrozoa, que comprende a las hidras; y el grupo de los Anthozoa, conformado por corales y anémonas (Gasca y Loman-Ramos, 2014). Si bien, no todos los cnidarios son simbióticos, los que logran establecer relaciones simbióticas se relacionan con una o más especies de microalgas dinoflageladas de la familia **Symbiodiniaceae** (LaJeunesse *et al.*, 2018).

En esta simbiosis, el simbionte al ser aceptado por su hospedero se resguarda en el **simbiosoma**. Esta estructura alberga al fotosimbionte y actúa como interfaz, manteniendo su integridad y

regulando su división celular para evitar que el simbiote se convierta en parásito. Además, funciona como un medio de comunicación e intercambio de sustancias entre ambos socios (Fitt y Trench, 1983; Wakefield y Kempf, 2001).

La permanencia de esta asociación mutualista se debe a la adaptación bioquímica entre ambas partes de la simbiosis debido al reciclaje e intercambio metabólico de nutrientes (Davy *et al.*, 2012). Los simbiotes suministran al cnidario hasta el 75% del carbono orgánico fijado como productos fotosintéticos (fotosintetatos: glucosa, maltosa, galactosa, glicerol, lípidos, etc.) (Muscatine, 1990; Burriesci *et al.*, 2012) y oxígeno. A cambio, el cnidario hospedero proporciona al simbiote subproductos de la alimentación heterotrófica y respiración como CO₂, nitrato, amonio y fosfatos (Devies, 1992; Rosenberg *et al.*, 2007; Yellowless *et al.*, 2008; Davy *et al.*, 2012).

El intercambio exitoso de estos metabolitos, es la clave para la permanencia de esta asociación y proporciona una importante ventaja competitiva para el hospedero. La simbiosis cnidario-dinoflagelado es una de las que llaman más la atención por su alto grado de especificidad (Fitt y Trench, 1983, Wakefield y Kempf, 2001). Aunque no está plenamente demostrado, se propone que para que se lleve a cabo el establecimiento de la simbiosis, es necesario que diferentes señales sean emitidas por parte de ambos socios. Por ejemplo, presencia de glicoproteínas en la superficie celular del fotosimbiote y lectinas en células del hospedero podrían promover el proceso de señalización, fagocitosis y establecimiento del simbiote (Fenton-Navarro *et al.*, 2003).

Un porcentaje del carbono orgánico sintetizado por el simbiote se transfiere al hospedero y contribuye en la producción de una capa externa superficial de mucus o SML (aproximadamente 20% en un coral o más en cnidarios que no calcifican) (Davies, 1984; Crossland, 1987; Wild *et al.*, 2004; Brown y Bythell, 2005; Tremblay *et al.*, 2011). Los hospederos cnidarios usan la SML como primera interfaz para proteger sus tejidos de impactos físicos, químicos y biológicos, eliminar las partículas de sedimento y atrapar partículas de alimentos y células bacterianas beneficiosas hacia la boca y la cavidad gastrovascular a través del proceso de arrastre dirigido por cilios.

La capa de mucus es un complejo rico en carbono compuesto por glicoproteínas, polisacáridos y lípidos, fabricados dentro de células especializadas (mucocitos) del epitelio (Bythell y Wild, 2011). El mucus que funge como barrera de protección de las células epiteliales ante las condiciones ambientales físicas, químicas y biológicas externas, las protege de la radiación y desecación (Brown y Bythel, 2005). Además, sirve como un medio de cultivo y sustento de una diversa

comunidad microscópica conformada por bacterias, arqueas, microalgas y hongos, que es significativamente distinta a la que habita en otros tejidos, esqueleto y cavidad del animal; y también se distingue del microbioma del agua de mar adyacente (Brown y Bythel, 2005; Apprill *et al.*, 2018). El microbioma es especie-específico y funge como defensa contra patógenos potenciales (Brown y Bythel, 2005). La capacidad del animal para producir mucus y atraer microbios beneficiosos, son la clave para mantener la salud y estabilidad del holobionte (definido como la relación entre un organismo multicelular y su comunidad microbiana asociada: cnidario-*Symbiodinium*-microbiota) (Vega-Thurber *et al.*, 2009).

Las comunidades microbianas de los cnidarios pueden sufrir cambios bajo condiciones de estrés ambiental (Ritchie, 2006; Bourne *et al.*, 2007; Ainsworth *et al.*, 2010). El blanqueamiento, que implica la pérdida de simbiontes podría modificar las propiedades bioquímicas del mucus por la ruptura de la relación hospedero-simbionte seguida de cambios taxonómicos y genómicos en el microbioma (Bourne *et al.*, 2009; Vega-Thurber *et al.*, 2009; Mouchka *et al.*, 2010). Estos cambios inducen la aparición de patógenos oportunistas que degradan al mucus hasta llegar al tejido mediante la producción de exoenzimas como las glucosidasas, y desencadenar la aparición de enfermedades (Klaus *et al.*, 2007; Vega-Thurber *et al.*, 2009).

En particular, los cnidarios constructores de arrecifes constituyen un reservorio de CO₂ de dimensiones importantes, resultado de la asociación simbiótica (Field *et al.*, 1998; Hügler y Sievert, 2011). Estos sistemas actualmente se encuentran amenazados por variaciones en las condiciones ambientales (temperatura, alta irradiancia o patógenos microbianos); así como factores antropogénicos (calentamiento global, contaminación y acidificación del océano) que provocan la ruptura de la relación simbiótica, y desencadenan eventos de blanqueamiento (pérdida del simbionte dinoflagelado) (Perry *et al.*, 2013). Esto ha reducido de manera importante la cobertura de los arrecifes de coral hasta en un 75% y la mitad de la acreción de carbonato de calcio en estos ecosistemas que funcionan como hábitat para diversas especies marinas (Aeby *et al.*, 2003). Para comprender con mayor claridad este tema se ha destacado la importancia del uso de organismos modelo para estudios de simbiosis y posibles reacciones al estrés ambiental (Lampert, 2016).

Cassiopea xamachana es una medusa bentónica que vive en simbiosis obligada con el dinoflagelado fotosintético *Symbiodinium microadriaticum* (clado A) (Fitt y Trench, 1983; LaJeunesse, 2001). *Cassiopea* spp. es un escifozoo (Rhizostomea) común en aguas poco profundas de ecosistemas tropicales y subtropicales (como manglares y pastos marinos) (Ohdera *et al.*, 2018). La medusa adulta descansa sobre el fondo del mar, con su paraguas convexo y brazos orales hacia

arriba para permitir la captura de luz por parte de sus simbioses (Hofmann *et al.*, 1996; Lampert, 2016; Ohdera *et al.*, 2018); de ahí el nombre común de medusa invertida. La colonización por el endosimbionte es esencial para activar el crecimiento y la transición del pólipo a la medusa adulta, conocida como estrobilación (Colley y Trench, 1985; Hofmann *et al.*, 1996).

No está claro hasta qué punto *C. xamachana* necesita su enlace simbiótico, y si las fuentes externas de alimentos pueden reemplazar la contribución de nutrientes de los simbioses cuando ocurre un evento de estrés ambiental seguido de su pérdida (condición de blanqueamiento). Más aún, no es claro cuál es el principal fotosintetato transferido hacia el cnidario y cómo se regula el mecanismo de transporte de carbono entre los socios simbióticos. Además, se sabe poco sobre los estímulos involucrados en la liberación de carbono orgánico procedente de la fotosíntesis (Kuo *et al.*, 2004; deBoer *et al.*, 2007; Yellowes *et al.*, 2008; Davy *et al.*, 2012).

Estudios previos indican que la glucosa es el producto de carbono primario transferido en la anémona *Exaiptasia pallida* (Burriesci *et al.*, 2012, Hillyer *et al.*, 2016; Molina *et al.*, 2017) aunque la evidencia de los primeros estudios en corales apuntaban a que era el glicerol (Lewis y Smith, 1971, Muscatine, 1967, Schmitz y Kremer, 1977). En la medusa *C. andromeda* se demostró que la glucosa y el glicerol eran los únicos metabolitos libres detectados en el tejido después del marcaje con ^{14}C (Hofmann y Kremer, 1981). Por otro lado, se ha demostrado que el glicerol es liberado principalmente por las células de *Symbiodinium* en forma aislada (por ejemplo, en cultivo) y se ha encontrado que altos niveles de glicerol se liberan en respuesta al estrés osmótico o de nitrógeno (Suescún-Bolívar *et al.*, 2012). Se ha sugerido que la glucosa podría ser el principal producto fotosintético translocado del simbiótico al hospedero en algunas especies de cnidarios (Whitehead y Douglas, 2003; Burriesci *et al.*, 2012; Hillyer *et al.*, 2016).

En la actualidad, se desconoce la estructura bacteriana del mucus en *C. xamachana* y que factores contribuyen a estructurar y mantener a esta comunidad, lo que constituye una laguna importante en el conocimiento si pretendemos entender como funciona esta relación simbiótica en el holobionte. En el presente estudio se planteó evaluar la importancia relativa de factores bióticos (presencia/ausencia de simbioses), y abióticos (temperatura en dos estaciones del año) sobre la estructura de la comunidad bacteriana asociada a la capa superficial de mucus; así como la expresión diferencial de genes involucrados en la transferencia de carbono orgánico en *C. xamachana* en condiciones de simbiosis y blanqueamiento.

II. ANTECEDENTES

2.1 Filo Cnidaria

El filo Cnidaria comprende hasta 11,000 especies, como los corales, hidrocorales, medusas, anémonas y abanicos de mar (Gasca y Loman-Ramos, 2014). Se distribuyen en hábitats marinos, someros, profundos, bénticos y pelágicos, desde las regiones tropicales hasta las zonas polares (Curtis *et al.*, 2007; Gasca y Loman-Ramos, 2014). Presentan organelos subcelulares denominados cnidoblastos (o cnidocistos; cápsulas urticantes o adhesivas) del tipo nematocisto, espirocisto y pticocisto que usan como mecanismo de defensa (Curtis *et al.*, 2007). Se alimentan principalmente de zooplancton y algunos mantienen simbiosis con miembros de la familia Symbiodiniaceae para cubrir sus demandas energéticas (Brown y Bythel, 2005).

La organización morfológica de los cnidarios es de simetría radial (Figura 1a), compuesta de un saco hueco con una cavidad gastrovascular y una sola abertura que cumple con la función de boca y ano (Arai, 1997). Esta abertura está rodeada de tentáculos que le permiten conducir el alimento hacia la cavidad gastrovascular, en donde liberan enzimas que digieren parcialmente el alimento (Solomon and Vilee, 1996); en las células de la gastrodermis que recubren la cavidad se completa el proceso digestivo (Arai, 1997). La circulación del agua se realiza a través del seno gastrovascular, lo que proporciona O₂ a la gastrodermis y conduce el CO₂, productos de desecho y restos de partículas de alimento no digerido al exterior a través de la boca (Arai, 1997).

El cuerpo de los cnidarios se puede observar en forma de pólipo o medusa (Solomon *et al.*, 1996) (Figura 1 b y c). La pared del cuerpo de los cnidarios se compone de dos capas celulares: 1) epidermis externa (ectodermo) con células epiteliomusculares, sensoriales, nerviosas, intersticiales y cnidocitos y 2) gastrodermis interna (endodermo) con células gástricas para la digestión, células secretoras de enzimas digestivas o mucus; ambas capas están separadas por una capa acelular conocida como mesoglea que sostiene y da forma al organismo (Arai, 1997).

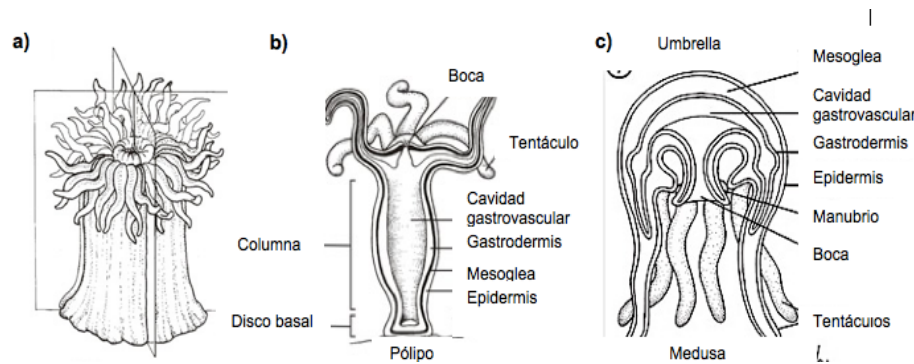


Figura 1. Rasgos morfológicos de los cnidarios. a) El cuerpo de los cnidarios es de simetría radial. b) Pólipo: vive fijo al sustrato por el disco basal, en la parte superior se encuentra la boca, rodeada por tentáculos. Tienen forma de saco y en su interior se encuentra la cavidad gástrica. c) La medusa es de vida libre, con forma de campana, la boca se encuentra en la parte inferior rodeada por tentáculos, presenta brazos orales con los que conduce el alimento hacia la boca y cavidad gástrica (Chappell, 1980).

2.2 Filogenia y distribución de la medusa *C. xamachana*

Las medusas del subfilo Medusozoa, están conformadas por los Cubozoa y Scyphozoa. La medusa *C. xamachana* es un Scyphozoa bentónico (orden Rhizostomae) en el que se puede diferenciar la fase de pólipo y medusa (Lampert, 2016). La primera especie fue descrita en el Mar Caribe como *Medusa frondosa* (Pallas, 1774), y una segunda especie del Mar Rojo fue descrita como *M. andromeda* hasta que en 1900 Bigelow la describió detalladamente y la clasificó como una especie *de novo*. Posteriormente, el nombre de *Cassiopea* se propuso para todas las medusas con apéndices foliáceos (Péron y Lesueur, 1810). Las especies de *Cassiopea* se distribuyen en ecosistemas costeros someros tropicales y subtropicales, manglares y praderas marinas (Morandini *et al.*, 2017).

2.3 Morfología de *C. xamachana*

Presenta de 8 a 10 tentáculos alrededor de la boca, la campana con forma de platillo es relativamente plana con una depresión central en la superficie (exumbrella) en el lado opuesto a los tentáculos (Berryman, 2016; Lampert, 2016). Son los únicos entre los scyphomedusae en que su exumbrella plana se basa en el sustrato, mientras que su subumbrella convexa y los brazos orales se posicionan hacia arriba (Lampert, 2016). El color de los apéndices foliáceos y la forma de los tentáculos varía entre organismos de la misma especie (Figura 2 a-h). Llega a medir 30 cm de diámetro en su etapa adulta (Enciclopedia de la Vida, 2014). La alta penetración de la luz es importante para *Cassiopea* debido a que en su etapa adulta alberga al dinoflagelado fotosintético *Symbiodinium* (Hofmann *et al.*, 1996; Lampert, 2016).

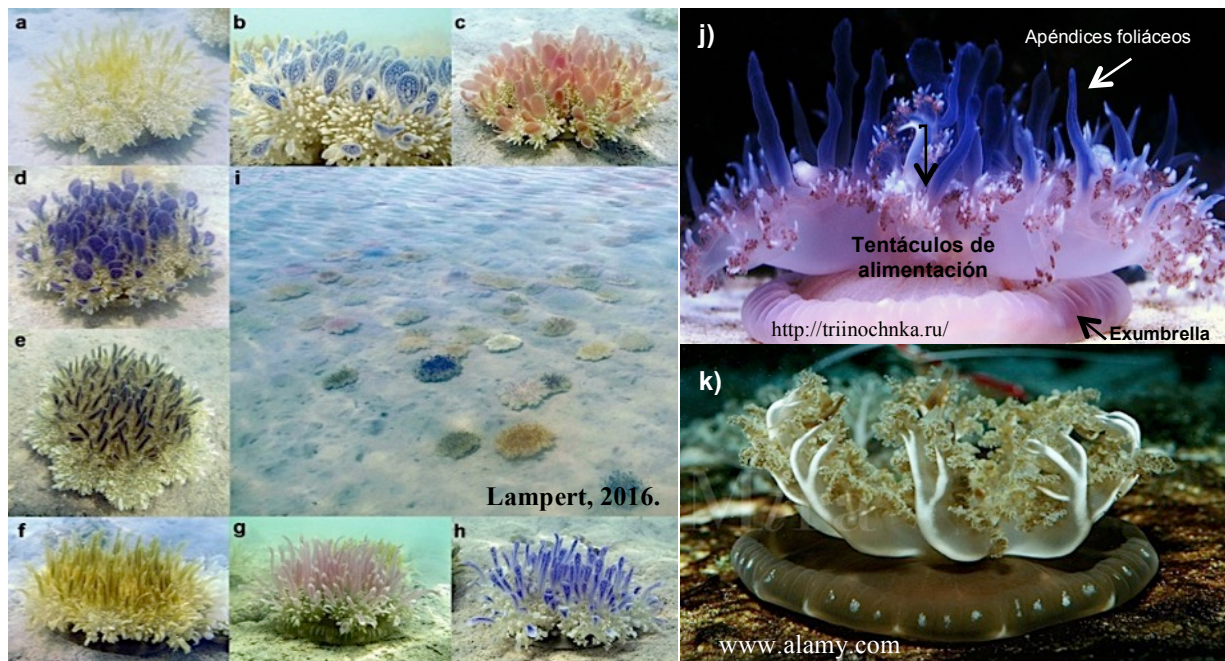


Figura 2. Rasgos morfológicos en el color de los apéndices foliáceos y forma de los tentáculos de la medusa *Cassiopea* spp. a) blancos con tentáculos delgados y puntiagudos. b) azul y blanco con tentáculos redondos. c) rojo con tentáculos redondos. d) morado con tentáculos redondos. e) azul oscuro con tentáculos aplanados. f) verdes y amarillos con tentáculos esbeltos y puntiagudos. g) rosado con tentáculos delgados y puntiagudos. h) azul con tentáculos aplastados. i) Población de *C. xamachana*. j) Principales rasgos morfológicos en *Cassiopea* sp. k) La medusa alberga altas densidades de simbiontes y posiciona su campana (exumbrella) con los tentáculos apuntando hacia la luz (Imagen tomada de Lampert, 2016).

2.4 Ciclo de vida de *Cassiopea* spp.

Cassiopea spp. son organismos gonochoristas, con determinación fija del sexo (sexos separados), con reproducción sexual (Lampert, 2016). Los espermatozoides se liberan al agua y fertilizan los huevos dentro de la cavidad gastrovascular de la hembra (Sterrer, 1986). Los huevos fertilizados pasan por la cavidad gastrovascular y se depositan en el disco oral. La escisión comienza ~1-2 h después de que los óvulos fertilizados son visibles en el disco oral. Los embriones ciliados (plánulas) se observan 48 h después de la fertilización. Después de 96 h de la fertilización las plánulas se asientan en el sedimento y hacen metamorfosis para convertirse en pólipo o un escifistoma (Colley y Trench, 1983). La reproducción de los pólipos es asexual; son capaces de producir yemas de 3-4 mm de longitud por envaginación desde la región aboral del cáliz (Daly *et al.*, 2007). El escifistoma puede adquirir simbiontes y diferenciarse a una éfira, que posteriormente se convertirá en una medusa adulta (Figura 3). Si los escifistomas no adquieren al simbiote, pueden desarrollar nuevas yemas, que pueden asentarse nuevamente y formar nuevos escifistomas para repetir el ciclo (Colley y Trench 1983; Ohdera *et al.*, 2018).

La etapa de pólipo es sésil (fija al sustrato) y el ciclo de vida consiste en la alternancia de dos etapas, el pólipo y la medusa, durante el verano/otoño, respectivamente (Colley y Trench, 1983). Los pólipos se desarrollan en superficies lisas y los adultos se desarrollan mejor en sedimento arenoso a profundidades de entre 1 y 5 m (Fleck y Fitt, 1999). La energía proporcionada por las zooxantelas no es suficiente para cubrir todas sus necesidades metabólicas, la medusa también se alimenta por depredación mediante el uso de los nematocistos contenidos dentro de sus tentáculos que le permiten atrapar a su presa (Fitt y Costley, 1998).

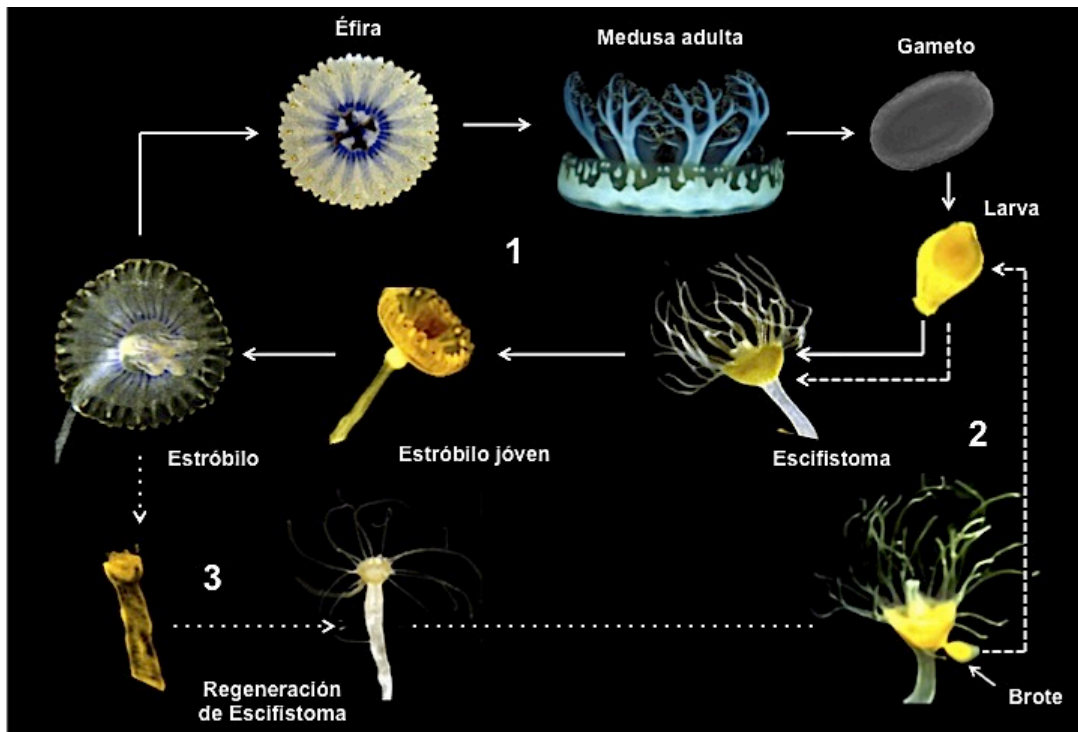


Figura 3. Ciclo de vida de la medusa *Cassiopea xamachana*. 1) El ciclo comienza con la reproducción sexual (líneas continuas); las medusas adultas liberan sus gametos en la columna de agua. Los óvulos fertilizados se convierten en larvas ciliadas de vida libre. Las larvas identifican un sustrato adecuado, se asientan y se desarrollan a un escifistoma. La etapa final se produce una vez que *Symbiodinium* ha sido adquirido por los escifistomas, produciendo la metamorfosis, estrobilación y posterior formación de la éfira. Las éfiras son liberadas en la columna de agua y se genera una medusa de vida libre. 2) Etapa asexual (líneas punteadas), el escifistoma desarrolla un brote que se libera al medio ambiente en forma de larva. Esta larva se asienta y hace metamorfosis a un escifistoma y el ciclo permanece. Alternativamente, las éfiras que se liberan pueden regenerarse a un escifistoma (líneas punteadas) e ingresar a la parte asexual del ciclo (Imagen tomada y modificada de Cabrales-Arellano *et al.*, 2017).

2.5 Dinoflagelados simbiosites de la familia Symbiodiniaceae

Los dinoflagelados (clase Dynophyceae) son protistas alveolados, con hasta 2000 especies descritas (Lenaers *et al.*, 1989; 1991; Zhang *et al.*, 2000). Son fotótrofos unicelulares y forman parte del plancton, cuentan con un par de flagelos para moverse en vida libre, su estructura se compone por placas de celulosa, denominadas tecas (Figura 4 A). Son una célula cocoide dentro del hospedero (Figura 4 B), y pueden ser autótrofos, heterótrofos o mixótrofos (Stat *et al.*, 2006). Los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae (Orden Suessiales, Clase Dynophyceae) presentan relaciones mutualistas con invertebrados marinos y protistas; habitan en el simbiosoma de al menos cinco Fila, tales como Cnidaria (corales, medusas y anémonas), Mollusca (caracoles y almejas), Plateminta (gusanos planos), Porifera (esponjas) y protistas unicelulares como los foraminíferos (Trench, 1979).

Existen 22 especies asignadas a diversos géneros dentro de la familia Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2012; 2018; Hume *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015) y se han descrito nueve clados de *Symbiodinium* (A-I) (Lampert, 2016) que corresponden con siete géneros actualmente propuestos (LaJeunesse *et al.*, 2018). Los clados A-D, F y G, se encuentran con mayor frecuencia en cnidarios (LaJeunesse, 2001). Cada clado difiere en su tolerancia a la temperatura, en su intensidad lumínica óptima, y en su tamaño, entre otros aspectos (Lampert, 2016). Las células de esta familia de microalgas presentan coloración café-dorada debido a pigmentos fotosintéticos en sus cloroplastos: clorofila *a* y *c*, beta-caroteno, peridinina y xantofilas (Curtis *et al.*, 2007). La densidad de simbiosites dentro de los hospederos es mayor que en la columna de agua (Lampert, 2016). En vida libre se observan como zoospora y en simbiosis se observan como una célula cocoide marrón de 5 a 15 μm de diámetro (Figura 4 A, B y C) (Stat *et al.*, 2006).

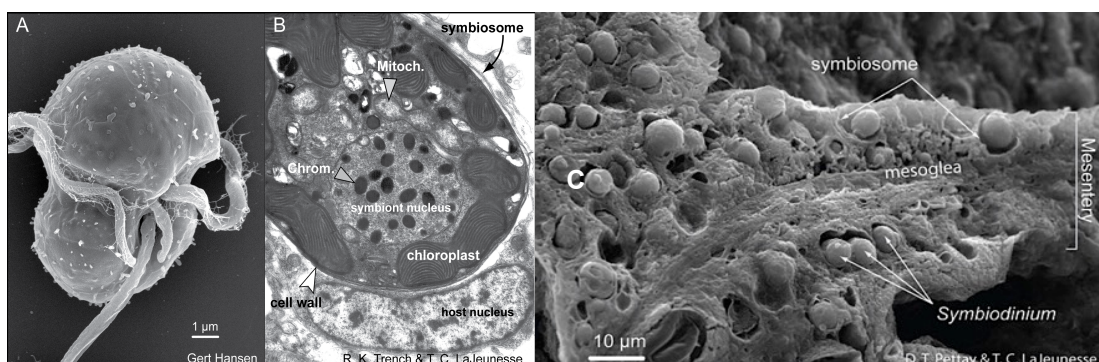


Figura 4. Dinoflagelados simbiosites de la familia Symbiodiniaceae. (A) Micrografía electrónica de una zoosfera (célula móvil) de Symbiodiniaceae (B) Célula cocoide en el hospedero, se observan los principales organelos: simbiosoma, mitocondria, cloroplasto, núcleo del simbiote, cromatina y pared celular. (C) Micrografía del mesenterio interno de un pólipo del coral *Porites porites* que muestra simbiosites dentro del simbiosoma (Imagen tomada de LaJeunesse *et al.*, 2012; Pasaribu *et al.*, 2015).

2.6 Simbiosis *C. xamachana*-*S. microadriaticum*

En algunos escifozoos, la transición de pólipo a medusa, conocida como estrobilación, puede darse por la temperatura y otras señales exógenas (Holst, 2012). Sin embargo, en las medusas del género *Cassiopea* se ha demostrado que la estrobilación se presenta una vez que adquiere al endosimbionte *Symbiodinium* spp. (Hofmann *et al.*, 1996). En *Cassiopea* spp. se produce una sola éfira con cada evento de estrobilación (Colley y Trench, 1983).

El proceso de colonización de los simbioses ocurre cuando *Symbiodinium* entra en el pólipo a través de la boca y posteriormente son fagocitados al gastrodermo (Colley y Trench, 1983; Fitt y Trench, 1983). La colonización exitosa de las células cnidarias presupone la supresión de la respuesta inmune del hospedero, lo cual es un indicio del vínculo entre la simbiosis y la inmunidad innata (Miller *et al.*, 2007). Las células de *Symbiodinium* que no pueden establecerse son destruidas por fusión lisosómica (Colley y Trench, 1983). Los simbioses que logran establecerse proliferan dentro de las células hospederas (simbiosoma) (Colley y Trench, 1983). La estrobilación se presenta unas 3 semanas después, dependiendo de varios factores, incluidas las especies de simbioses, la temperatura y la ingesta de alimento (Colley y Trench, 1983).

La eficiencia de la simbiosis *Symbiodinium*-*Cassiopea*, depende de la transferencia de carbono orgánico del simbiote a la medusa y puede representar hasta el 60% del carbono fijado en incubaciones *in vitro*, siendo un fenómeno sostenible, que cubre en un 70% los requerimientos basales de la medusa (Lampert, 2016). Los cnidarios tienen la capacidad de almacenar millones de simbioses por centímetro cuadrado en sus tejidos (Curtis *et al.*, 2007). Los pólipos parecen flexibles para internalizar uno o más clados de simbiote. Un pólipo puede presentar mejores posibilidades de supervivencia si alberga simbioses de más de un clado; sin embargo, las medusas adultas son más restrictivas y albergan un solo clado de Simbiadiniaceae (Lampert, 2016). Estudios previos han demostrado que las medusas adultas pierden tamaño y peso cuando están blanqueadas (disminución de simbioses) aún cuando haya otro tipo de alimento disponible (Lampert, 2016).

2.7 Microbiota asociada a la capa superficial de mucus en cnidarios

La región de interfaz entre el cnidario y el agua circundante es proporcionada por la capa de mucus superficial que recubre al cnidario, la cual se sintetiza en parte a partir del carbono orgánico fijado fotosintéticamente por las algas simbios (Ainsworth *et al.*, 2015). La composición bioquímica del mucus en cnidarios representa un nicho ecológico y una importante fuente de nutrientes para el microbioma (Brown y Bythell, 2005; Tremblay *et al.*, 2011). El cnidario libera señales químicas y/o nutrientes que atraen microorganismos que permiten estructurar eficazmente a la comunidad bacteriana asociada al mucus (Vega-Thurber *et al.*, 2008).

Al mismo tiempo, la microbiota asociada realiza funciones potencialmente beneficiosas para el hospedero; algunos estudios han destacado su importancia en el suministro de nutrientes (fijación de nitrógeno) como el amonio, la inhibición de enfermedades y de virulencia contra patógenos oportunistas mediante la producción de compuestos antimicrobianos (Rohwer *et al.*, 2002; Ritchie, 2006; Vega-Thurber *et al.*, 2009; Krediet *et al.*, 2009).

Algunas investigaciones sugieren que la comunidad microbiana puede cambiar bajo condiciones de estrés ambiental como el calentamiento del mar que resulta en el blanqueamiento del animal hospedero (Ritchie, 2006; Bourne *et al.*, 2007; Ainsworth *et al.*, 2010), lo que aumenta la incidencia de posibles especies patógenas (Klaus *et al.*, 2007). El blanqueamiento implica la ruptura de la simbiosis, lo que lleva a una pérdida de simbiontes y/o una reducción de los pigmentos fotosintéticos que cambian las interacciones fisiológicas del tejido y la capa mucosa (Bourne *et al.*, 2009; Vega-Thurber *et al.*, 2009). El calor (elevación de la temperatura) y el estrés (p.ej. luz), son factores que pueden alterar esta sensible simbiosis (Lesser, 1996). La interrupción de la simbiosis puede afectar la secreción de mucus y modificar las propiedades bioquímicas de la capa superficial de mucus, seguido de cambios taxonómicos en el microbioma asociado (Bourne *et al.*, 2007; 2009; Vega-Thurber *et al.*, 2009; Mouchka *et al.*, 2010; Rivera-Ortega y Thomé, 2018).

Se cree ampliamente que la capa de mucus producida por los hospederos cnidarios estimula el crecimiento bacteriano (Krediet *et al.*, 2009). Sin embargo, aún se sabe poco del papel específico que juegan las bacterias asociadas a los corales y otros cnidarios; los trabajos que existen se han enfocado principalmente en tratar de caracterizar a estas comunidades a nivel taxonómico (Vega-Thurber *et al.*, 2009).

Las diversas comunidades procariotas asociadas con los corales formadores de arrecifes pueden proporcionar importantes ventajas ecológicas a sus hospederos. Además de la capa de mucus, el tejido en los cnidarios también funge como un reservorio único de grupos de procariontes. En corales, existen filotipos bacterianos específicos del tejido y del mucus (Apprill *et al.*, 2018). El género bacteriano *Endozoicomonas* spp. se ha establecido como un indicador del rendimiento del holobionte de coral bajo un estado simbiótico y un entorno favorable. Además, se considera que este género bacteriano tiene un papel benéfico para su hospedero simbiótico (Bourne y Webster 2013).

Se ha demostrado que las bacterias asociadas a la capa superficial de mucus en cnidarios simbióticos son responsables de la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben posibles patógenos como *Vibrio* spp., favoreciendo la competencia interespecífica por nutrientes y espacio (Brown y Bythell, 2005; Ritchie, 2006). En particular, el género *Vibrio* spp. incrementa su abundancia durante eventos de blanqueamiento y se vuelve dominante, esto se ha relacionado con una reducción en la actividad antibiótica del mucus en corales (Ritchie, 2006).

Por otro lado, el análisis a partir del gen ribosomal 16S ARNr (Subunidad 16 del ácido ribonucléico), proporciona información taxonómica sobre la abundancia relativa de filotipos microbianos asociados a cnidarios (Rohwer *et al.*, 2002). Las investigaciones sugieren que el microbioma nativo del cnidario puede cambiar ante condiciones de estrés y se ha reportado que la aparición de enfermedades o estrés ambiental (p.ej. temperatura, pH, nutrientes, luz y carbono orgánico disuelto) modifican la composición, riqueza y abundancia del microbioma (Bourne y Webster, 2013; Williams *et al.*, 2015; Hernández-Agreda *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no es claro si los cambios que siguen al blanqueamiento son una respuesta a la pérdida de *Symbiodinium*, al aumento de la temperatura, o a ambos (Sharp *et al.*, 2017).

2.8 Transporte de moléculas a través de las membranas biológicas

Los mecanismos que regulan el transporte de moléculas orgánicas en cnidarios simbióticos son poco conocidos. En las células animales, las moléculas entran o salen mediante transporte activo o difusión pasiva a través de proteínas integrales transportadoras o de canal de la membrana plasmática y del simbiosoma (Fitt y Trench, 1983, Wakefield y Kempf, 2001). Las membranas biológicas se componen de una bicapa de fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina) con propiedad hidrofílica (grupo fosfato) e hidrofóbica (ácidos grasos), hidratos de carbono y proteínas (integrales y periféricas) (Devlin, 2004; Berg *et al.*, 2008). Las membranas biológicas, presentan

sistemas de transporte que les proporcionan la propiedad de permeabilidad selectiva para el transporte de moléculas (Horton *et al.*, 2008).

De acuerdo al tipo de molécula que se transporta se distinguen tres tipos de transporte (Figura 5): **1) Pasivo**: permite el paso de moléculas a través de la membrana plasmática a favor del gradiente de concentración (ósmosis, difusión simple o difusión facilitada); **2) Activo primario**: como la Bomba de sodio-potasio Na^+/K^+ que mantiene el transporte de ambos iones en contra de un gradiente de mayor a menor concentración; este tipo de transporte requiere de ATP (energía para la modificación conformacional); y **3) Activo secundario** que se realiza gracias a un gradiente de iones que permiten su movimiento en el sentido del gradiente (entre ambos lados de la membrana) y simultáneamente transporta otra molécula (p.ej. glucosa) (Tabla 1; Figura 5) (Horton *et al.*, 2008).

Tabla 1. Tipos de transporte en membrana celular

	Portador de proteína	Movimiento respecto al gradiente de concentración	Energía requerida
Difusión simple	No	A favor	No
Canales y Poros	Sí	A favor	No
Transporte Pasivo	Sí	A favor	No
Transporte Activo			
Primario	Sí	En contra	Sí
Secundario	Sí	En contra	Sí, Gradiente

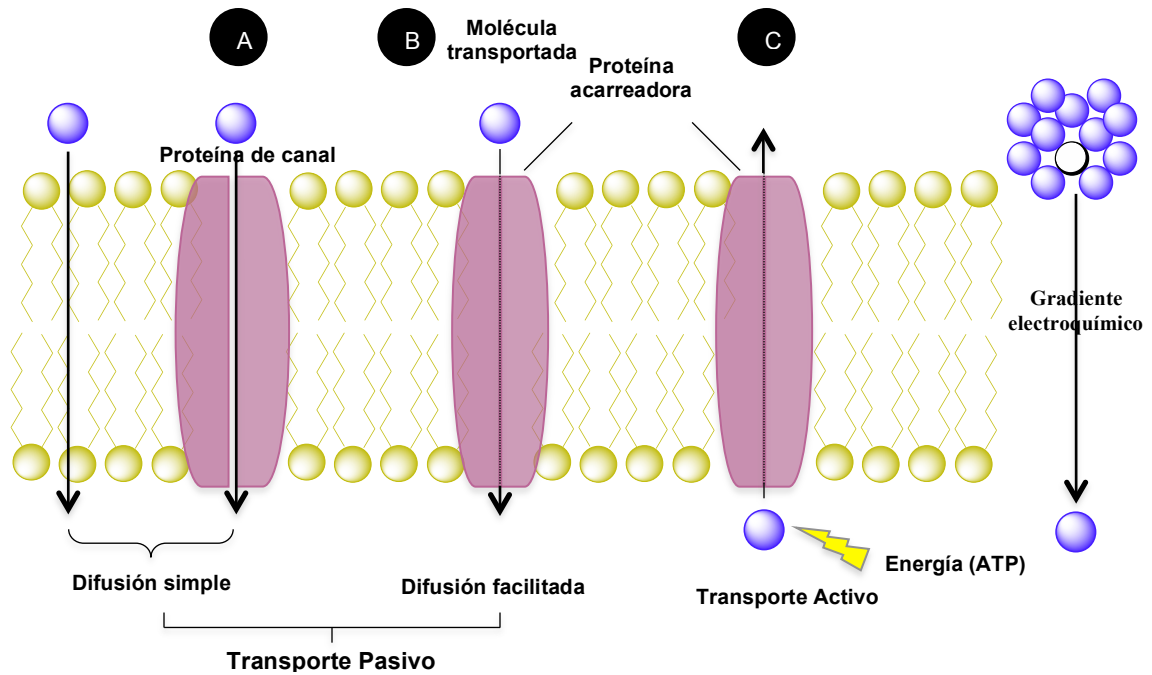


Figura 5. Tipos de transporte en membranas biológicas. (A) Transporte pasivo, las moléculas de menor tamaño, sin carga, atraviesan la bicapa lipídica por difusión simple. (B) Difusión facilitada, las moléculas más grandes, sin carga, se transfieren mediante proteínas acarreadoras, a favor del gradiente electroquímico, no se requiere energía. (C) Transporte activo, en contra del gradiente electroquímico, se requiere energía para el transporte (Murray *et al.*, 2009).

En el transporte pasivo y activo se distinguen proteínas integrales que permiten el movimiento de moléculas (Figura 6) como: **1) Uniportadores**, la molécula se mueve en un solo sentido. **2) Simportadores**, dos moléculas se mueven en el mismo sentido y **3) Antiportadores** o intercambiadores, dos moléculas se mueven en sentido opuesto (Aleyda *et al.*, 2012).

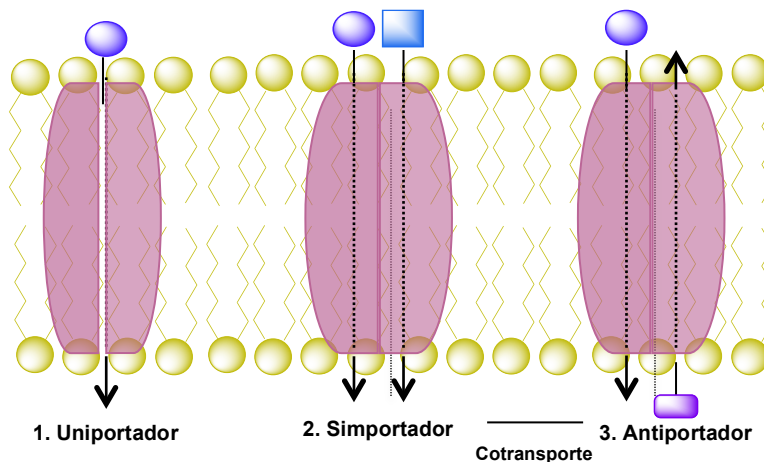


Figura 6. Tipos de proteínas integrales de membrana que transportan moléculas.

2.9 Intercambio metabólico en la relación simbiótica cnidario-Symbiodiniaceae

Uno de los aspectos más relevantes de esta asociación es la capacidad de las algas simbiotes para captar la luz y realizar fotosíntesis eficientemente en condiciones de simbiosis. La fotosíntesis se basa en la reducción de CO_2 a carbohidratos (CH_2O) por los electrones del agua utilizando la luz como un catalizador (Berg *et al.*, 2008). La fijación de carbono para la incorporación bioquímica hacia monosacáridos ocurre con las reacciones del ciclo de Calvin-Benson; primero ocurre la fijación de CO_2 mediante la enzima ribulosa 1,5-bifosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato usando tres moléculas de ATP. Posteriormente, se reduce el 3-fosfoglicerato para generar hexosas, consumiendo dos moléculas de NADPH, y por último, se regenera la ribulosa 1,5-bifosfato para que se pueda seguir con la fijación de CO_2 (Berg *et al.*, 2008).

Los productos de la fotosíntesis se conocen como fotosintetatos. El principal fotosintetato es el gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Una de las dos moléculas de GAP formadas por cada ciclo del proceso de fotosíntesis puede ser usada para sintetizar glicerol mediante la intervención de la enzima triosa fosfato isomerasa y posteriormente, la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa la oxida a glicerol 3-fosfato y el grupo fosfato es eliminado por una fosfatasa. La síntesis de glucosa puede producirse en varios pasos enzimáticos, por la degradación del almidón o bien a partir de la fructosa, que es un producto del ciclo de Calvin (Berg *et al.*, 2008). Los metabolitos (glicerol o glucosa), podrían ser transportados al citoplasma celular del animal hospedero a través de proteínas integrales o transportadoras específicas para cada monosacárido.

El intercambio de moléculas orgánicas del simbiote al cnidario, se realiza a través de transportadores que intervienen en la incorporación de iones (Na^+ , K^+ , I^- , Ca^{2+}) y nutrientes al protoplasma celular (Lalonde *et al.*, 2004). El nitrógeno en forma de amonio es transportado al simbiote por el hospedero, mientras que el nitrato es el nutriente más importante obtenido del agua de mar (Kopp *et al.*, 2015, Muller-Parker *et al.*, 1994, Pernice *et al.*, 2012). Estos compuestos nitrogenados son usados por el simbiote para sintetizar aminoácidos que son incorporados a las proteínas del simbiote o se traslocan al animal (Tanaka *et al.*, 2006, Wang y Douglas, 1998) representando una fuente importante de energía y nutrientes en la simbiosis (Figura 7).

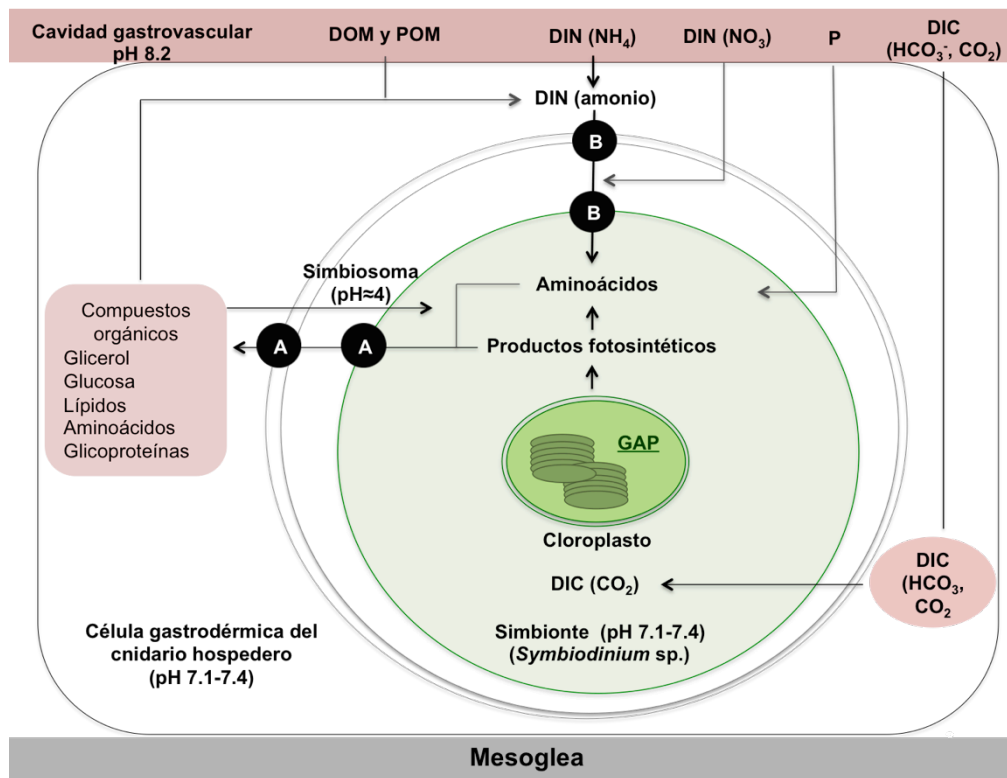


Figura 7. Metabolitos intercambiados en la simbiosis cnidario-simbionte. Carbono Inorgánico Disuelto (DIC): dióxido de carbono y bicarbonato (HCO₃⁻ y CO₂) como fuente de carbono para la fotosíntesis y producción de gliceraldehído-3-fosfato (GAP), productos fotosintéticos y aminoácidos. (A) transferencia de productos fotosintéticos hacia el cnidario y translocación inversa de compuestos del hospedero al simbiote. Materia Orgánica Disuelta y Particulada (DOM y POM) son tomadas por el cnidario del agua de mar circundante. El nitrato y amonio (NO₃ y NH₄) como Nitrato Inorgánico Disuelto (DIN) se obtienen del agua de mar o son excretados por el cnidario y traslocados al simbiote para la síntesis de aminoácidos (B). Parte de estos aminoácidos se transportan al cnidario (A). El fósforo (P) puede ser tomado del agua y es asimilado por el simbiote para la incorporación en ácidos nucleicos (Imagen modificada de Davy *et al.*, 2012).

2.10 Proteínas transportadoras de fotosintetatos potenciales en cnidarios

Para comprender el mecanismo del transporte de nutrientes en cnidarios simbióticos, se pueden tomar como base estudios en otros sistemas (Sproles *et al.*, 2018). En células de humanos y otros eucariontes, el transporte de glucosa se realiza mediante transportadores ubicados dentro de la súper familia de proteínas acarreadoras de soluto (Solute Carrier, SLCA2, en inglés) que comprende dos familias: (1) Transportadores facilitadores de glucosa uniportadores (*GLUT*: Glucose transporter, en inglés) y (2) Cotransportadores o simportadores de sodio/glucosa (*SGLT*: Sodium dependent glucose transporters, en inglés) (Escher y Rasmuson-Lestander, 1999; Joost *et al.*, 2002; Wood y Trayhurn, 2003; Wright, 2013; Scheepers *et al.*, 2015).

Las proteínas GLUT-3 y GLUT-8, son de particular interés en condiciones de simbiosis debido a su alta afinidad por la glucosa y a que se localizan en membranas internas, plasmática y posiblemente en la membrana del simbiosoma (Tabla 2) (Fitt y Trench, 1983; Rands *et al.*, 1993; Wakefield y Kempf, 2001; Uldry y Thorens, 2004; Sproles *et al.*, 2018).

Tabla 2. Proteínas de membrana celular asociadas al transporte de fotosintetatos potenciales en cnidarios (Sproles *et al.*, 2018).

Transportador	Descripción	Especie	Homólogo	Acceso
GLUT-3 (SLC2A1)	Portadores de soluto, miembros de la familia 2 - Transportadores facilitadores de glucosa	<i>Anthopleura elegantissima Madracis auretenra Nematostella vectensis</i>	<i>E. pallida</i>	KXJ19779
GLUT-8 (SLC2A8)		<i>Acropora digitifera Nematostella vectensis Porites australiensis Polypodium hydriforme</i>	<i>E. pallida</i>	KXJ23301
GLUT-12 (SLC2A12)		<i>Montastraea cavernosa Pseudodiploria strigosa</i>	<i>E. pallida</i>	KXJ15959.1
AQGP/GF	Acuagliceroporinas Facilitadores de glicerol	<i>Aurelia aurita Nematostella vectensis Pocillopora damicornis Polypodium hydriforme</i>	<i>E. pallida</i>	KXJ09068

El glicerol puede ser intercambiado mediante proteínas de canal intrínsecas dentro de la súper familia de proteínas intrínsecas principales (Major Intrinsic Proteins, MIPs, en inglés) conocidas como Acuaporinas (**AQGP**), que son las que facilitan la difusión del agua; se cree que los cnidarios probablemente también usen estas proteínas para el transporte de glicerol (Sproles *et al.*, 2018). Los análisis filogenéticos separan a las AQGP en dos clados: (1) acuagliceroporinas AQGPs que son canales que transportan moléculas pequeñas no cargadas como glicerol, CO₂, urea, iones, y excluyen al agua y (2) acuaporinas AQGP, que son selectivas para el agua (Rojek *et al.*, 2008).

Sproles y colaboradores (2018) identificaron secuencias homólogas de GLUTs y AQGPs en cnidarios como *Exaiptasia diaphana*, destacando la importancia de estas proteínas en el intercambio de fotosintetatos potenciales en la simbiosis (Tabla 2) (Sproles *et al.*, 2018). En la medusa *C. xamachana*, el transporte de glucosa y glicerol podría estar mediado por los siguientes tipos de proteínas transportadoras (Tabla 3):

Tabla 3. Genes que codifican a proteínas potenciales transportadoras de glucosa y glicerol a evaluar en *Cassiopea xamachana*.

GLUCOSA		GLICEROL	
<i>GLUT</i>	Uniportador: Genes para el transportador de glucosa	<i>AQGP/FG</i>	Acuagliceroporinas: Facilitadores de glicerol

2.11 Estructura de las proteínas transportadoras de glucosa GLUT

Los transportadores de glucosa tipo GLUT son glicoproteínas uniportadoras presentes en la membrana plasmática. Tienen una estructura α hélice, 12 segmentos transmembrana con las terminales amino y carboxilo en el citoplasma y 13 asas hidrofílicas así como un sitio de glicosilación en el asa uno (Figura 8) (Castrejón *et al.*, 2007). Las GLUT se conforman por una cadena de aminoácidos codificada por el gen *SLC2A1* con motivos conservados que intervienen en la translocación de la glucosa. La unidad de masa molecular de las GLUT es de 54.2 kDa, con una alta afinidad por la glucosa de 1-2 mM (Castrejón *et al.*, 2007).

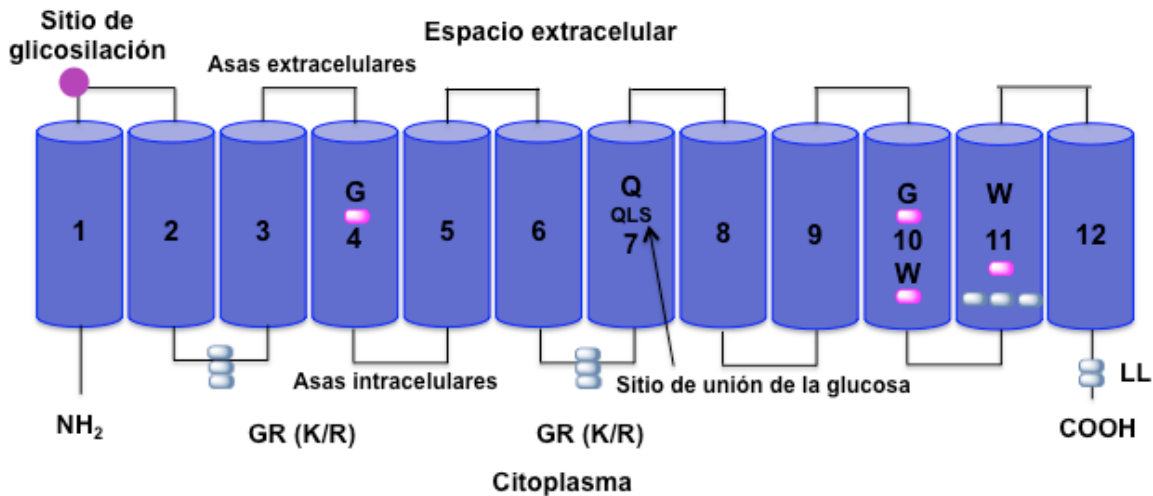


Figura 8. Esquema de la estructura de los transportadores GLUT. Presenta 12 regiones o segmentos transmembrana (RTM) conectados por 13 asas hidrofílicas, siete dentro del citoplasma (intracelulares) y seis en el espacio extracelular (extracelulares). Las terminaciones amino (NH₂) y carboxilo (COOH-) se ubican en el citoplasma. Se conforman por una serie de aminoácidos conservados: G= glicina; R= arginina; Q= glutamina; L= leucina; K= lisina; S= serina; W= triptófano. La secuencia QLS es el principal sitio de reconocimiento y unión de la glucosa, así como las secuencias G, GR K/R y W (Castrejón *et al.*, 2007; Horton *et al.*, 2008). Presentan un sitio de glicosilación en el asa uno.

2.12 Intercambio de glucosa mediante transportadores GLUT

Para el transporte de glucosa mediante proteínas **GLUT** se forman uniones tipo puentes de hidrógeno, entre los grupos hidroxilo y amino del GLUT y los grupos carbonilo de la glucosa (Castrejón *et al.*, 2007). Los GLUT transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración, de ahí el nombre de difusión facilitada (una forma de transporte pasivo) (Castrejón *et al.*, 2007). La función de detección de glucosa tiene dos componentes: (1) entrada de glucosa en la célula mediada por GLUT y (2) metabolismo de glucosa a través de la fosforilación por glucoquinasa (Díaz y Burgos, 2002; Castrejón *et al.*, 2007).

El mecanismo del transporte de glucosa a través de un transportador tipo *GLUT* en cnidarios en simbiosis se puede deducir de estudios hechos en otras células y es el siguiente: La glucosa ingresa a la célula del hospedero en cuatro etapas: 1) La glucosa es transportada desde el cloroplasto del simbiote pasando primero por el simbiosoma mediante un mecanismo aún desconocido. La selectividad a la glucosa está determinada por secuencias de aminoácidos altamente conservadas, la secuencia QLS (glutamina, leucina y serina) del segmento transmembranal siete, siendo éste el sitio de reconocimiento de la glucosa (Figura 9); 2) la glucosa se adhiere al sitio de unión y el GLUT cambia de conformación mediante un proceso de fosforilación que es mediado por una proteína cinasa la lo cual fosforila en el residuo aminoácido serina atravesando la membrana del simbiosoma y llegando al citoplasma de la célula del hospedero. Esta proteína transfiere el grupo fosfato del ATP rompiendo un enlace fosfoanhídrido y formando un fosfoéster; 3) el transportador queda ubicado dentro del citoplasma y libera la glucosa al citoplasma de la célula del hospedero; 4) cambia nuevamente de conformación, dejando libre el sitio de unión de la glucosa en el espacio extracelular y regresa a su estado inicial (Figura 9) (Díaz y Burgos, 2002).

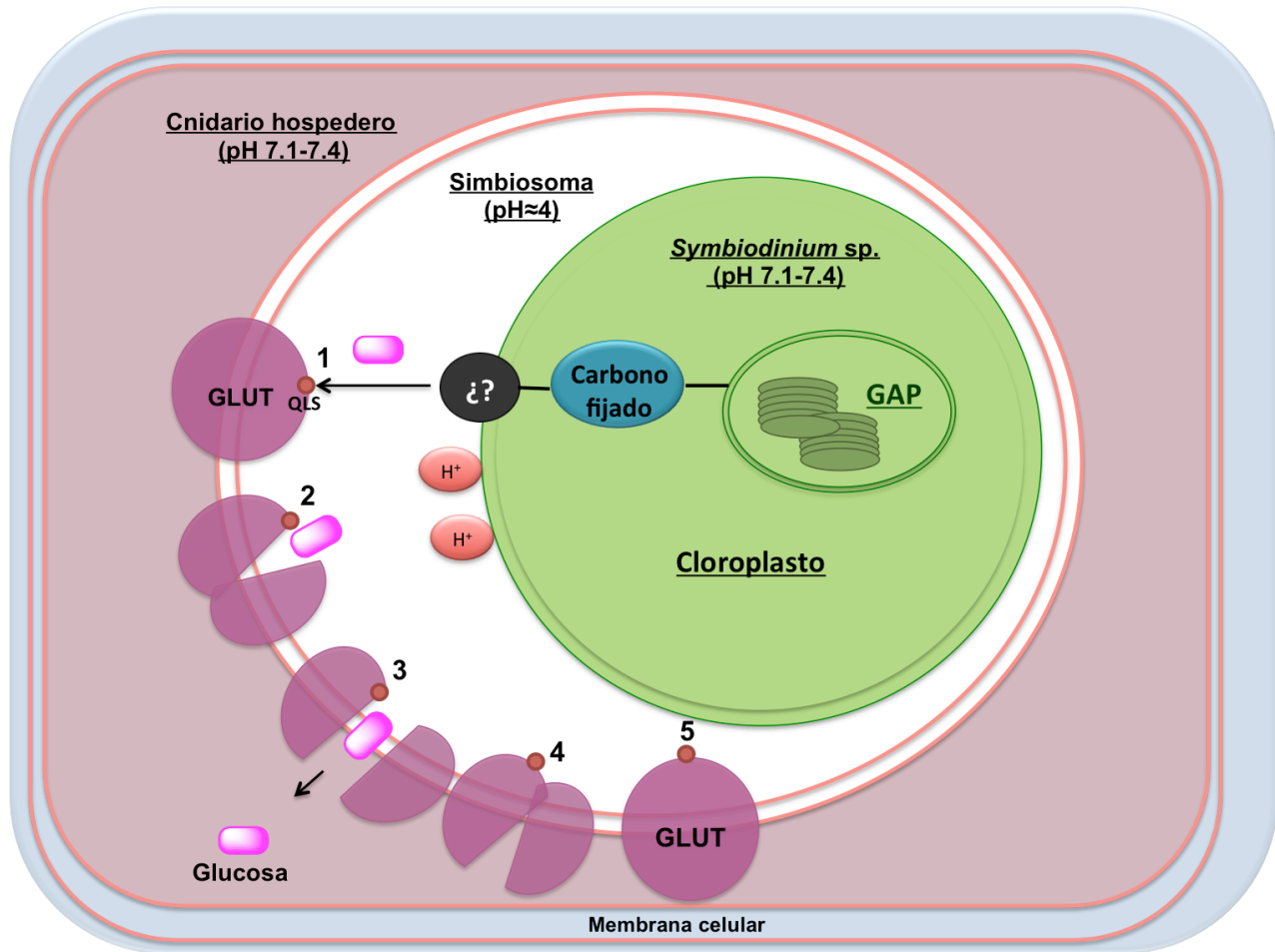


Figura 9. Transporte putativo de glucosa en cnidarios en simbiosis mediante el transportador GLUT. (A) La glucosa es transportada desde el cloroplasto del simbiote pasando primero por el simbiosoma mediante un transportador aún desconocido, en la membrana del simbiosoma, la molécula de glucosa se une al transportador GLUT en el sitio QLS (glutamina, leucina y serina) y el GLUT cambia de conformación. Se libera la glucosa al citoplasma y la proteína regresa a su condición inicial (Castrejón *et al.*, 2007).

2.13 Transportadores de glicerol Acuagliceroporinas: AQGP

Las **acuagliceroporinas (AQGP)**, son proteínas de membrana plasmática tipo canal, conocidas como facilitadoras del transporte de glicerol y pueden funcionar para tomar o excluir glicerol. Se caracterizan por tener una estructura secundaria α hélice y seis segmentos transmembrana con las terminales amino y carboxilo en el citoplasma así como nueve asas hidrofílicas (Figura 10). La masa molecular de las AQGP es de 45 kDa (Castrejón *et al.*, 2007).

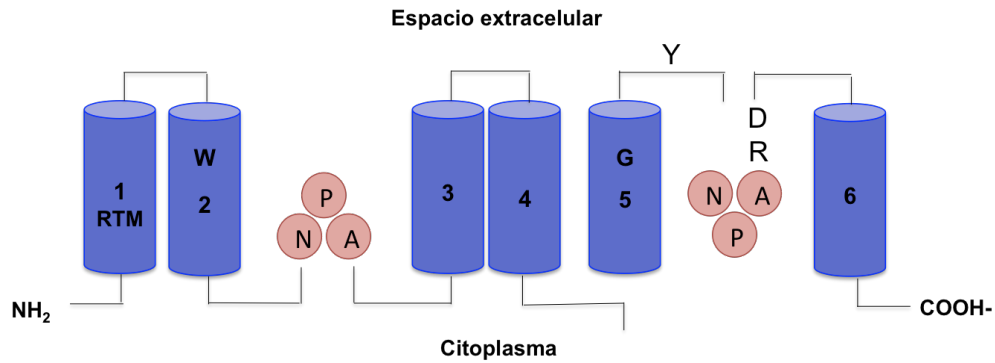


Figura 10. Esquema de la estructura de los transportadores AQGP. Los transportadores AQGP presentan seis regiones o segmentos transmembrana (RTM) y nueve asas hidrofílicas, así como dos cajas en su secuencia primaria que son portadoras de un triplete de aminoácidos conservados NPA-NPA/RD (aminoácidos: N= asparagina, P= prolina, A= alanina, R= arginina y D= ac. aspártico). Las terminaciones amino (NH_2) y carboxilo (COOH^-) se ubican en el citoplasma (Baker *et al.*, 2012).

2.14 Intercambio de glicerol mediante transportadores Acuagliceroporinas

Las proteínas transportadoras de glicerol **AQGP** forman canales que permiten específicamente el paso del glicerol, y actúan por una diferencia de concentración (más glicerol afuera, se mueve hacia adentro). Una vez que se transporta glicerol al simbiosoma, que podría ocurrir también mediante acuagliceroporinas, el glicerol podría cruzar la membrana de la célula hospedera a través de una AQGP, cuyo mecanismo de transporte es por difusión (canal) (Figura 11).

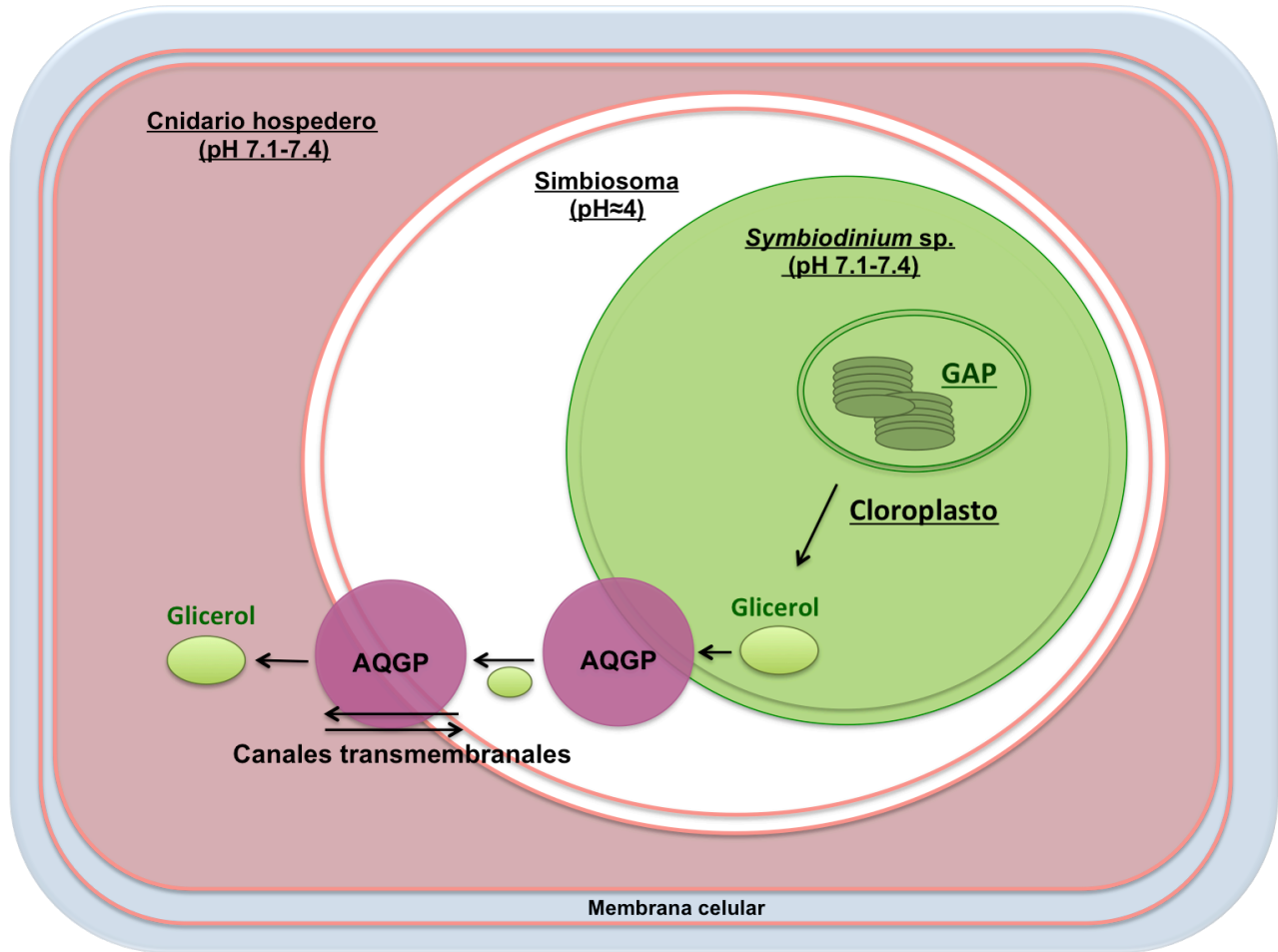


Figura 11. Transporte putativo de glicerol en cnidarios en simbiosis mediante transportadores AQGP. (A) Los canales transmembranales de la acuagliceroporina permiten la difusión facilitada de glicerol desde el simbiote al simbiosoma y de ahí hasta el cnidario hospedero.

III. JUSTIFICACIÓN

La simbiosis *Cassiopea-Symbodium* podría considerarse como altamente específica ya que solo se asocia con un tipo de simbiote que le transfiere carbono orgánico, cubriendo hasta en un 70% de sus requerimientos basales (Lampert, 2016). Estudios previos han demostrado que las medusas adultas pierden biomasa cuando disminuye su densidad de simbioses o están desprovistas de luz (inhibición de la fotosíntesis del simbiote) aún cuando exista otro tipo de alimento disponible (Lampert, 2016). Se desconoce si bajo condiciones de blanqueamiento, el alga simbiote modifica su capacidad de transporte de carbono orgánico que contribuye también a la producción de una capa de mucus en el cnidario que sostiene a una comunidad bacteriana nativa que juega un papel importante en el intercambio de nutrientes. Estas observaciones, hacen atractivo el uso de la medusa *Cassiopea xamachana* como un organismo modelo ideal para el estudio de la simbiosis; en particular, del estudio enfocado a evaluar los cambios en los niveles de expresión de genes asociados al transporte de carbono orgánico principalmente de glucosa y glicerol, cuando ocurre la ruptura de la simbiosis vista como una disminución de simbioses (blanqueamiento).

Se ha visto en otros cnidarios simbióticos como la anémona *Exaiptasia pallida* que las proteínas transportadoras *GLUT* son de particular interés en la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, por su alta afinidad por la glucosa, además de estar localizadas en membranas internas, plasmática y posiblemente en la membrana del simbiosoma (Fitt y Trench, 1983; Rands *et al.*, 1993; Wakefield y Kempf, 2001; Uldry y Thorens, 2004; Sproles *et al.*, 2018). Por otro lado, existen evidencias de que el glicerol y la glucosa, son los principales fotosintetatos transferidos en la simbiosis mutualista cnidario-Symbiodiniaceae (Muscatine, 1967; Swanson y Guldberg, 1998). Sproles y colaboradores (2018) identificaron secuencias homólogas de *GLUTs* y *AQGP*s en cnidarios como *Exaiptasia diaphana*, destacando la importancia de estas proteínas en el intercambio de fotosintetatos potenciales.

La presencia de simbioses requiere que la medusa exprese transportadores capaces de internalizar fotosintetatos como glucosa y glicerol, que además contribuyan en la formación de la capa superficial de mucus que sustenta a una comunidad bacteriana nativa. Sin embargo, no se conoce qué factores bióticos y abióticos influyan en estructurar a la comunidad bacteriana de este organismo modelo. Por ende, en la presente tesis se planteó evaluar cambios génicos en algunos transportadores potenciales de glicerol y glucosa así como evaluar cambios en la estructura de la comunidad bacteriana asociada al mucus en el organismo modelo *Cassiopea xamachana* en condiciones de simbiosis y blanqueamiento.

IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son los cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas asociadas a la capa superficial de mucus de la medusa, cuando se somete a un blanqueamiento artificial en dos estaciones del año (verano e invierno)?
2. ¿La pérdida de simbiontes resulta en cambios en los niveles de expresión génica de proteínas transportadoras de glucosa y glicerol en medusas blanqueadas, en comparación con medusas simbióticas?
3. ¿La pérdida de simbiontes conduce a cambios en la estructuración de la comunidad bacteriana que vive en la capa superficial de mucus e influye en los niveles de expresión de genes que codifican a proteínas asociadas al transporte de carbono?

V. HIPÓTESIS

La pérdida de simbiontes y/o estación del año modifican la estructuración de la comunidad bacteriana asociada al mucus en la medusa *C. xamachana*. Además, la disminución de simbiontes influye en los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosa y glicerol.

VI. OBJETIVOS

6.1 General

Demostrar que la disminución de simbiontes en *C. xamachana* modifica la estructura de la comunidad bacteriana del mucus y esto resulta en cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosa *GLUT* y glicerol *AQGP*.

6.2 Específicos

1. Comparar la composición de bacterias asociadas al mucus de medusas simbióticas y blanqueadas en dos condiciones ambientales (verano e invierno).
2. Determinar mediante PCR cuantitativa (RT-PCR) cambios en los niveles de expresión de los genes *GLUT-3*, *GLUT-8* y *AQGP-9-gen1*, *AQGP-9-gen2* que codifican para proteínas transportadoras de glucosa y glicerol en medusas simbióticas y blanqueadas.

CAPÍTULO I: ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

MÉTODOS

1. Organismos y condiciones experimentales

Se colectaron medusas adultas de *C. xamachana* en la laguna Nichupté, México. Estas medusas se mantuvieron en cautiverio en un estanque de cultivo con sistema abierto con 100 L de agua de mar, bajo condiciones naturales de luz y temperatura durante más de un año antes de los experimentos. Para los experimentos, se tomaron medusas del estanque de cultivo y se mantuvieron individualmente en vasos de precipitado de un litro con 500 ml de agua de mar del estanque de cultivo, con aireación y reemplazos diarios de agua de mar durante los experimentos que tuvieron una duración de 28 días. Todas las medusas en vasos de precipitado se mantuvieron bajo un techo con luz ambiental indirecta. Las medusas simbióticas ($n = 6$) se mantuvieron como control y se compararon con medusas blanqueadas ($n = 6$). Los organismos no fueron alimentados durante el tiempo del experimento. Se tomaron muestras de mucus de medusa en dos estaciones del año en verano (finales de agosto de 2019) e invierno (principios de marzo de 2020) con temperaturas medias de ~ 29.02 °C y ~ 26.05 °C, respectivamente (SAMMO, 2019-2020).

1.1 Blanqueamiento artificial de *C. xamachana* para el análisis de la comunidad bacteriana

Se seleccionaron medusas con un tamaño de paraguas similar (6 cm de diámetro). El blanqueamiento experimental de medusas se logró mediante la adición de una mezcla de monosacáridos, siguiendo a Pogoreutz y colaboradores (2017). La mezcla de azúcares (SM) contenía: (D+) glucosa (4.14 mg L^{-1}), (D+) galactosa (3.59 mg L^{-1}) y manitol (2.25 mg L^{-1}), disueltos en 200 mL de agua destilada con una concentración final de azúcar mezclada de 0.3 mg L^{-1} . Cada medusa se encontraba individualmente en un vaso de precipitado, cada vaso contenía 500 mL de agua de mar; diariamente se reemplazó el agua de mar del vaso de precipitado y se agregaron 3 mL de la mezcla de azúcares, esto se realizó durante 28 días consecutivos. Este procedimiento se eligió para evitar el blanqueamiento por altas temperaturas, que puede modificar significativamente la comunidad bacteriana (Littman *et al.*, 2011). Todos los días se tomaron medidas del diámetro del paraguas de todas las medusas para evaluar la pérdida de biomasa durante los experimentos.

Se evaluó el éxito del blanqueamiento tomando muestras semanales de un fragmento de tentáculo de cada medusa, utilizando tijeras esterilizadas. Cada fragmento de tentáculo se pesó y se molió con un homogeneizador Dounce. El homogenado se centrifugó a 13.000 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se lavó dos veces con agua milli-Q y se resuspendió en 500 µl de agua de mar estéril, agregando Lugol al 30 % (v/v) para ayudar en el recuento de simbiontes. La densidad del simbionte se cuantificó con un hemocitómetro en un microscopio óptico (3 recuentos repetidos por muestra) y los datos se normalizaron al peso húmedo (g) del tentáculo. Se tomaron fotografías de un fragmento de tentáculo de cada medusa con un microscopio de fluorescencia (Axioskop 40 con el objetivo 20X y el filtro Tex Red Fs 15) al principio y al final del tratamiento de 28 días.

1.2 Colecta de mucus y agua de mar para el análisis de la comunidad bacteriana

Se tomaron muestras de la capa superficial de mucus (SML) de medusas simbióticas mantenidas como control (n = 6) y medusas blanqueadas (n = 6) al comienzo y después de 28 días. Todos los muestreos se repitieron para verano e invierno (n=3 para cada estación). Para la colecta del SML, las medusas se llevaron al laboratorio y se colocaron individualmente en un vaso de precipitado estéril con 200 mL de agua de mar esterilizada. Después de veinte min, el mucus liberado (500 mg por cada medusa) se recogió con una pipeta de transferencia y fue procesado inmediatamente para la extracción de ADN.

Se tomaron muestras de agua de mar del estanque de cultivo, al inicio (n = 6 verano y n = 6 invierno) y al final del tiempo experimental (n = 6 verano y n = 6 invierno). Las muestras de agua de mar se prefiltraron a través de 2,5 µm (Whatman™) para eliminar los desechos grandes, y luego se filtraron con membranas Durapore® (0,45 µm y 0,22 µm), estos dos últimos filtros de cada muestra de agua de mar, se procesaron para la extracción de ADN del agua.

La extracción de ADN de las muestras de SML y agua de mar se llevó a cabo con el DNeasy® Power Biofilm Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La concentración y la calidad del ADN se evaluaron con un BioSpectrometer (Eppendorf).

1.3 Electroforesis en gel de agarosa

Las extracciones de ADN fueron visualizadas mediante geles de agarosa al 1%, y para las amplificaciones de PCR se usó un gel de agarosa al 1.5 % de acuerdo al tamaño de amplificación esperado, en un buffer de corrida TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol 0.25%, glicerol 30% en el colorante fotoreactivo Biotinum®). Para visualizar los ácidos nucleicos y los productos de PCR en el gel de agarosa, se cargaron 5 µl del material genético. La electroforesis se corrió a 80 V durante 40 min para posteriormente visualizarse en un transiluminador.

1.4 Preparación de las bibliotecas 16S ARNr Illumina MiSeq

Se usó la guía Illumina MiSeq para la preparación de las bibliotecas 16S ARNr (disponible: [16S Metagenomic Sequencing Library Preparation \(15044223 B\)](#)) a partir del ADN amplificado por PCR. Se realizó la amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen ribosomal 16S ARN utilizando los cebadores y condiciones sugeridas por Klindworth *et al.* (2013). Los amplicones fueron delimitados por los cebadores:

Oligonucleótido hacia adelante (Forward): 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'

Oligonucleótido reverso (Reverse): 5-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

La mezcla de PCR de cada reacción de 20 µl contenía 2 µl de ADN, 200 U de DreamTaq (ThermoFisher Scientific), 2.5 µl de buffer 10X, 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.4 µl de nucleótidos (dNTP 10 mM), 0.4 µl de cada primer o cebador (forward y reverse). La reacción de PCR se realizó en el termociclador Applied Biosystems (Veriti 96) con una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 25 ciclos de 95 °C (30 s), 55 °C (45 s) y 72 °C (30 s), con una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 1% TAE (Tris-acetato-EDTA). En este paso, el tamaño del amplicón esperado fue de 550 pb.

Para la cuantificación de amplicones se usó 1µl de cada reacción de PCR y se analizó en un chip Bioanalyzer ADN 1000. De este producto de amplificación, se realizó una primera purificación de amplicones con perlas AMPure XP para limpiar las muestras de cebadores, dímeros de cebadores, dNTP, sales y otros contaminantes. Se colocaron los adaptadores Illumina usando el kit Nextera Index. Los índices fueron: Nextera XT Index 1 cebadores (N7XX) y Nextera XT Index 2 cebadores (S5XX):

- Adaptador oligonucleótido hacia Adelante (Forward): 5 '(N) =
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG- [secuencia de locus específica]
- Adaptador cebadores Reverso (Reverse): 5' (S) =
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGGGTATAAGAGACAG- [secuencia locus específica].

De la primera PCR se tomaron 5 µl y se realizó una segunda amplificación con los adaptadores. Las condiciones para este fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 8 ciclos de 95 °C (30 s), 55 °C (30 s) y 72 °C (30 s) y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 4%. Se realizó una segunda purificación de los amplicones, utilizando perlas AMPure XP, la cuantificación del amplicón se realizó con 1 µl de una dilución 1:50 de la biblioteca final de cada muestra y se analizó en el Bioanalyzer ADN 1000. El amplicón esperado para la biblioteca final es de 630 pb. Cada producto de PCR se cuantificó, normalizó y agrupó utilizando el método de cuantificación fluorométrica. El cálculo de la concentración de ADN (nano Molar, nM) se hizo utilizando el tamaño del amplicón medido a través del bioanalizador Agilent Technologies 2100. La concentración final de la biblioteca se diluyó a 4 nM utilizando Tris pH 8,5. Se utilizó una alícuota de 5 µl de una dilución (4 nM) de cada biblioteca y se mezcló (pool) para agrupar bibliotecas con un índice único. Todos los productos de PCR se agruparon a la misma concentración equimolar (4 nM). Para la secuenciación de agrupamientos, se realizó la desnaturalización de la biblioteca con NaOH, también se diluyó con tampón de hibridación y luego se desnaturalizó con calor. Para cada secuencia y rendimiento se incluyó el 5% de PhiX que se utilizó como control interno.

1.5 Análisis bioinformático

Procesamos las lecturas (2 x 250 extremos emparejados) utilizando la plataforma QIIME2 (Caporaso *et al.*, 2010; Bolyen *et al.*, 2019). Tanto las lecturas hacia adelante como las reversas se recortaron en la posición 40 desde el extremo 5' y se truncaron a una longitud de 240 pb. La eliminación de ruido y resolución de los ASVs se hizo con el complemento DADA2 y la eliminación de secuencias quiméricas con el método de "consenso" (Callahan *et al.*, 2016). Para la clasificación taxonómica utilizamos SILVA 132 como base de datos de referencia utilizando el complemento classify-consensus-vsearch (Rognes *et al.*, 2016). Las secuencias representativas se alinearon y enmascararon con MAFFT (Kato y Standley, 2013) y se construyó un árbol filogenético con FasterTree 2 (Price *et al.*, 2010). Los ASVs de cloroplasto y mitocondrias se eliminaron y la tabla de abundancias se exportó al programa R. El análisis estadístico se realizó

con phyloseq (6) utilizando las bibliotecas Vegan (Oksanen *et al.*, 2009) y ggplot2 v3.1.0 (Wickham, 2016).

1.6 Análisis estadísticos

Para analizar la diversidad bacteriana presente dentro de cada muestra individual de SML, la tabla de abundancias se redujo a un esfuerzo de secuenciación de 16,900 recuentos por muestra. Se calculó el índice de diversidad alfa de Shannon y de las especies observadas. Las muestras con menos de 16,900 lecturas se normalizaron mediante el método de escalado de suma acumulativa (CSS) y se usaron solo para calcular la diversidad beta cuando se compararon todas las muestras. Se aplicó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con distancia UniFrac ponderada en el programa R para visualizar variaciones de diversidad beta. Se utilizó un PERMANOVA anidado según la estación y condición para calcular las diferencias significativas entre grupos (control y blanqueadas) utilizando 999 permutaciones. Se utilizó un LEfSe (Análisis Discriminante Lineal del Tamaño del Efecto) para identificar taxones bacterianos con abundancias relativas diferenciales entre estaciones y entre la condición blanqueada, con un límite de $LDA > 2$ y un valor de $p < 0.05$. La densidad de simbioses de medusas control y blanqueadas se evaluó con una prueba ANOVA en SigmaPlot V.12.1.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

1.7 Blanqueamiento experimental de *C. xamachana*

Se obtuvieron con éxito medusas *C. xamachana* blanqueadas mediante la adición de una mezcla de azúcares. Los recuentos celulares mostraron una reducción significativa de la densidad de simbiontes en medusas blanqueadas en verano e invierno después de siete días de tratamiento ($p = 0.001$; Figura 12, Anexo 4.). Después de 14 días, y hasta los 28 días del tratamiento, la densidad de simbiontes se mantuvo baja y constante, con una pérdida total de simbiontes de 84-99% para medusas blanqueadas en verano y 89-99% en invierno. Las medusas control conservaron sus simbiontes después de 28 días (Figura 12). Observamos una disminución del tamaño del paraguas en todas las medusas, posiblemente debido al "efecto estanque" (Figura 13). Los tentáculos de las medusas blanqueadas se revisaron en el microscopio de fluorescencia el día 0 y después de 28 días de tratamiento (Figura 14 A a D); las características fenotípicas mostraron en las medusas control coloración pardusca durante los 28 días de tratamiento (Figura 15 A) y en medusas blanqueadas al día 28, se observó la ausencia del color pardusco que da la presencia de simbiontes (Figura 15 B).

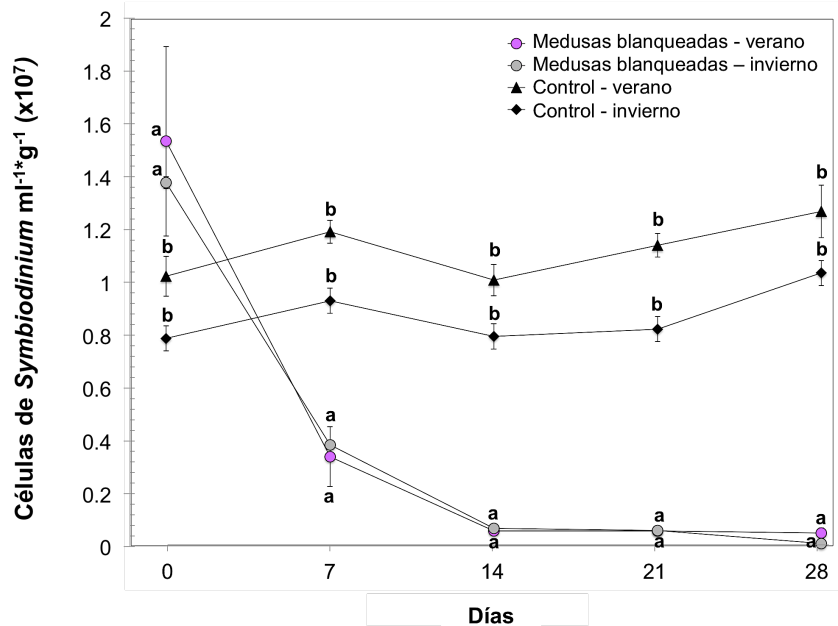


Figura 12. Blanqueamiento experimental y sus efectos sobre la densidad de simbiontes en *C. xamachana*. Las medusas se blanquearon mediante adiciones diarias de una mezcla de azúcares (ver Métodos). La gráfica muestra la densidad de células simbiontes (células $\text{ml}^{-1}\text{g}^{-1}$) en medusas tratadas durante 28 días en verano (círculos rosas) e invierno (círculos grises); medusas control en verano (triángulos cerrados) e invierno (diamantes cerrados). Valores expresados como la media \pm s.e.m. Las letras **a** y **b** muestran diferencias significativas entre la densidad de simbiontes de medusas blanqueadas frente a las medusas control.

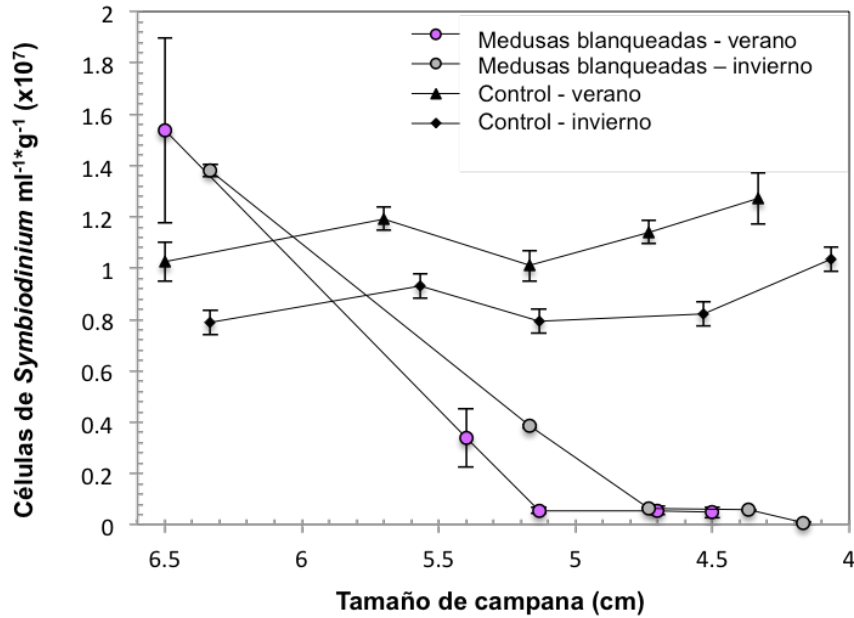


Figura 13. Gráfico de la densidad celular de simbiontes y talla de medusas *C. xamachana*. Se observa el tamaño promedio de campana (cm) de las medusas, graficado contra la densidad de simbiontes, durante los 28 días de tratamiento. La gráfica muestra la densidad de células simbiontes (células ml⁻¹·g⁻¹) en medusas tratadas durante 28 días en verano (círculos rosas) e invierno (círculos grises); medusas control en verano (triángulos cerrados) e invierno (diamantes cerrados).

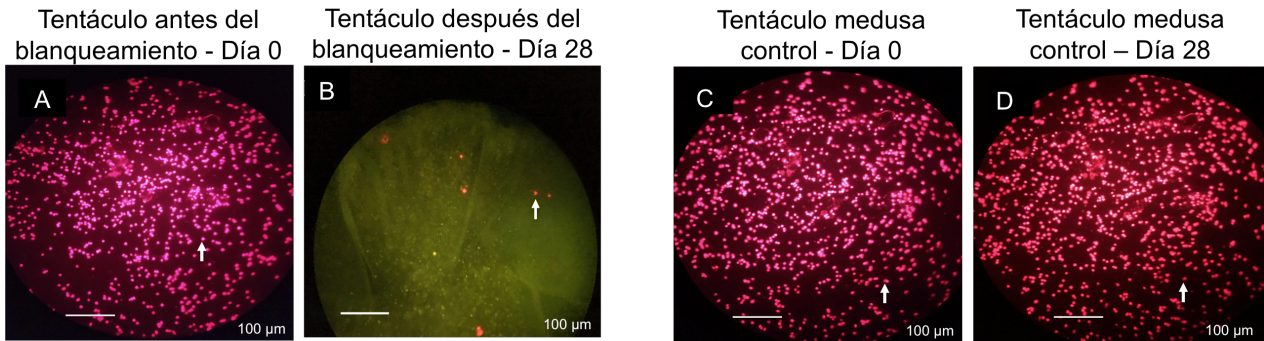
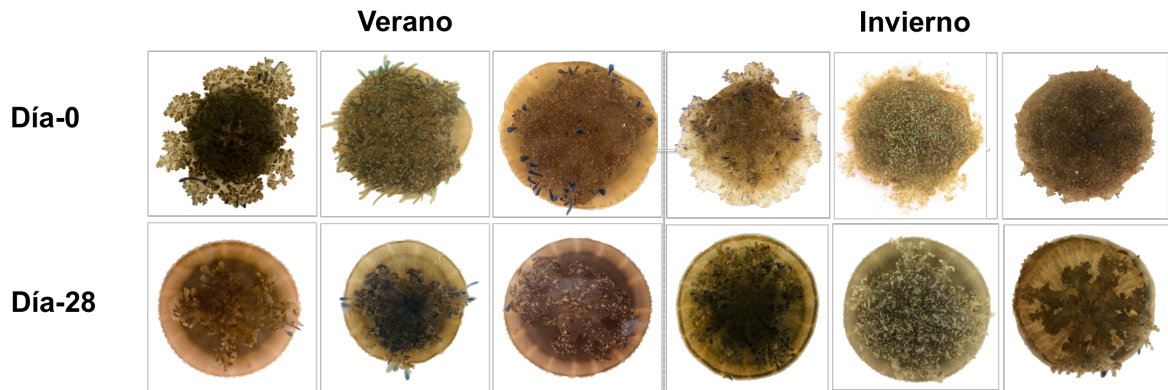


Figura 14. Imágenes de microscopía de fluorescencia de tentáculos de *C. xamachana*. Se observa la fluorescencia de simbiontes al inicio **A** (día 0) y al final del tratamiento blanqueado **B** (día 28). **C**: Densidad de simbiontes en medusas control al día 0 y al final del experimento al día 28 **D**: Las flechas blancas indican células simbiontes en tentáculos del hospedero, las barras de escala son de 100 μm.

A) Medusas control



B) Medusas blanqueadas

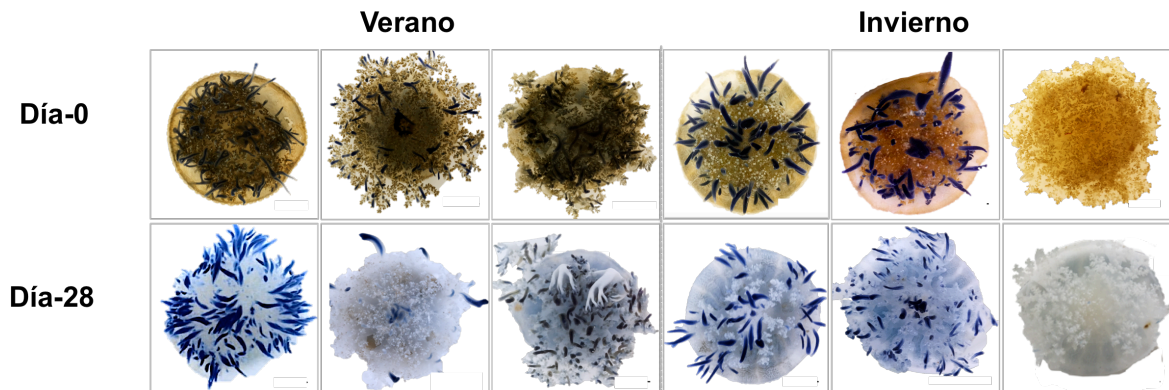


Figura 15. Fotografías de la respuesta fenotípica de las medusas antes del tratamiento con azúcares y medusas control. (A) Fotografías de medusas control al día 0 y día 28 en verano e invierno, se observa el color pardusco en medusas control. **(B)** Se observan medusas color pardusco en el día 0 y después de 28 días se observan medusas con ausencia de color pardusco (blanqueadas) en dos estaciones del año verano e invierno.

1.8 Extracción de ADN bacteriano del mucus en *C. xamachana* y de agua de mar y amplificación mediante PCR punto final de las regiones V3 y V4 del gen 16S ARNr

Se extrajo ADN del mucus en medusas blanqueadas y control (n=9 verano, n=9 invierno), así como ADN en muestras de agua (Figura 16 A y B).

(A) ADN del mucus y agua de mar - verano



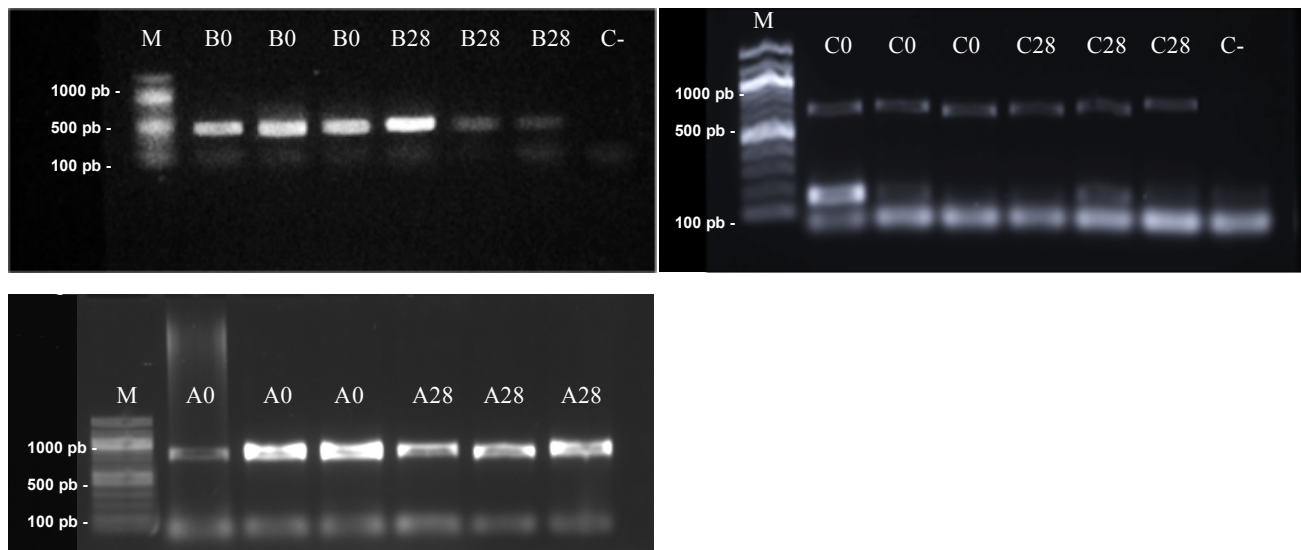
(B) ADN del mucus y agua de mar - invierno



Figura 16. ADN bacteriano del mucus de *C. xamachana* y de muestras de agua. (A y B) Gel de agarosa en donde se observa en cada carril el ADN extraído del mucus en medusas blanqueadas y control, así como de muestras de agua de mar en verano (A) e invierno (B). Cada carril representa el ADN de mucus extraído de cada medusa y muestra de agua de mar colectadas en verano e invierno.

Se amplificaron las regiones variables V3 y V4 del gen 16S ARNr para muestras de mucus de medusas blanqueadas, control y agua de verano e invierno (Figura 17 A y B). El tamaño del amplicón para cada muestra fue de 550 pb.

(A) PCR de la región V3-V4 del gen 16S ARNr - verano



(B) PCR de la región V3-V4 del gen 16S ARNr - invierno

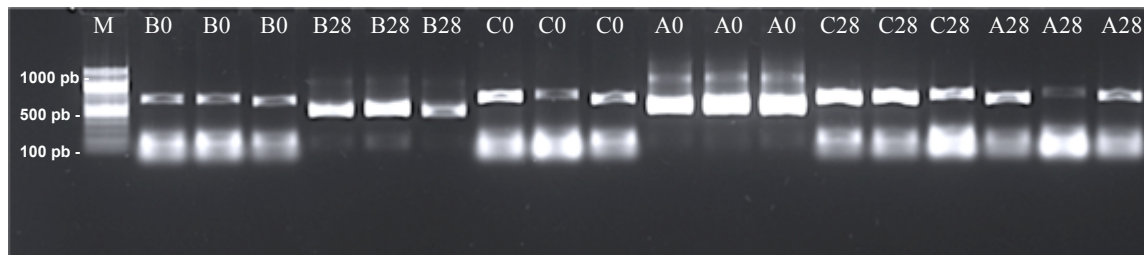


Figura 17. PCR. Amplificación de las regiones V3 y V4 del gen ribosomal 16S ARNr. (A y B) Se muestran los productos de amplificación del ADN extraído del mucus de *C. xamachana* antes del blanqueamiento (B0) y blanqueadas (B28), así como de las muestras de agua de mar en verano e invierno (A0 y A28); C-: control negativo y M: marcador molecular.

1.9 Composición y diversidad de la comunidad bacteriana del mucus

Se secuenciaron un total de 24 muestras de mucus. En verano (n=3 B-0, n=3 B-28, n=3 C-0 y n=3 C-28) e invierno (n=3 B-0, n=3 B-28, n=3 C-0 y n=3 C-28) y 12 muestras de agua de mar. En verano (n=3 A0, n=3 A-28) e invierno (n=3 A-0 y n=3 A-28). El análisis del complemento DADA2 resolvió 13,500 ASVs (variantes de secuencias de amplicones). La secuenciación dio como resultado 1,611,190 lecturas de secuencias de alta calidad (Tabla 4). Se asignaron un total de 610,883 lecturas para agua de mar y 1,000,307 lecturas para muestras de mucus, con 12,654 ASVs afiliados al dominio Bacteria, los ASVs con una abundancia relativa igual o inferior al 1 % se agruparon en “Otros”.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) indicó un agrupamiento diferencial de ASVs de muestras de mucus control (Ctrl) y blanqueadas (Bleach) en comparación con las muestras de agua de mar (Figura 18). Por lo tanto, las muestras de agua de mar se excluyeron de los análisis posteriores para enfatizar las diferencias a escala fina de los ASVs asociados con el mucus de las medusas.

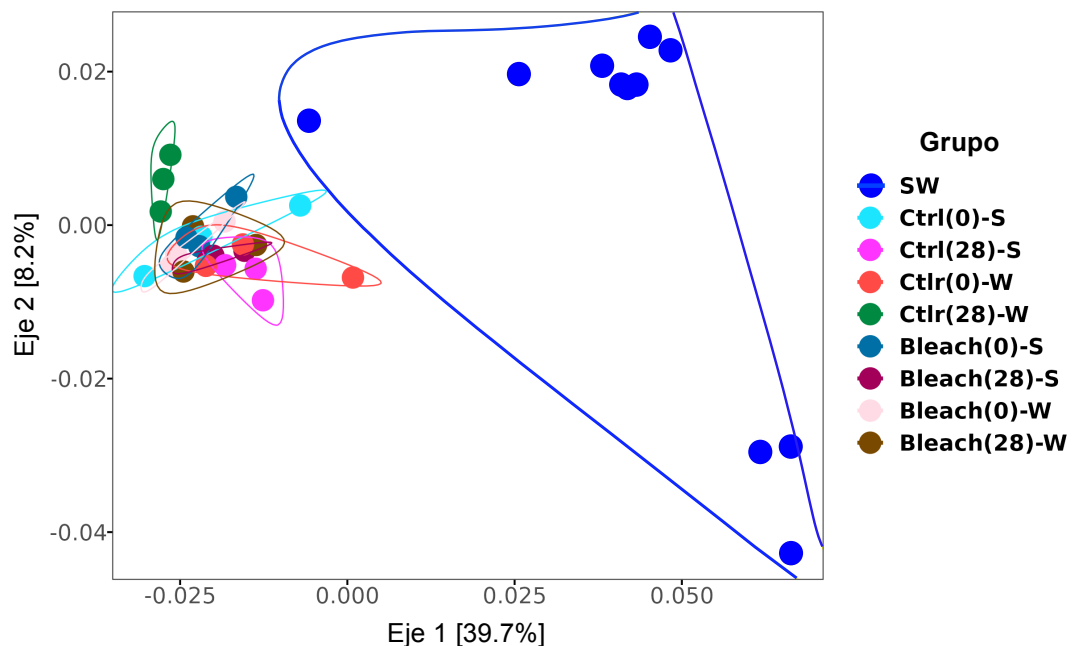


Figura 18. Gráfico de coordenadas principales (PCoA) con la distancia Unifrac ponderada de muestras de mucus y agua de mar. El análisis indicó diferentes agrupamientos entre muestras de mucus (Bleach y Ctrl) con muestras de agua de mar (SW), de verano (S) e invierno (W). Al aumentar la distancia entre puntos se presenta una disminución de la similitud. Los polígonos denotan grupos de muestras formados. Cada círculo representa una sola muestra y el mismo color es una réplica.

El análisis de PCoA de muestras control (Ctrl) y medusas blanqueadas (Bleach) en el día 0 mostró una distancia cerrada entre réplicas en ambas temporadas, excepto para los controles de invierno (Figura 19). Las muestras control a los 28 días se agruparon entre verano e invierno, respectivamente, mientras que las medusas blanqueadas formaron un grupo cercano (Figura 19). Este análisis sugirió el efecto de la estación en las medusas control y el efecto de la condición simbiótica después de 28 días. Las medusas control en ambas estaciones mostraron un número similar de ASV observados y parámetros de diversidad alfa (Figura 20, Tabla 4). Después de 28 días, las medusas blanqueadas en ambas temporadas tuvieron un menor número de ASV observados y parámetros de diversidad alfa (Figura 20, Tabla 4).

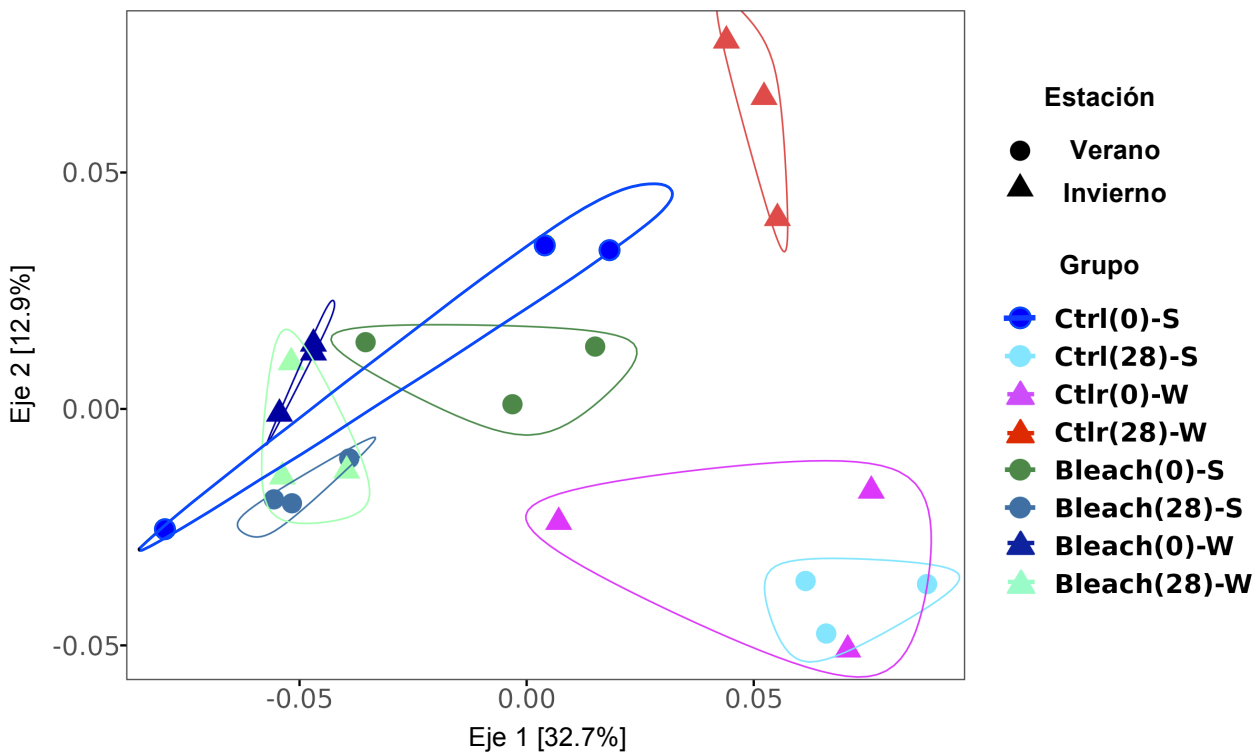


Figura 19. Gráfico de coordenadas principales (PCoA) con la distancia Unifrac ponderada de muestras de mucus de medusas control (Ctrl) y blanqueadas (Bleach) en verano (S) e invierno (W). El aumento de la distancia entre los puntos equivale a la disminución de la similitud. Los polígonos denotan grupos de muestras formadas. Los círculos representan una sola muestra de verano y los triángulos representan una sola muestra de invierno, el mismo color es una réplica.

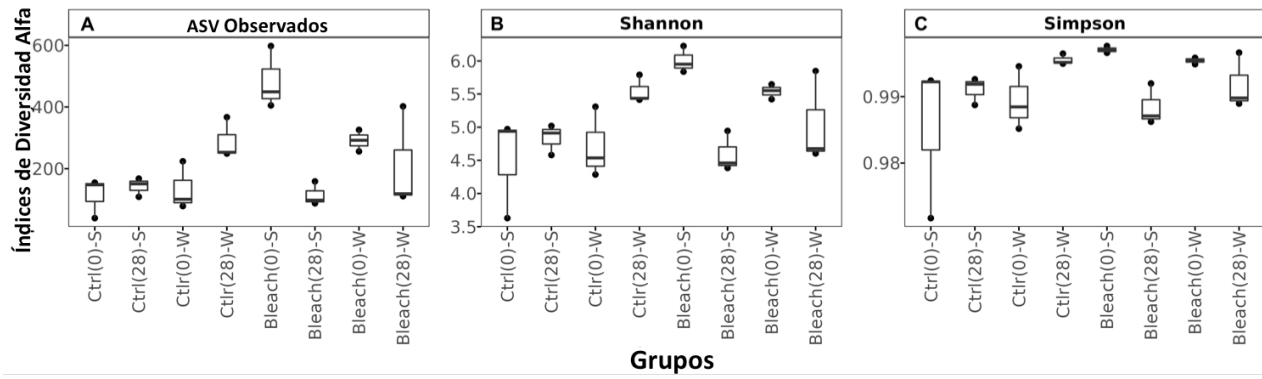


Figura 20. Diagrama de caja que muestra las métricas de diversidad alfa y ASV observados. (A) Número de ASV observados, **(B)** índices de diversidad de Shannon (H') y **(C)** Simpson de la comunidad bacteriana en muestras de mucus de medusas de control (Ctrl) y blanqueadas (Bleach) en verano (S) e invierno (W). Los valores son de 3 repeticiones por condición y tiempo de muestra (al inicio (0) y al final (28) después de 28 días).

Tabla 4. Métricas de diversidad alfa. Taxones bacterianos observados (ASVs), diversidad de Shannon (H') y Simpson (D_s) de la comunidad bacteriana del mucus en medusas control y blanqueadas. Valores expresados en el error estándar de la media (mean \pm s.e.m).

Estación /Condición	Lecturas (Reads)	ASVs	Shannon index (H')	Simpson index (D)
Verano				
Blanqueadas (día-0)	80,321 \pm 46,373	496 \pm 286	6.05 \pm 3.49	0.997 \pm 0.5776
Blanqueadas (día-28)	75,419 \pm 43,543	116 \pm 67	4.62 \pm 2.66	0.988 \pm 0.571
Control (día-0)	13,177 \pm 7,608	114 \pm 66	4.52 \pm 2.61	0.985 \pm 0.569
Control (día-28)	13,434 \pm 7756	142 \pm 82	4.85 \pm 2.8	0.991 \pm 0.572
Invierno				
Blanqueadas (día-0)	84,968 \pm 49057	291 \pm 168	5.57 \pm 3.21	0.995 \pm 0.575
Blanqueadas (día-28)	46,601 \pm 26905	210 \pm 122	5.07 \pm 2.92	0.992 \pm 0.573
Control (día-0)	9,734 \pm 5620	134 \pm 78	4.72 \pm 2.72	0.989 \pm 0.571
Control (día-28)	9,779 \pm 5646	289 \pm 167	5.56 \pm 3.21	0.995 \pm 0.575
Agua de mar	55,534 \pm 32063	737 \pm 426	6.32 \pm 3.64	0.997 \pm 0.576

1.10 Estructura de la comunidad bacteriana por condición simbiótica y estación

Gammaproteobacteria, Bacteroidia y Alphaproteobacteria fueron las clases dominantes en todas las muestras de mucus analizadas; sin embargo, la clase Gammaproteobacteria fue más abundante en las medusas blanqueadas después de 28 días (Figura 21). Se observaron diferencias importantes en la composición bacteriana del mucus en las medusas blanqueadas al día 28 en ambas estaciones, donde se enriquecieron la familia Vibrionaceae y el género *Vibrio*, con mayor abundancia en verano (Figura 22 y 23).

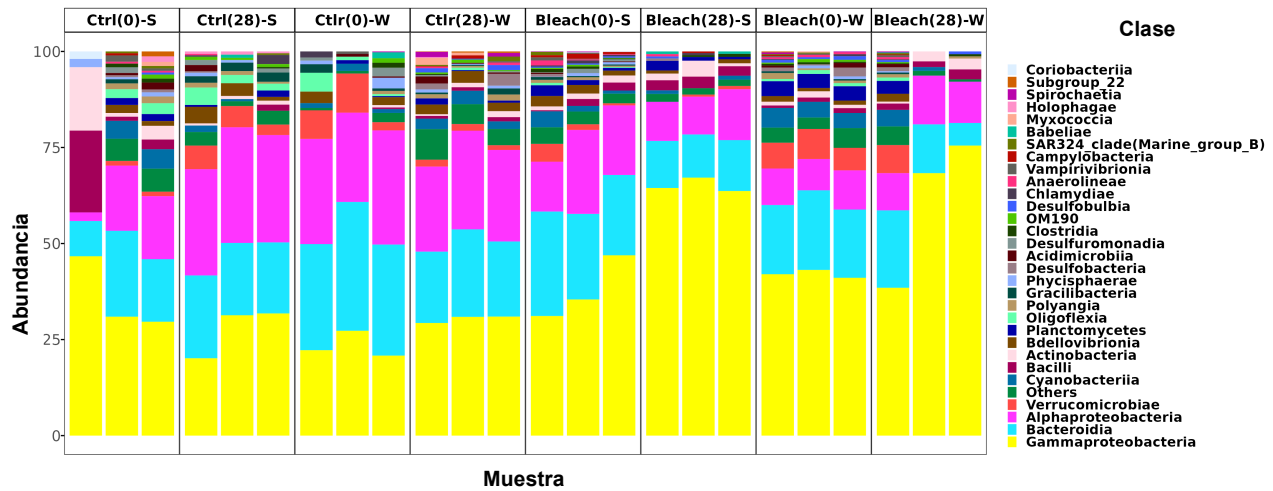


Figura 21. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de clase. Se observan las clases de bacterias más abundantes en muestras de mucus de verano (S) e invierno (W) al inicio (día 0) y final (día 28) de tratamientos.

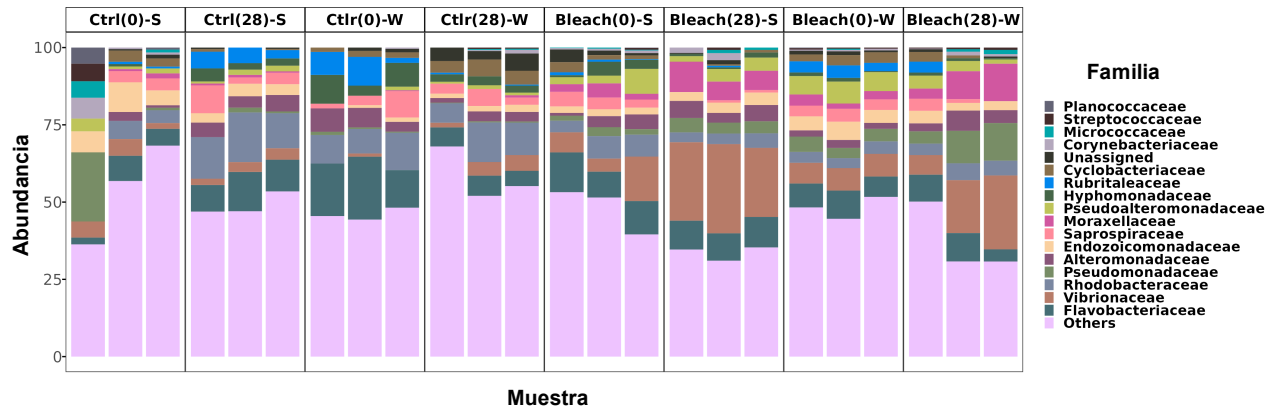


Figura 22. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de familia. Se observan las familias de bacterias más abundantes en muestras de mucus en verano (S) e invierno (W) al inicio (día 0) y final (día 28) de tratamientos.

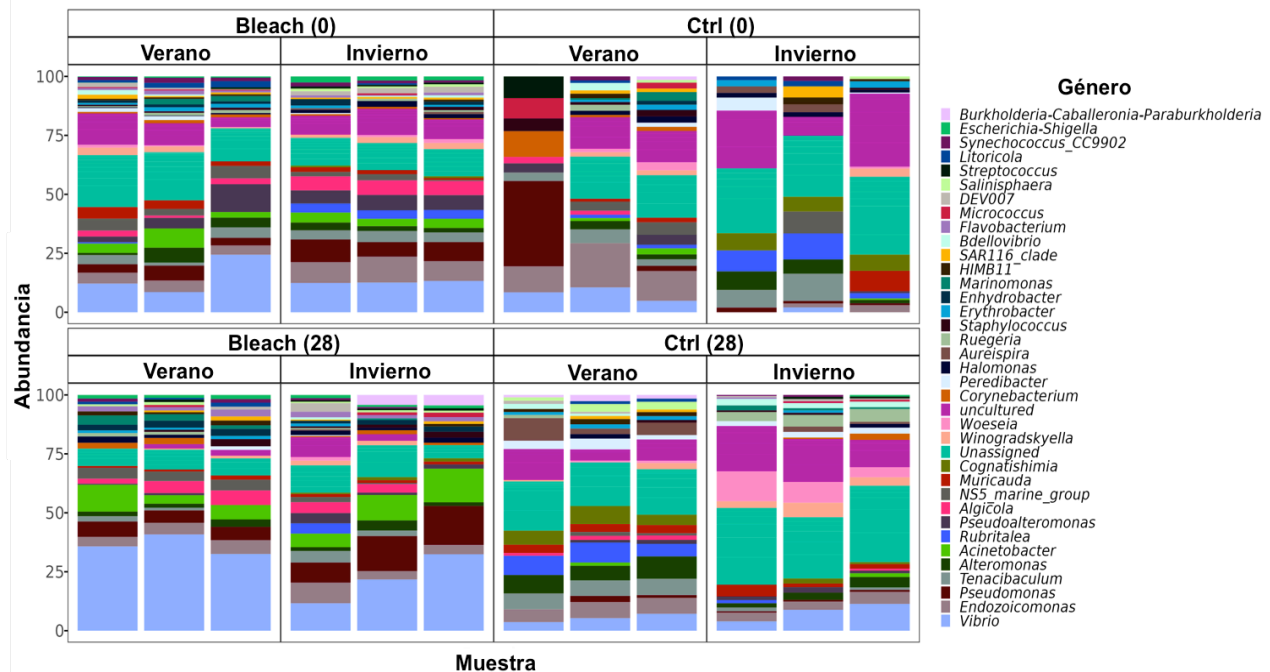


Figura 23. Composición taxonómica de las bacterias a nivel de género. Los gráficos de barras muestran la composición bacteriana en el mucus de todas las muestras (medusas control y blanqueadas, en los días 0 y 28) en verano e invierno. Los 40 géneros más abundantes fueron graficados y distinguidos por color.

El análisis del tamaño del efecto discriminante lineal (LEfSe) identificó inicialmente en las medusas blanqueadas a los géneros bacterianos *Endozoicomonas*, *Tenacibaculum* y otros 21 géneros como significativamente diferentes, pero después de 28 días, los géneros diferencialmente abundantes fueron *Vibrio*, *Sphingobium* y *Simiduia* (puntuación LDA > 2, $p < 0,05$) (Figura 24 A). Las diferencias detalladas en la abundancia relativa de géneros bacterianos que fueron significativamente diferentes en las medusas blanqueadas entre el día 0 y el día 28 corroboraron fueron en particular para los géneros más abundantes *Endozoicomonas* y *Tenacibaculum* (Figura 24 B). Las estaciones también dieron como resultado diferencias significativas, aunque los géneros fueron diferentes de los que dominaron en las medusas blanqueadas; en verano los géneros dominantes fueron *Pir4_lineage*, *Rheinheimera*, *Sphingomonas*, entre otros, y en invierno los géneros dominantes fueron *Pseudoalteromonas*, *Enhydrobacter*, *Acinetobacter* entre otros (puntaje LDA > 2, $p < 0,05$) (Figura 25 A), mostrando diferencias en la abundancia relativa según la estación (Figura 25 B).

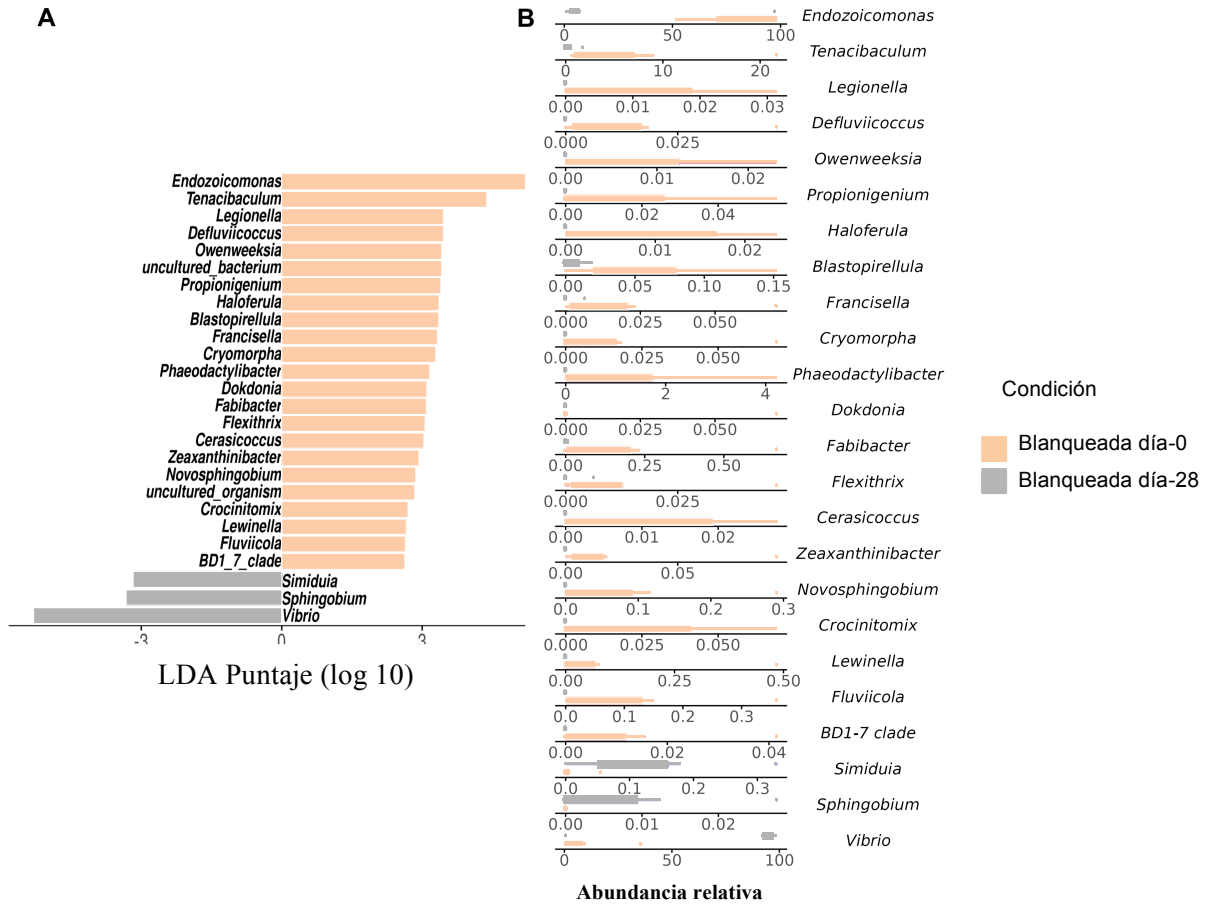


Figura 24. Análisis discriminante lineal (LEfSe, en inglés) a nivel de género por condición simbiótica. El análisis muestra géneros que fueron significativamente diferentes en abundancia en medusas blanqueadas día 0 (barras beige) y blanqueadas día 28 (barras grises) (puntaje LDA > 2, $p < 0.05$). Las columnas horizontales representan la abundancia relativa de bacterias que fueron significativamente diferentes entre las condiciones simbióticas.

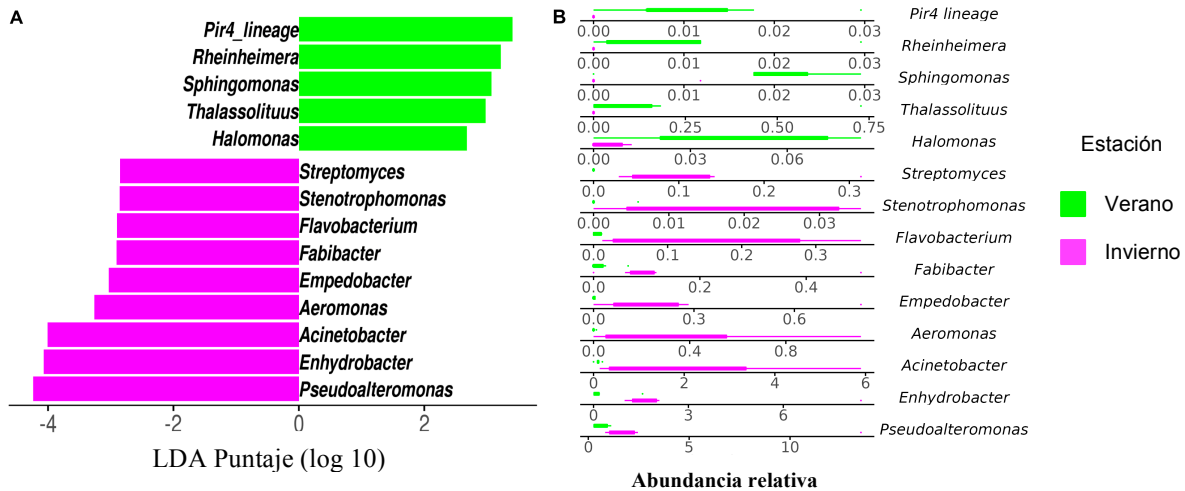


Figura 25. Análisis discriminante lineal (LEfSe, en inglés) a nivel de género por estación. El análisis muestra géneros que difieren significativamente en abundancia en muestras de mucus verano (barras verdes) e invierno (barras rosa) (puntuación LDA > 2; $p < 0,05$).

El análisis PERMANOVA por pares indicó diferencias significativas en la composición bacteriana de las medusas blanqueadas en muestras de mucus del día 0 y el día 28, independientemente de la temporada ($F = 5,424345$, $p = 0,0318$; Tabla 5). Además, este análisis indicó que las medusas control y blanqueadas el día 28 fueron significativamente diferentes ($F = 6,591283$, $p = 0,0078$; Tabla 5). El análisis de covariables PERMANOVA mostró que la condición blanqueada fue significativamente importante en la estructuración de la comunidad bacteriana en el mucus de *C. xamachana* ($F = 5.8289$, $p = 0.001$), aunque la estación también presentó un valor significativo ($F = 3.2240$, $p = 0.017$; Tabla 6).

Tabla 5. Análisis PERMANOVA de la comunidad bacteriana del mucus en medusas blanqueadas y control.

Pares	F. Modelo	R2	p. valor	p. ajustado	sig.
1. Blanqueadas (0) vs Blanqueadas (28)	5.424345	0.3516743	0.0106	0.0318	.
2. Blanqueadas (0) vs Control (28)	2.815415	0.2196897	0.0062	0.0186	.
3. Blanqueadas (28) vs Control (28)	6.591283	0.3972738	0.0026	0.0078	*
Total		1.0900198			

Códigos de significancia: 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’

Tabla 6. Análisis PERMANOVA por covarianza basado en la matriz de distancia filogenética de los datos de la comunidad bacteriana por condición simbiótica y estación.

	Df	Sums Of Sqs	Mean Sqs	F. Modelo	R2	p-value
Condición	2	0.22208	0.111038	5.8289	0.40364	0.001 **
Estación	1	0.06142	0.061416	3.2240	0.11163	0.017 •
Residuales	14	0.26669	0.019050		0.48473	
Total	17	0.55019			1.00000	

Códigos de significancia: 0.001 ‘***’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘•’

DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA

Las medusas *C. xamachana* albergan naturalmente algas simbióticas y se asocian con una comunidad bacteriana que habita en la capa superficial de mucus. En el presente trabajo, se estudió esta comunidad bacteriana comparando medusas simbióticas y blanqueadas en dos estaciones del año. Las medusas blanqueadas se obtuvieron mediante la adición de una mezcla de azúcar lábil (Pogoreutz *et al.*, 2017). Como han reportado otros estudios, la interrupción de la relación simbiótica en los corales por el aumento de la carga de carbono orgánico está bien establecida, observándose la expresión de genes de virulencia bacteriana y la formación de una capa hipóxica en la superficie del coral (Vega-Thurber *et al.*, 2009). También se ha demostrado que los niveles elevados de carbono orgánico disuelto (DOC) (p. ej., 25 mg L⁻¹) aceleran las tasas de crecimiento bacteriano asociadas con el SML de los corales, lo que podría alterar el equilibrio de la comunidad microbiana (Kline *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio experimental mostró que la comunidad bacteriana de los fragmentos de coral tratados con niveles enriquecidos de DOC (por ejemplo, 10 mg L⁻¹), se mantuvo estable después de 28 días, no mostró un aumento de bacterias virulentas, pero causó blanqueamiento de los fragmentos de coral (Pogoreutz *et al.*, 2017); estos autores también observaron la proliferación de diazótrofos. En nuestro estudio, al usar una concentración más baja de DOC (0.3 mg L⁻¹) también inducimos el blanqueamiento de las medusas pero quizás con efectos más leves sobre la comunidad bacteriana asociada al SML. No está claro si las adiciones moderadas de carbono lábil pueden promover la abundancia de grupos bacterianos específicos que pueden provocar cambios en los miembros clave de esta comunidad (Kline *et al.*, 2006, Vega Thurber *et al.*, 2009). Por ejemplo, las especies de *Vibrio* dispersan mucho su abundancia durante los eventos de blanqueamiento de corales y se vuelven dominantes (Bourne *et al.*, 2007; Tout *et al.*, 2015; McDevitt-Irwin *et al.*, 2017), posiblemente debido a una reducción de la actividad antibiótica de las bacterias encontradas en el mucus de los corales (Ritchie, 2006), y la capacidad de *Vibrio* para utilizar una amplia variedad de azúcares (Lee *et al.*, 2016). Además, un estudio de la medusa *Aurelia aurita* informó un aumento de la bacteria Vibrionaceae al final de la floración de la medusa (Kramar *et al.*, 2019). Más aún, los grupos bacterianos asociados con los corales que potencialmente fijan nitrógeno (diazótrofos) son comunes y diversos. Estos pueden incluir especies de Cianobacterias, Alfaproteobacterias y Deltaproteobacterias (Olson *et al.*, 2009).

Aunque nuestros resultados mostraron la presencia de estas bacterias, para distinguir mejor a los diazotrofos habría sido necesario un estudio específico de los genes *nifH*, considerando que dichos genes se correlacionan con la presencia de algas simbiotes (Olson *et al.*, 2009).

Las medusas blanqueadas mostraron una menor diversidad de taxones bacterianos, de acuerdo con los informes en corales bajo estrés (McDevitt-Irwin *et al.*, 2017). En nuestros resultados, las medusas muestreadas durante el verano mostraron una disminución de la diversidad bacteriana después de 28 días de incubación, pero durante el invierno, la diversidad se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del tiempo. Esto contrasta con los resultados informados por Pogoreutz y colaboradores (2017) en corales expuestos a DOC alto, donde observaron una disminución general de la diversidad bacteriana con el tiempo. Nuestros resultados indicaron el predominio de Gammaproteobacteria, Bacteroidia y Alphaproteobacteria en todas las muestras de mucus. Las especies de medusas de Indonesia, como *Mastigias papua* y *Tripedalia cystophora*, también se caracterizaron por presentar una mayor abundancia de la clase Gammaproteobacteria en las medusas blanqueadas y el abundante género *Endozoicomonas* (Cleary *et al.*, 2016). Sin embargo, *Rhizosotma pulmo*, una medusa endémica y común del mar Mediterráneo, tiene una comunidad bacteriana completamente diferente a la que observamos en *C. xamachana*, incluso a nivel de Phylum (Cleary *et al.*, 2016). Kelly y colaboradores (2014) encontraron que los arrecifes de coral dominados por algas del Pacífico se correlacionan con una mayor abundancia de Gammaproteobacteria (como Alteromonadales, Psuedomonadales y Vibrionales), Betaproteobacteria y Bacterioidetes; mientras que los arrecifes con una alta cobertura de coral se correlacionan con una mayor abundancia de alfafroteobacterias (como Rhodobacterales y Sphingomonadales). Se han obtenido resultados similares para invertebrados de arrecife simbióticos y no simbióticos, los primeros albergan Gammaproteobacteria y los últimos Alphaproteobacteria (Bourne *et al.*, 2013). Estas mismas clases de bacterias se han identificado en la cavidad gástrica de otras medusas marinas no simbióticas y se ha informado que tienen potencial en biorremediación (Tinta *et al.*, 2019).

La abundancia de *Endozoicomonas* en el mucus de las medusas control y blanqueadas en el día 0 que encontramos es consistente con estudios previos que reportan una alta frecuencia de este género y con la mayor abundancia entre los corales formadores de arrecifes (Bayer *et al.*, 2013;

Glasl *et al.*, 2016; Neave *et al.*, 2017; Pogoreutz *et al.*, 2017). Sin embargo, Shiu y colaboradores (2020) indicaron que la abundancia relativa de *Endozoicomonas* en corales, generalmente disminuye con el blanqueamiento inducido por el calor, y tal vez se correlacione positivamente con la abundancia de Symbiodiniaceae. No está claro si este fenómeno de disminución de la abundancia de *Endozoicomonas* es causado por estrés térmico o por una disminución de la abundancia de Symbiodiniaceae. En este sentido, nuestros resultados también sugieren una correlación de *Endozoicomonas* con la presencia de simbiontes y en ausencia de estrés por calor. Además, *Endozoicomonas* ha sido reconocida como un importante género bacteriano común, extremadamente flexible y diverso, asociado con una gran variedad de organismos marinos (Jensen *et al.*, 2010; Morrow *et al.*, 2012; Forget y Juniper, 2013; Fiore *et al.*, 2015; Katharios *et al.*, 2015; Neave *et al.*, 2016). Aunque su papel aún no está claramente definido, se ha propuesto que algunas de sus funciones están relacionadas con la adquisición de nutrientes así como en el reciclaje de carbono y nitrógeno (Morrow *et al.*, 2015), la producción de antibióticos y la estructuración de la microbiota (Bayer *et al.*, 2013a; Jessen *et al.*, 2013; Rua *et al.*, 2014). *Endozoicomonas* también se ha encontrado en alta abundancia y se ha asociado con otras medusas marinas no simbióticas, siendo considerada para su posible aplicación en biotecnología y como candidata para estudios en aplicaciones probióticas (Mansson *et al.*, 2011; Radjasa *et al.*, 2007; Deering *et al.*, 2016; Viver *et al.*, 2017; Tinta *et al.*, 2019).

El blanqueamiento experimental de *C. xamachana* fue difícil de lograr. Inicialmente probamos diferentes métodos de blanqueamiento (baja temperatura, mentol, adición de DCMU) con poco éxito; las medusas perdían una cantidad considerable de masa o morían. La adición de azúcares provocó con éxito la pérdida de algas simbiontes y, aunque los animales perdieron masa ($\approx 30\%$), se mantuvieron vivos y activos. Pero la adición de azúcares tiene la desventaja de alterar la comunidad bacteriana asociada, lo que aumenta la abundancia de diazótrofos (Pogoreutz *et al.*, 2017), lo que podríamos haber calificado como un aumento en la abundancia relativa de *Vibrio*. Sin embargo, la abundancia relativa de *Vibrio* también aumenta con el deterioro ambiental y la condición de blanqueamiento (Vega-Thurber *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2014). Un método de blanqueamiento diferente podría ayudar a distinguir entre estos dos factores (falta de simbiontes y adición de azúcar), pero es un desafío metodológico. Considerando que (1) usamos una baja concentración de azúcares para el blanqueamiento experimental de las medusas, y (2) nuestros

resultados mostraron un efecto significativo de la pérdida de simbioses en la comunidad bacteriana asociada, podemos sugerir que la estructuración de la comunidad bacteriana asociada se ve significativamente afectado por la presencia de simbioses.

La comunidad bacteriana de medusas como *C. xamachana* y otros organismos modelo simbióticos solo ha comenzado a estudiarse en los últimos años. Algunos estudios han intentado demostrar la cooperación entre los microorganismos asociados y que el hospedero puede seleccionarlos (Fraune *et al.*, 2015; Har *et al.*, 2015). En nuestro estudio, el estrés del blanqueamiento fue inevitable, pero aún falta evidencia experimental que vincule factores específicos y la reducción de *Endozoicomonas* durante el blanqueamiento. En general, los estudios sobre las capacidades funcionales de la comunidad bacteriana del mucus de *C. xamachana* pueden ayudar a comprender las funciones específicas de ciertos miembros de esta comunidad que cambian en respuesta a la pérdida de simbioses, y cómo el huésped impulsa su adaptación a nuevos estados (condiciones no simbióticas). Estudios similares han identificado otras familias dominantes como Moraxellaceae y Pseudomonadaceae en *C. xamachana* cuando las condiciones de nitrógeno no son limitantes para las microalgas simbioses (Röthig *et al.*, 2021). Aparentemente, las bacterias asociadas participan en la eliminación de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) para superar la limitación de nitrógeno de las algas simbióticas, un mecanismo que se ha propuesto para ayudar a estabilizar la relación huésped-alga (Röthig *et al.*, 2021). Sin embargo, los estudios funcionales de los miembros bacterianos ayudarán a comprender cómo los factores biológicos, como las alteraciones de los simbioses de algas, pueden interactuar con esta comunidad y el papel clave de la actividad fotosintética de Symbiodiniaceae en el mantenimiento de la comunidad bacteriana, como se informó anteriormente (Littman *et al.*, 2011).

Algunos miembros bacterianos en el mucus de *C. xamachana* se enriquecieron en taxones específicos en cada estación (verano e invierno, ver análisis LDA). Los estudios confirman que las fluctuaciones estacionales incluyen cambios en la fisiología del huésped asociado, en los meses de bajas temperaturas del mar (invierno); se ha documentado que corales como *Astrangia poculata* disminuyen sus funciones metabólicas (Grace, 2017). A medida que aumentan las temperaturas, se reanuda la actividad metabólica del holobionte, como ocurre en los corales tropicales (Mouchka *et al.*, 2010; Zaneveld *et al.*, 2016; Sharp *et al.* 2017). En verano, el holobionte de coral consume más

alimentos y posiblemente suministre más sustratos que promuevan el crecimiento bacteriano luego de una reestructuración de los miembros bacterianos (Burmester *et al.*, 2017; Grace, 2017). La variación en ciertos grupos bacterianos por estacionalidad sugiere que las comunidades bacterianas experimentan una sucesión; es decir, pueden ocurrir cambios en la comunidad bacteriana durante los meses más fríos del invierno, seguidos de una reestructuración de la comunidad bacteriana en el verano.

CONCLUSIÓN

Confirmamos que la adición de azúcares tiene un potencial considerable como método para el blanqueamiento rápido y efectivo en *C. xamachana*. Observamos cambio en la estructura de la comunidad bacteriana en la transición de la condición simbiótica a la blanqueada que ocurrió en 28 días. *Endozoicomonas* fue el género más abundante en las medusas control y blanqueadas en el día 0; sin embargo, no está claro si la adición de DOC, o la pérdida del simbiote, o ambos, fueron significativos para provocar el cambio de la comunidad bacteriana en la condición blanqueada, reduciendo la abundancia de *Endozoicomonas* y aumentando la abundancia de *Vibrio*. Aunque los cambios estacionales mostraron diferencias en la composición de taxones bacterianos específicos, nuestros datos sugieren que las fluctuaciones estacionales no causaron variaciones significativas en los miembros bacterianos dominantes; tales cambios se asociaron mejor con la presencia de simbioses. A nivel de clase, las bacterias en el mucus de *C. xamachana* fueron similares a las clases de bacterias que se encuentran en otras medusas rizostomas simbióticas tropicales y en los corales formadores de arrecifes, dominados principalmente por Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria. Los estudios futuros en este organismo modelo pueden aclarar el papel de los simbioses en el impulso de la estabilidad de la comunidad bacteriana asociada. Dichos estudios también pueden ayudar a comprender los cambios en la comunidad bacteriana asociada de cnidarios simbióticos que experimentan fluctuaciones estacionales y eventos de blanqueamiento, provocados por la temperatura del agua del mar, los niveles de nutrientes y el cambio climático, todos asociados con enfermedades y mortalidad en los corales simbióticos.

CAPÍTULO II. EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y GLICEROL

MÉTODOS

2.1 Identificación de ARN mensajeros que codifican para proteínas transportadoras *GLUT* y *AQGP* en el transcriptoma de *C. xamachana*

Se seleccionaron secuencias de nucleótidos reportadas en la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information, en Inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de genes que codifican a las proteínas transportadoras de glucosa (*GLUT*) (Tablas 7 y 8) y glicerol (*AQGP*) (Tablas 9 y 10) en cnidarios. Usando como referencia estas secuencias de genes de proteínas transportadoras identificadas, mediante un alineamiento **BLAST+** (por sus siglas en Inglés, Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local) (Altschul *et al.*, 1997), se hizo una búsqueda de secuencias codificantes de proteínas transportadoras de glucosa y glicerol dentro del transcriptoma de *C. xamachana* ubicado en la base de datos *Cassiopea_dovetail* del laboratorio de la Dra. Mónica Medina, Penn State University.

El alineamiento con el genoma de *C. xamachana* indicó secuencias que corresponden a genes que codifican para proteínas transportadoras de glucosa y glicerol. Se identificaron 2 secuencias que corresponden a genes de *GLUT-1*, una secuencia del gen *GLUT-10*, 4 secuencias del gen *GLUT-3*, una secuencia del gen *GLUT-8*, 3 secuencias del gen *AQGP*. De estos genes, se seleccionó una secuencia para *GLUT-3* (>TRINITY_DN109051), una secuencia para *GLUT-8* (Transcript (3204 bp)/CDS Sequence (1545 bp)), y dos secuencias para el gen *AQGP-9* (Transcript (807 bp)/CDS Sequence (807 bp); Transcript (945 bp)/CDS Sequence (945 bp)). A partir de estas secuencias, se hizo un alineamiento **BLAST** (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con secuencias de transportadores *GLUT* y *AQGP* en otros cnidarios y se tomó como base un porcentaje de identidad mayor al 50% entre secuencias para cada tipo de transportador (Tablas 7, 8, 9 y 10).

Tabla 7. Identidad de secuencias de los miembros de la familia 2 - transportadores facilitadores de glucosa tipo **GLUT-3** en cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>GLUT-3</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	3e-178	56.18 %	XP_002162640.3
<i>GLUT-3</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	6e-173	54.43%	XP_002162640.3
<i>GLUT-1</i>	<i>Exaiptasia diaphana</i>	2e-166	53.79%	XP_020913744.1
<i>GLUT-3</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	2e-160	53.47%	XP_031554417.1
<i>GLUT-3</i>	<i>Orbicella faveolata</i>	6e-126	51.86%	XP_020601657.1
<i>GLUT-1</i>	<i>Acropora millepora</i>	4e-139	51.54%	XP_029212627.1
<i>GLUT-3</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	1e-138	51.44%	PFX31912.1
<i>GLUT-1</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	2e-138	51.44%	XP_022780136.1
<i>GLUT-1</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	6e-150	51.10%	XP_027046866.1

Tabla 8. Identidad de secuencias de los miembros de la familia 2 - transportadores facilitadores de glucosa tipo **GLUT-8** en cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>GLUT-8</i>	<i>Acropora digitifera</i>	2e-60	54.35 %	XP_015755025.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	2e-99	52.96%	XP_012555591.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	2e-133	50.62%	XP_022789882.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Exaiptasia diaphana</i>	4e-45	50.45%	KXJ27499.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Acropora millepora</i>	1e-126	48.67%	XP_029202857.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	6e-124	48.09%	XP_031555263.1

Tabla 9. Identidad de secuencias en cnidarios del transportador facilitador de glicerol: acuagliceroporina *AQGP-9-gen1*.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>AQGP-9</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	7e-94	62.35 %	XP_002156497.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	8e-87	60.00 %	XP_001620982.2
<i>AQGP-3</i>	<i>Orbicella faveolata</i>	8e-34	59.38 %	XP_020609163.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	3e-79	56.78 %	PFX24475.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	5e-76	55.04 %	XP_001637091.1
<i>AQGP-3</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	2e-79	54.96 %	XP_027047639.1
<i>AQGP-3</i>	<i>Exaiptasia diaphana</i>	3e-79	54.51 %	XP_020909973.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	1e-59	54.23 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	6e-82	51.85 %	XP_031550201.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Acropora millepora</i>	1e-76	51.50 %	XP_029199454.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	1e-81	51.85 %	XP_031550200.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	6e-72	51.03 %	XP_001637090.2

Tabla 10. Identidad de secuencias en cnidarios del transportador facilitador de glicerol: acuagliceroporina *AQGP-9-gen2*.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>AQGP-7</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	1e-86	55.88 %	XP_027047621.1
<i>AQGP-3</i>	<i>Orbicella faveolata</i>	6e-83	55.74 %	XP_020611711.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	9e-76	54.94 %	XP_002162049.2
<i>AQGP-7</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	2e-84	54.58 %	XP_022792474.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	1e-83	54.58 %	PFX24475.1
<i>AQGP-3</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	3e-83	50.04 %	XP_027047639.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Acropora millepora</i>	4e-72	53.88 %	XP_029199454.2
<i>AQGP-3</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	1e-74	53.65 %	XP_031550196.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	3e-66	52.94 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	2e-71	52.79 %	XP_001637091.1

2.2 Identificación de motivos conservados en proteínas transportadoras GLUT y AQGP

Las secuencias de nucleótidos de los transportadores GLUT-3, GLUT-8, AQGP-9-*gen1* y AQGP-9-*gen2* identificadas en el transcriptoma de *C. xamachana* fueron traducidas a aminoácidos, usando el programa ExPASy (Sistema Experto de Análisis de Proteínas). A partir de la secuencia de aminoácidos se buscaron los motivos conservados que cumplen la función del transporte de azúcar en GLUT y de transporte de glicerol en AQGP según lo reportado por Sproles y col. (2018) (Figura 26 y 27). En GLUT, los motivos **GR**, **GK**, **GRR** y **PETK**, se consideran necesarios para el transporte de azúcar (Joost y Thorens, 2001). Y para AQGP los dos motivos **NPA** y un residuo **D**, forman el poro acuoso para el transporte de glicerol, mientras que el residuo D está presente en acuagliceroporinas y ensancha la abertura del poro permitiendo la transferencia de solutos más grandes (Agre *et al.*, 2002). Sin embargo, en las secuencias identificadas de las proteínas transportadoras GLUT y AQGP ubicadas a partir del transcriptoma de *C. xamachana*, mediante un alineamiento múltiple es posible ubicar otras secuencias conservadas (Ver Anexo 3).

	170	180	420	430	640	650
GLUT1	G L F V N R F	G R R N	F V V E R A	G R R T L	K V P E T K	G R T F D
GLUT2	G W L G D T L	G R I K	F L V E K A	G R R S L	K V P E T K	G K S F E
GLUT3	G L F V N R F	G R R N	F L V E R A	G R R T L	K V P E T R	G R T F E
GLUT4	G I I S Q W L	G R K R	L L V E R A	G R R T L	R V P E T R	G R T F D
GLUT5	G P L V N K F	G R K G	F V V E L L	G R R L L	I V P E T K	A K T F I
GLUT6	M I L N D L L	G R K L	L T M D L A	G R K V L	C V P E T K	G R S L E
GLUT7	G L L V D S C	G R K G	V L V E R L	G R R H L	V I P E T K	G K T F V
GLUT8	G W L V D R A	G R K L	L I M D R A	G R R L L	C V P E T K	G K T L E
GLUT9	K M I G K V L	G R K H	L V I E H L	G R R P L	V L P E T K	N R T Y A
GLUT10	G F L I D C Y	G R K Q	G L V D R A	G R R A L	F V P E T K	G Q S L A
GLUT11	G P L A I T L	G R K K	V V I E R V	G R R V L	F L P E T K	G K T F Q
GLUT12	G V L I D R Y	G R R T	L L V D H V	G S K T F	F I P E T K	G C S L E
HMIT	G A L N G V F	G R R A	W L V E K V	G R R K L	C L P E T K	G K K L E

Figura 26. Motivos conservados GR, GRR y PETK en la proteína transportadora GLUT (Sproles *et al.*, 2018).

	90	100	530	540
AQP3	Q V S G A H L	N P A V	V N P A R	D F G P R L
AQP7	R I S G A H M	N A A V	I N P S R	D L P P R I
AQP9	G V S G G H I	N P A V	M N P A R	D L S P R L
AQP10	N V S G A H L	N P A F	L N P A R	D L G P R L

Figura 27. Motivos conservados para la proteína transportadora AQGP (Sproles *et al.*, 2018).

Para identificar los motivos conservados en la secuencia de aminoácidos de los transportadores GLUT-3, GLUT-8, AQGP-9-*gen1* y AQGP-9-*gen2* de *C. xamachana*, se hizo un alineamiento en el programa **Clustal Omega** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con otras secuencias de aminoácidos de transportadores reportadas en distintas especies de cnidarios. Para las proteínas GLUT-3 y GLUT-8 se encontró homología con los motivos **GR**, **GK**, **GRR** y **PETK** de GLUT-1, 3, 4 y 8 en secuencias de transportadores GLUT en otros cnidarios (Figuras 28 y 29 A, B y C). El árbol filogenético generado para GLUT-3 indicó que la secuencia de aminoácidos de GLUT-3 en *C. xamachana* es homólogo con GLUT-3 de *Hydra vulgaris* (Figura 30). El árbol filogenético generado para GLUT-8 indicó que la secuencia de este transportador es homóloga con GLUT-8 de *Exaiptasia* (Figura 31). Para el transportador AQGP-9-*gen1* se encontró homología con los motivos conservados **NPA**, **NPAR** y **D** de AQGP 3, 7 y 9 en secuencias de este transportador en otros cnidarios (Figura 32 A y B). El árbol filogenético generado indicó que la secuencia de aminoácidos de AQGP-9 en *C. xamachana* es homóloga con AQGP-9 de *H. vulgaris* (Figura 33). Para el transportador AQGP-9-*gen2* se encontró homología con los motivos conservados **NPA**, **NPAR** y **D** de AQGP 3, 7 y 9 en secuencias de este transportador en otros cnidarios (Figura 34 A y B). El árbol filogenético generado indicó que la secuencia de aminoácidos de AQGP-9 en *C. xamachana* es homóloga con AQGP-9 de *A. tenebrosa* (Figura 35).

MOTIVOS CONSERVADOS DE GLUT-3 EN *C. xamachana*

(A) Motivo conservado: GR		
GLUT3_Nematostella	LAGPLFANRFRGRKRSLLANGLAIVGALLMFLSYFAKTSPLLTVGRFVIGINCGMNTAIA	150
GLUT1_Acropora	TVGQLTANSIGSKRALFLNNIPAIIGSVMMFSSYFAEGPALLIIIGRFVGFNNGVNTAVA	168
GLUT1_Stylophora	LIGPVIADSLGSKQTLFLNNLPAMVGSMMFFSYHAKAPLLIIIGRLVVGFNNGVNTAVA	155
GLUT3_Stylophora	LIGPVIADSLGSKQTLFLNNLPAMVGSMMFFSYHAKAPLLIIIGRLVVGFNNGVNTAVA	155
GLUT3_Cassiopea Transcrip.	LLGPHVAKRFRGRKTLMANNVIAIIGGIFLFIKATHSIY--VLLLLLVGVNAGVNTVVA	245
GLUT3_Hydra	FIGPHIATKVRKNTLLNLLAIICGGLLAFTKPAKLVGLLIFARILLGLNAGVNTVVA	146
GLUT8_Dendronephthya	LIGSRTIDKLRKFNIMACSVPLVAGWIIIAA---AKALSLFYVGRFISGLGIGAIISLTV	142
GLUT8_CassiopeaTranscrip.	LLGGWAIIEYFRKATMLYSVPFATGWLLISN---ATHGWMLFLGRLLTGIAGVSTSLTV	1189
GLUT8_Orbicella	VIGGKAVDLIGRKFALIVGSIPFALGWLLIFL---AKNRAMLYTGRIFTGVGCGIETLAV	145
GLUT8_Exaiptasia	ALGGWLIIEYIGRKSIGMCSGVPFEIGWLLITY---AKNHFMLYFGRVICGVAVGMISLMV	160
GLUT8_Pocillopora	LIGGWAIEKFRKGTMMCSVPFVLGWLLISY---AQSVAILYAGRFITGVACGAVSFTA	144
GLUT8_Acropora	IIGGWAIDYFRKSTIMCSLPFELGWFLIAF---AKNHEMLYAGRVISGVACGMITVAV	69
GLUT4_Orbicella	PVGGWAIDRFGRKGTIMFCVVPFELGWLLISY---AQNHMTLYTGRIITGLACGIISLAV	659
GLUT8_Stylophora	PLGGWAIDKFRKSTIMLCVIPPVLGWLLISF---AHNVAMLYTGRIITGMGCGVISLAV	143
	* . * : * . : : : .. * . * : .	

(B) Motivo conservado: GRR

GLUT3_Nematostella	VFTAI AVRLVEVI GRR TLMLIGLGGMFLFYVMTIAFCF---E-----	368
GLUT1_Acropora	VMTGITV KVVEIM GRR SLILWGFGGMFIFYAVMTISFRF---E-----	386
GLUT1_Stylophora	FMTAVT VKTVEVI GRR SLLLVGFGGMFVFYAVMTISFRY---E-----	373
GLUT3_Stylophora	FMTAVT VKTVEVI GRR SLLLVGFGGMFVFYAVMTISFRY---E-----	373
GLUT3_Cassiopea Transcrip.	LMTAI VVKLVEVI GRR TLMLWGLGGMVIFYICMT--IAFV--QS-----	465
GLUT3_Hydra	VMTGITV VVLVEVS GRR RLMLLIGLGGMVVVCYSIVTVSLVVF--EK-----	367
GLUT8_Dendronephthya	SGTATS CLIVDKV GRR LLLPFTTMCASMIVLGASRYQDFPSS-----	356
GLUT8_CassiopeaTranscrip.	VATAVA CLIVDRS GRR ILLLVGAFGMCLCQVCLGV--YYDIKKSSNSTSEKAMALQSAN	1415
GLUT8_Orbicella	AGTVS ACYLVEKI GRR LLLTNALGMGVSLLGLGV--YFEIYQAH-----	356
GLUT8_Exaiptasia	FGTAC ACLIIDVRG RK ILLWTAGLGMASLIALAV--YFEIYIPKDGSAE---GIIHS	382
GLUT8_Pocillopora	IGNIF SCLVLDKV GRR LLLTALVMSLSLITLGV--FFAIFIPAVDGG-FATDADT--S	367
GLUT8_Acropora	VGTAL ACLLMDRA GRR LLWTMALGMGITLAGLGF--YFEIYIPPKTDSTPASDTVSLLG	295
GLUT4_Orbicella	VGTGL ACLLMDKA GRR ILLWTALGMCVSLLALGV--YFEIYIPPTDGGSTSDTVSLLG	885
GLUT8_Stylophora	VGTAL ACLLMDKA GRR ILLTTAIGMCVSLAALGV--YFEIYIPPEGE-GSASETVSLLG	368
	. :: * * :	

(C) Motivo conservado: PETK y GR

GLUT3_Nematostella	TNFIIGI AFPPSMQ VALYPYT-FIVFMALVAIFWTF FFVPE PETKGR TIEDITDHFRGGDS	481
GLUT1_Acropora	SNFVIGL VFPSPMQ KALYPYT-FVVFIVLVGVFFAFTLFFV PE PETKGR TIQEISSRFRSKKQ	499
GLUT1_Stylophora	SNFVVGL MFPSPMQ DALYPYT-FLVFMALVAFSFAFTLLLV PE PETKGR TIEEISRLFKHEDD	486
GLUT3_Stylophora	SNFVVGL MFPSPMQ DALYPYT-FLVFMALVAFSFAFTLLLV PE PETKGR TIEEISRLFKHEDD	486
GLUT3_Cassiopea Transcrip.	SSFVLSI SFPSIQEKI KPYT-FVPP TALVLLFWLFTFYFV PETKGR TVNDIMKGLEKKS	578
GLUT3_Hydra	GNFAVSL VYPKMQDKI HPYT-FIPF EILLILFLFTYFV PETKGR TVAEISAVFRNN-Y	479
GLUT8_Dendronephthya	GAF TVMRFYVNM EKTMHSGCYWFYA AVCLVSVIYVLVFL PETKGR TLEEVEKLFKQSD	463
GLUT8_CassiopeaTranscrip.	FVFLV TKLFPQMI DALKEQGTFWLFGGFC LLSFIFVYFLV PETKGR TLEEIEHYFSEGYP	1535
GLUT8_Orbicella	SLFLV TRTYANLES AFGNQACW FYA AWCCVAFVIVLV FV PETKGR TLEEIEASFNP---	465
GLUT8_Exaiptasia	MSF TVTKTFVDL QKSFTPPGT YLFYGCVSFAAFLYVJF FLPETKGR SLEEIEELIFDKNRR	502
GLUT8_Pocillopora	TQFIV TKTYHSM AAAF TIQGVYWAYAGFC MLGSLFVYLL LPETKGR TLEEIEDLFRPVK	487
GLUT8_Acropora	VDFV VTKTYD DMVCG LTIQGTFFWFYAGFC FLGFV FVIFIMP PETKGR NLEEIEAMFDKDK-	414
GLUT4_Orbicella	LAFV VTKTYD SMAD TL SIQGV WFYAGFC FVGF FVYLLM PETKGR TLEEIEALFDKDK-	1004
GLUT8_Stylophora	LAFV VTKTFQSM VVALSNQGV WFYAGFC FV SFIFVFLM PETKGR TLEEIEAMFDKDK-	487
	* : : : : : : . : : * * * * * : : : :	

Figura 28. Alineamiento de secuencias de aminoácidos para el transportador GLUT-3. Se hizo el alineamiento a partir de los motivos (A) GR, (B) GRR y (C) PETK (G= glicina, R= arginina, P= prolina, E= ácido glutámico, T= treonina y K= lisina) del transportador GLUT-3. El alineamiento se realizó con el programa Clustal Omega.

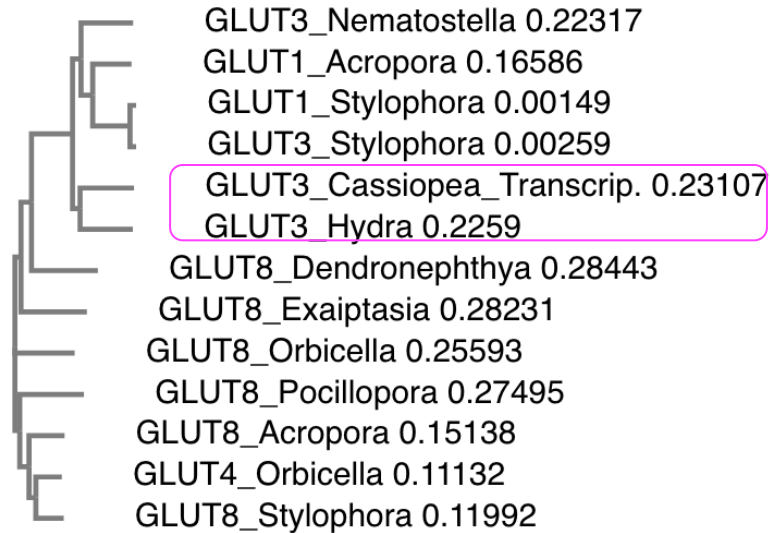


Figura 30. Árbol filogenético generado para el transportador GLUT-3. Se observa a partir del alineamiento en Clustal Omega que la secuencia de aminoácidos del transportador **GLUT-3** en *C. xamachana* es homóloga con GLUT-3 de *Hydra vulgaris*.

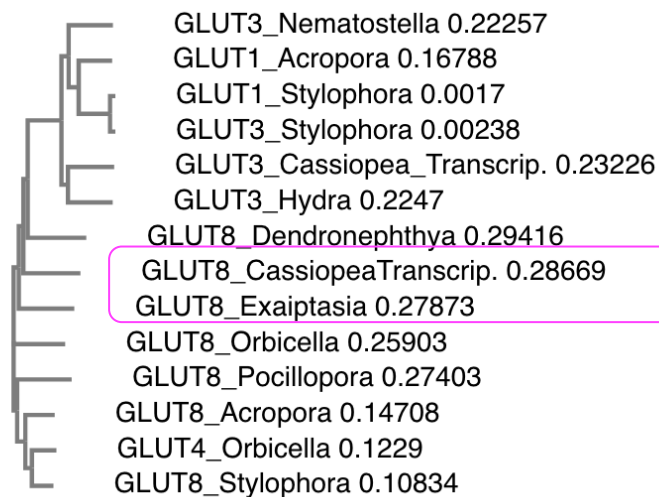


Figura 31. Árbol filogenético generado para el transportador GLUT-8. Se observa a partir del alineamiento en Clustal Omega que la secuencia de aminoácidos del transportador **GLUT-8** en *C. xamachana* es homóloga con GLUT-8 de *Exaiptasia pallida*.

2.3 Diseño de cebadores para amplificar el fragmento de los genes que codifican para transportadores *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2*

En la plataforma NCBI, primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, en inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se hizo una búsqueda de cebadores para cada tipo de transportador. Para seleccionar el par de cebadores, se buscó que se ubicaran en una región que incluyera la región conservada para cada gen: *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* (Figuras 36, 37, 38 y 39).

Para *GLUT-3*, se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la base de datos *Cassiopea_dovetail* con número de referencia: >>TRINITY_DN109051 (Figura 36, Tabla 8).

```
actggttctcaagttttcttggttgaatatcttttccttctattcaggagaagatcaagc
T G S Q V F L L E Y L F L L F R R R S S
cctatacatttfgtcccttttacggcactggtgctgctattctggctgtttacgttctat
P I H X V P F T A L V L L F W L F T F Y
tttgttcctgaaacaaaggtagaacrcdgtcaatgacatcatgaaaggattagaaaaga
F V P E T K G R X X S M T S - K D - K R
agagttacggagcaactgctcagagagaagatgtatcaaagtcatcggacgtccaactct
R V T E Q L L R E K M Y Q S H R T S N S
```

Figura 36. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito >>TRINITY_DN109051, del transportador de glucosa *GLUT-3* en *C. xamachana*. Se diseñaron los cebadores (recuadros azules) en donde se localiza el motivo conservado PETKGR (recuadro rojo) (P= prolina, E= ácido glutámico, T= treonina y K= lisina, G= glicina, R= arginina). La traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa ExpASy.

Para *GLUT-8*, se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la base de datos *Cassiopea_dovetail* con número de referencia: Transcript (3204 bp)/CDS Sequence (1545 bp)) (Figura 37, Tabla 9).

```
gtcaccaagctgtttccacagatgattgatgctttaaagagcaaggcacattttggctc
V T K L F P Q M I D A L K E Q G T F W L
tttggtggtttttgccttttaagtttcatatttggtgacttttcttgttccagaaacaaag
F G G F C L L S F I F V Y F L V P E T K
ggaaaaactcttgaggaaattgaacattatttctctgagggatatttccctactgagact
G K T L E E I E H Y F S E G Y F P T E T
gtgcgagattga
V R D -
```

Figura 37. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito Transcript (3204bp)/CDS Sequence (1545 bp)), del transportador de glucosa *GLUT-8* en *C. xamachana*. Se diseñaron los cebadores (recuadros azules) en donde se localiza el motivo conservado

PETKGGK (recuadro rojo) (P= prolina, E= ácido glutámico, T= treonina y K= lisina, G=glicina). La traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa ExPASy.

Para *AQGP-9-gen1*, se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la base de datos *Cassiopea dovetail* con número de referencia: (Transcript (807 bp)/CDS Sequence (807 bp)) (Figura 38, Tabla 10).

```
acataccccccagatttctgatcaaaactggactggtttcagtgatcagcttcttgcaact
T Y P P D F V S N W T G F S D Q L L A T
gccatatttggtgactatctttgcactacttgacaacaagaacattgggcctggttct
A I F V G T I F A L L D N K N I G P G S
aacatggcacctctgctgattgggtcttatcgttttgacacttggaacttcattcgggaatt
N M A P L L I G L I V L T L G T S F G I
aatgcaggatttggggttaaccggcaagagacttgattccaagagtattcacggccggt
N A G F G V N P A R D L I P R V F T A V
```

Figura 38. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito (Transcript (807 bp)/CDS Sequence (807 bp)), del transportador de glicerol *AQGP-9-gen1* en *C. xamachana*. Se diseñaron los cebadores (recuadros azules) en donde se localiza el motivo conservado NPARD (recuadro rojo) (aminoácidos: N= asparagina, P= prolina, A= alanina, R= arginina y D= ac. Aspártico). La traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa ExPASy.

Para el fragmento del transportador *AQGP-9-gen2*, se diseñaron los cebadores a partir de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la base de datos *Cassiopea dovetail* con número de referencia: (Transcript (945 bp)/CDS Sequence (945 bp)) (Figura 39, Tabla 8).

```
tgggctggattttctgatcagggttttgccactatgattcttgtcagtagcattttcgca
W A G F S D Q V F A T M I L V S T I F A
ttgactgacagaaaaacaatggcggttgattcgacgcagctgccgtttatgggtgggtgc
L T D R K N N G V D S T Q L P F M V G C
ctcgtttgggttattggcatgacaatggggctcaattgtgggttatggaatcaaccagca
L V W V I G M T M G L N C G Y G I N P A
agaattttcacaagcttggcaggctggggatccgcgcctttcaaa
R D L I P R I F T S L A G W G
```

Figura 39. Fragmento de la secuencia nucleotídica-aminoacídica de la secuencia del transcrito (Transcript (945 bp)/CDS Sequence (945 bp)) del transportador de glicerol *AQGP-9-gen2* en *C. xamachana*. Se diseñaron los cebadores (recuadros azules) en donde se localiza el motivo conservado NPARD (recuadro rojo) (aminoácidos: N= asparagina, P= prolina, A= alanina, R= arginina y D= ac. Aspártico). La traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó con el programa ExPASy.

Se estandarizaron las condiciones de PCR en punto final (Tabla 11), para amplificar el fragmento de la secuencia identificada de las proteínas transportadoras *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* usando cADN de *C. xamachana* como molde y como control negativo (-) ADN correspondiente a bacterias y de simbionte (*Symbiodinium* KB8).

Tabla 11. Secuencias de cebadores específicos para amplificar los fragmentos de las secuencias de genes que codifican para proteínas GLUT-3, GLUT-8, AQGP-9-gen1 y AQGP-9-gen2. Condiciones de PCR empleadas en este trabajo.

Nombre	Secuencia
<i>GLUT-3</i> <i>CxGLUT6F</i> <i>CxGLUT6R</i>	5'- GTC CCT TTT ACG GCA CTG GT -3' 5'- AGA GTT GGA CGT CCG ATG AC -3' Longitud del producto de amplificación: 166 pares de bases (pb).
<i>GLUT-8</i> <i>CxGLUT8F</i> <i>CxGLUT8R</i>	5'- GTC ACC AAG CTG TTT CCA CA -3' 5'- ATC TCG CAC AGT CTC AGT AGG A -3' Longitud del producto de amplificación: 189 pares de bases (pb).
<i>AQGP-9-gen1</i> <i>CxAQ61F</i> <i>CxAQ62R</i>	5'- GAT CAG CTT CTT GCA ACT -3' 5'- TGG AAT CAA GTC TCT TGC-3' Longitud del producto de amplificación: 177 pares de bases (pb).
<i>AQGP-9-gen2</i> <i>CxAQ61F</i> <i>CxAQ62R</i>	5'- GAT CAG GTT TTT GCC ACT -3' 5'- TGG GAT AAG ATC ACG TGC -3' Longitud del producto de amplificación: 180 pares de bases (pb).
<i>FE1a</i> <i>PF-Fea1F</i> <i>PF-Fea1R</i>	5'- CCT CCA TAC TCT GAA CCA AGG TTT AAT G -3' 5'- CCA ATT CCA CCA ATC TTG TAT ACA TCC TG -3' Longitud del producto de amplificación: 300 pares de bases (pb).
Condiciones de PCR usadas para amplificar los fragmentos de los genes que codifican para <i>GLUT-3</i> , <i>GLUT-8</i> , <i>AQGP-9-gen1</i> y <i>AQGP-9-gen2</i> .	Un ciclo de 95 °C durante 3 min, 35 ciclos: 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, 72 °C por 30 s y un ciclo de extensión final de 72 °C por 7 min.

2.4 Blanqueamiento de *C. xamachana* para el análisis de la expresión de genes que codifican a proteínas transportadoras

Se seleccionaron medusas simbióticas adultas de *C. xamachana* (n = 6) colectadas en la laguna Nichupté, México y transportadas a las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y

Limnología en la UNAM, Puerto Morelos, Q. Roo. Se aclimataron en un estanque con sistema abierto de 100 L y se mantuvieron bajo luz natural durante más de un año antes de los experimentos. Los experimentos se hicieron con medusas en cautiverio, para lo cual se trasladaron desde el estanque al laboratorio de Microbiología Molecular.

Para el blanqueamiento experimental de medusas se usó la misma mezcla de azúcares (monosacáridos) similar al método empleado para el análisis del microbioma de *C. xamachana* y reportado por Pogoreutz *et al.*, (2017). Se seleccionaron medusas simbióticas con un tamaño de paraguas similar de 6 cm. Cada medusa se colocó individualmente en un vaso de precipitado con 500 mL de agua de mar tomada del estanque de cultivo de medusas, bajo condiciones de luz natural y aireación en todo momento. El blanqueamiento artificial se le aplicó a 4 medusas bajo condiciones de luz natural. El procedimiento de blanqueamiento consistió en adiciones diarias de 3 mL de una mezcla de azúcares (MS) previamente disueltos en 200 mL de agua destilada, con una concentración final de 0.3 mg L⁻¹. La mezcla contenía glucosa (D+) (4,14 mg L⁻¹), galactosa (D+) (3,59 mg L⁻¹) y manitol (2,25 mg L⁻¹). El agua de mar de los vasos de precipitado fue reemplazada diariamente y después del reemplazo se adicionaban 3 mL de la mezcla de azúcares; esto se realizó durante 21 días consecutivos. Se mantuvieron medusas control (n= 3) en el mismo tiempo de tratamiento, solo con recambio de agua de mar y sin blanqueamiento experimental. Los organismos no fueron alimentados en ningún momento.

Cada día, se tomaron medidas del diámetro del paraguas de todas las medusas para evaluar la pérdida de talla durante los experimentos. Se colectó un tentáculo de cada medusa al día inicial (día 0), después al día 14 tanto a medusas blanqueadas (n=4) como medusas control (n=3) y, después de 14 días se suspendió la adición de azúcares para posteriormente a los 21 días tomar otra muestra de tentáculo a esas mismas medusas. Los tentáculos se cortaron con tijeras estériles, se sumergieron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior procesamiento para la extracción de ARN total.

Cada semana, se cortó un tentáculo de medusa desde la base del paraguas con tijeras esterilizadas, se pesó y se homogeneizó con un homogeneizador Dounce. El homogenado se centrifugó a 13,000 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se lavó una vez con agua miliQ y se resuspendió en 500 µl de agua de mar estéril con 167 µl de lugol. Se cuantificó la densidad de simbionte con un hematocitómetro usando un microscopio óptico **LEICA DM500** (Objetivo 10X/0.22, ocular 10X) (3 conteos repetidos por muestra). Los datos de densidad celular de simbiontes se normalizaron respecto al peso húmedo de

cada tentáculo. Se tomaron fotografías de cada tentáculo al inicio y final del experimento (día 0 y 21) con un microscopio de fluorescencia (Axioskop 40 con el objetivo 20X y el filtro Tex Red Fs 15). Se tomaron fotografías de la respuesta fenotípica de medusas blanqueadas (M1, M2, M3 y M4) al día 21 así como de medusas control sin blanquear (C1, C2 y C3).

2.5 Extracción de ARN para el análisis de la expresión de proteínas transportadoras

El protocolo de extracción fue adecuado por la Dra. Victoria Grosso de la UNAM, Puerto Morelos y está basado en el protocolo publicado por Pawlowski *et al.*, 1994 con algunas modificaciones (Ver Anexo 1). Se usaron 500 ng del ARN extraído que fue copiado a cADN mediante el uso del kit **ImProm-II TM Reverse Transcriptase** con 4 µl de Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM DTT y 25 mM MgCl₂), 1 µl DNTPs, 0.5 µl inhibidor de ribonucleasas y 1 µl de la enzima, en el termociclador **BIORAD T100 Thermal Cycler** bajo las siguientes condiciones: 25 °C (5 min), 42 °C (1 h 3 min) y 70 °C (5 min) (Former *et al.*, 1994). Para corroborar que el cADN fue correctamente sintetizado, se realizó la amplificación mediante RT-PCR (transcripción inversa) de una región de 167 y 189 pb del fragmento del gen que codifica para *GLUT-3* y *GLUT-8*, respectivamente usando los cebadores descritos en la tabla 11.

2.6 Amplificación mediante PCR del fragmento identificado del gen *FE1α* usado como gen de referencia (housekeeping)

Se emplearon los cebadores *PF-Feal-Fwd*: y *PF-Feal-Rev* (Ver tabla 11), para amplificar el fragmento del gen que codifica para el Factor de elongación 1 alfa (*FE1α*) como gen basal o de referencia usando cADN de *C. xamachana* como molde. Estos cebadores fueron previamente diseñados en el estudio de Cabrales-Arellano *et al.*, (2018) a partir del borrador del transcriptoma de *C. xamachana* facilitado por el laboratorio de la Dra. Mónica Medina de la Universidad Penn State. Para la amplificación del fragmento del gen del *FE1α*, se usó el termociclador **BIORAD T100 Thermal Cycler**.

2.7 Electroforesis en gel de agarosa

Las extracciones de ARN fueron visualizadas mediante geles de agarosa al 1%, y para las amplificaciones de PCR se usó un gel de agarosa al 1.5 % de acuerdo al tamaño de amplificación esperado, en un buffer de corrida TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y 2 µl de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25%, glicerol 30% en el colorante fotoreactivo Gel Red Biotium®). Para visualizar los ácidos nucleicos y los productos de PCR en el gel de

agarosa, se cargaron 5 µl del material genético. La electroforesis se corrió a 80 V durante 40 min para posteriormente visualizarse en un transiluminador.

2.8 Secuenciación para corroborar la identificación de los fragmentos amplificados de los genes que codifican para proteínas *GLUT-3* y *GLUT-8*

Para corroborar la identidad de los fragmentos amplificados correspondientes a los genes *GLUT-3* y *GLUT-8*, se usó el producto de amplificación de PCR punto final, usando los cebadores y condiciones descritos en la Tabla 11 para cada secuencia usando cADN de *C. xamachana*. Los productos de amplificación del fragmento de los genes *GLUT-3* y *GLUT-8* fueron purificados del gel usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System para su posterior secuenciación. Los datos de secuenciación se obtuvieron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

2.9 Clonación y ligado de los amplicones obtenidos de los fragmentos de los genes *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2*

Las amplificaciones de los genes *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* se ligaron a los vectores de clonación pDrive® Quiagen y pGEM® T-Easy (Promega®), respectivamente (Tabla 12). Para las reacciones se emplearon 5 µl del Buffer de ligación 10X, 5 ng del vector, la cantidad de inserto necesaria para mantener la relación molar 3:1 y 3 unidades de T4 ligasa (Promega®), hasta un volumen final de 10 µl. La reacción de ligación se mantuvo durante toda la noche a 4 °C para continuar con el ensayo de transformación.

Tabla 12. Ligación de las amplificaciones de <i>AQGP-9</i> .			
Vector	Inserto	Nombre de la quimera	Función
pGEM T-Easy	<i>AQGP-9</i>	Clon-Cx <i>AQGP-9</i>	Transporte de Glicerol

2.10 Transformación: *AQGP-9* en *Escherichia coli*

El ligado de los dos genes de *AQGP-9* se transformaron en células químico competentes de *E. coli* TOP 10. Dicha transformación se llevó a cabo mediante un choque térmico a 42 °C durante 1 min, las células de *E. coli* se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación a 160 x g, en medio de cultivo enriquecido SOC **ThermoFisher**. Posteriormente, se hizo la transformación, distribuyendo las células en placas de agar LB (Para 100 mL de medio: 0.5 g de NaCl, 0.5 g extracto de levadura y 1 g bactopectona o peptona, pH 7.0) adicionando 40 µl de antibiótico a cada placa así como 40 µl

del reactivo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) con el fin de facilitar la búsqueda de colonias blancas. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. La selección de las clonas transformantes se hizo mediante un diagnóstico de PCR en punto final en colonia y digestión enzimática. Las clonas con los insertos de los dos genes de *AQGP-9*, se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, usando los cebadores reportados en la tabla 11.

2.11 Determinación de la expresión de genes codificantes para transportadores mediante PCR cuantitativa (RT-PCR)

Para la amplificación por PCR cuantitativa (RT-PCR) del fragmento de los genes de los transportadores de glucosa (*GLUT-3* y *GLUT-8*) y glicerol (*AQGP-9*) se usaron 20 ng de cada cADN sintetizado como templado a partir del ARN total extraído y se emplearon los cebadores específicos diseñados para cada gen (ver tabla 11). Las condiciones de las reacciones de amplificación para el RT-PCR fueron las siguientes: la concentración stock contenía 2X del agente intercalante **QuantiTec® SYBR®-Green PCR Kit (200)**, 5 μ M cebador hacia adelante, 5 μ M cebador reverso, agua y 20 ng de cADN como templado. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95 °C durante 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 15 s, 55 y 60 °C por 1 min, y para la curva de fusión 95 °C 15 s, 60 °C 1 min y 95 °C 15 s. En la amplificación, se incluyó un gen basal o de referencia como control siendo este el Factor de elongación 1 alfa. Para evaluar los niveles de expresión de los diferentes genes, se hicieron ensayos de RT-PCR cuantitativa en el termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) empleando el sistema SYBR Green, evaluando las tres réplicas biológicas de medusas control (simbióticas) y cuatro medusas blanqueadas al tiempo 0, 14 y 21 días.

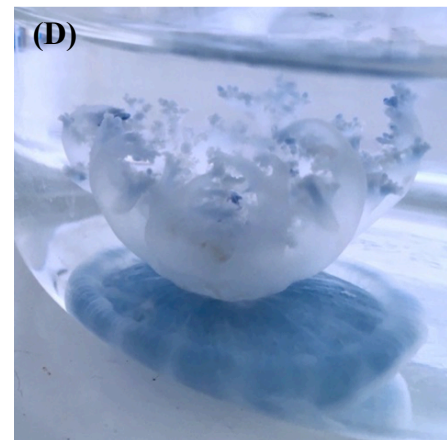
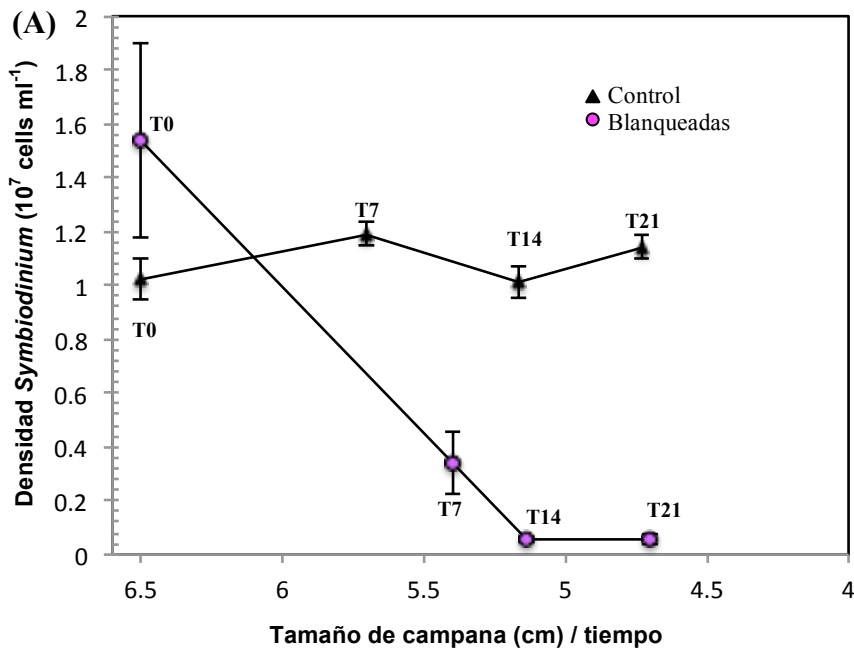
Para el análisis de expresión mediante PCR cuantitativa, se empleó el método de análisis de curvas de disociación, y se fijó el límite de fluorescencia en 0.05 para determinar la cuantificación de ciclos (valores C_T). Se hizo un promedio de los valores C_T para cada gen, y empleando el valor de amplificación del gen de referencia *FE1 α* , se calcularon los valores de diferencia de expresión mediante $\Delta\Delta C_T$ normalizados al mismo. Se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para determinar el cambio de veces en la expresión. La estabilidad de la expresión del gen de referencia se calculó mediante el uso de programas de acceso libre (GenNorm, $\Delta-C_T$ y BestKeeper). Se determinaron las medias y desviación estándar para cada muestra. Se calculó la significancia de la comparación de expresión entre réplicas y condición mediante análisis de significancia ANOVA.

RESULTADOS

EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y GLICEROL

2.12 Blanqueamiento experimental de *C. xamachana*

Los recuentos de densidad celular mostraron una reducción significativa de la densidad de simbiontes en medusas después de siete días de tratamiento, iniciando en el día 0 (T0) con 1.53×10^7 células ml^{-1} g^{-1} y 0.033×10^7 células ml^{-1} g^{-1} a los siete días. Después de 14 días y hasta 21 días la densidad de simbiontes se mantuvo baja con una reducción de simbiontes del 84-99% (Figura 40 A y D). Las medusas control conservaron sus simbiontes después de 21 días (Figura 40 A). Observamos una disminución del tamaño del paraguas en medusas blanqueadas que fue de 6.5 cm en el día 0 a 4.5 cm en el día 21, las medusas simbióticas conservaron una talla de 6.5 cm en el tiempo 0 a 5.7 cm en el día 21 (Figura 40 A). Se revisaron tentáculos de medusas con microscopio de fluorescencia el día 0 y después de 21 días de tratamiento y se observó la ausencia de fluorescencia en medusas blanqueadas hasta los 21 días (Figura 40 B). Los tentáculos de las medusas control mostraron fluorescencia durante los 21 días de tratamiento (Figura 40 C). Las características fenotípicas mostraron la ausencia de color pardusco de los simbiontes en medusas blanqueadas (40 D y 41) y en medusas control se observaron medusas color pardusco durante los 21 días de tratamiento (Figura 41).



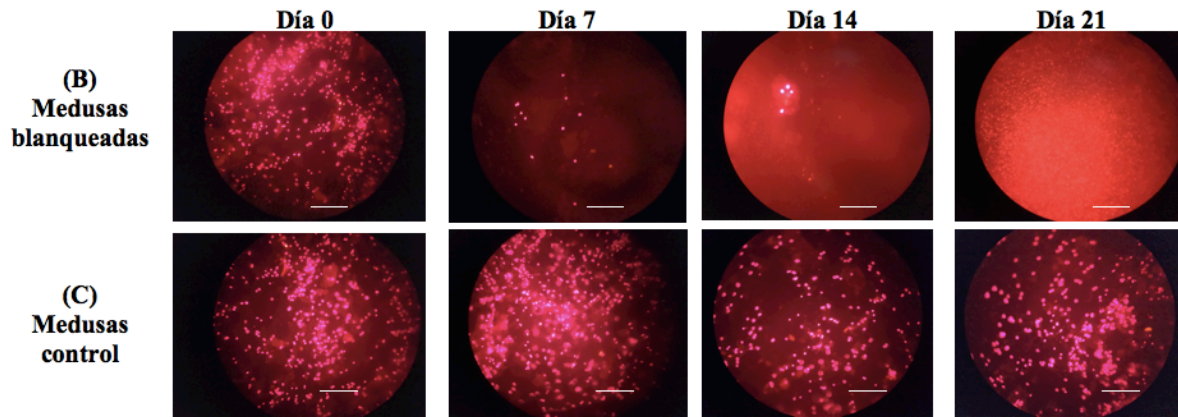


Figura 40. Blanqueamiento experimental y sus efectos sobre la densidad de simbiontes en *C. xamachana*. (A) Cuantificación celular de *Symbiodinium* en medusas blanqueadas durante 21 días (círculos rosas) y medusas control (triángulos cerrados) (valores media \pm sem; $n=3$). (B) Imágenes de fluorescencia de tentáculos de medusas al día 0, 7, 14 y 21. (C) medusas control. Las puntos rojos indican las células de *Symbiodinium* en los tentáculos de la medusa, barras de escala de 100 μm . (D) Fotografía que muestra a una medusa *C. xamachana* blanqueada.

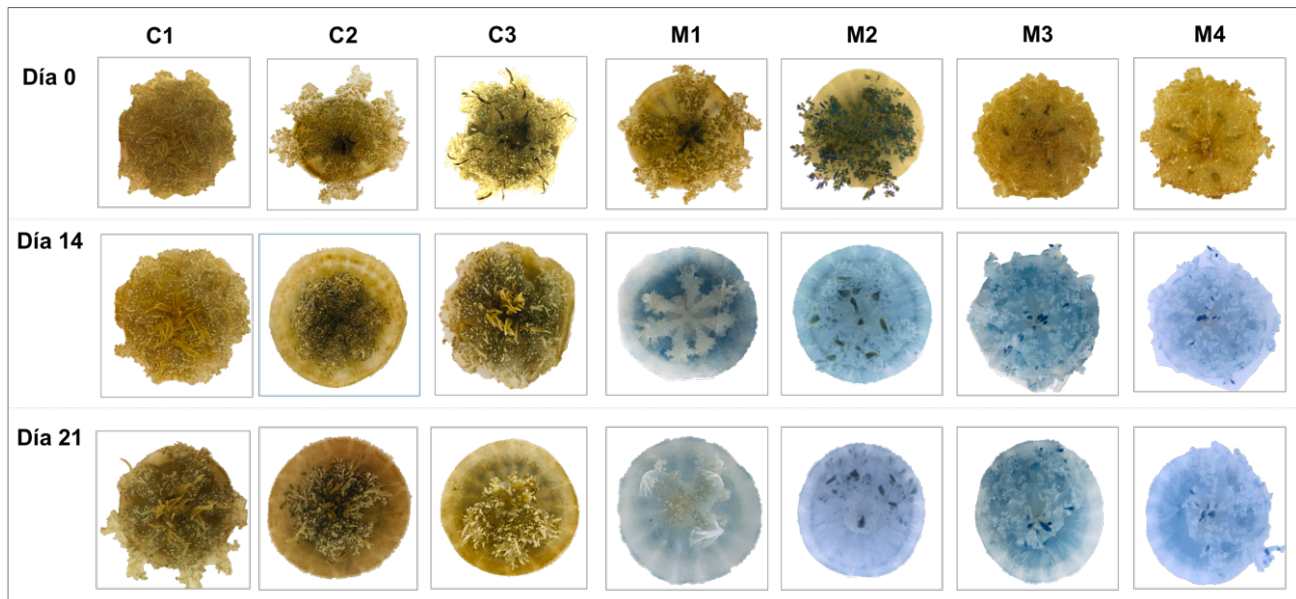


Figura 41. Fotografías de la respuesta fenotípica en medusas blanqueadas y control. Medusas blanqueadas (M1, M2, M3 y M4) y medusas control (C1, C2 y C3) a las que se les tomó una muestra de tentáculo al día 0, al día 14 del blanqueamiento y al día 21. Los tentáculos de estas medusas fueron empleados para la extracción de ARN total y análisis de expresión de transportadores de glucosa y glicerol.

2.13 Extracción de ARN total para la síntesis a ADN complementario (cADN)

El ARN total extraído (Figura 42 A, B y C) fue tratado con ADNasa (Figura 42 B y C). Los ARNs fueron extraídos de medusas al día inicial (Día 0), al día 14 y 21 bajo el tratamiento de azúcares, y al día 21 sin el tratamiento de azúcares (Figura 42 C).

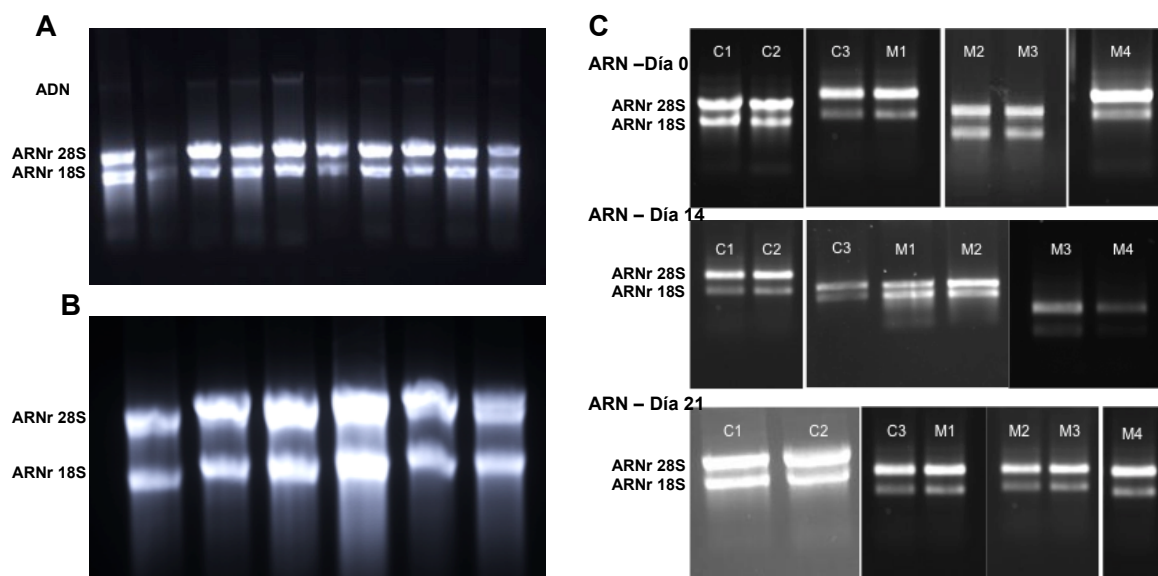


Figura 42. Extracción de ARN total de tentáculos de *C. xamachana*. (A) ARN total extraído de tentáculos de *C. xamachana* (cada carril representa la muestra de una misma medusa). Se observan tres bandas. La primera corresponde al ADN remanente, la segunda al ARN ribosomal 28S y la tercera al ARN 18S. (B y C) ARN libre de ADN de muestras control (C1, C2, C3) y blanqueadas (M1, M2, M3, M4). ARNs extraídos de medusas control y medusas blanqueadas al día inicial (día 0), al día 14 y al día 21.

2.14 Comprobación de la síntesis de ADN complementario (cADN)

Los sistemas eucariontes se caracterizan por la presencia de intrones; con la finalidad de evitar amplificaciones inespecíficas, se realizaron las amplificaciones mediante PCR punto final para estandarizar las temperaturas de alineamiento de los cebadores para cada gen. Se obtuvo un producto de amplificación de 167 pb para *GLUT-3*, de 189 pb para *GLUT-8*, 177 pb para *AQGP-9-gen1* y 180 pb para *AQGP-gen2* usando los cebadores diseñados para los fragmentos de los genes de transportadores, usando ADN complementario (cADN) como templado (Figura 43 A, B, C y D). De este modo, se corroboró la síntesis de cADN (Figura 43 E y F) que se usó como templado para la amplificación mediante RT-PCR cuantitativa.

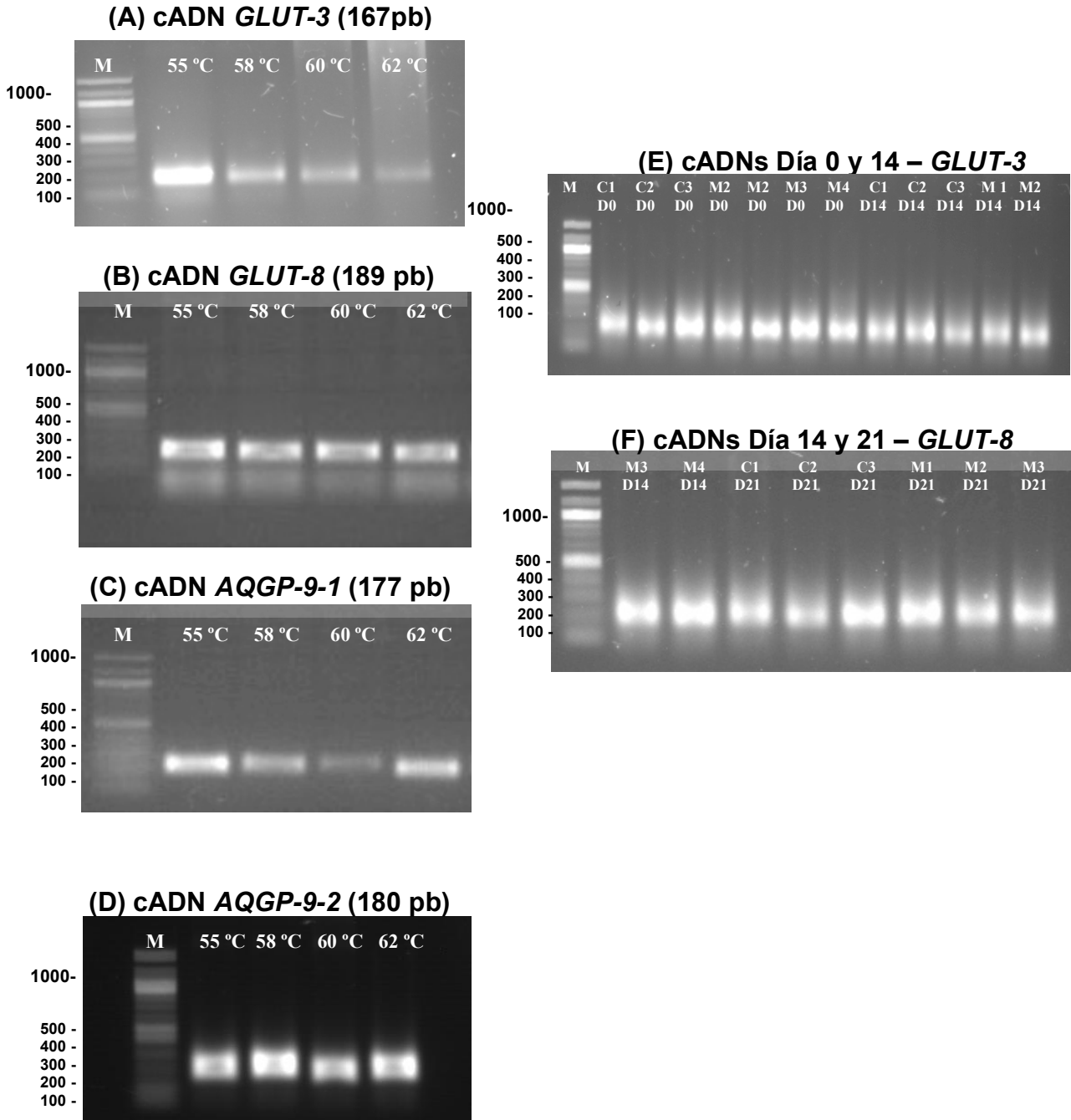


Figura 43. Amplificación del fragmento identificado de los genes que codifican para proteínas *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1*, *AQGP-9-gen2* mediante PCR punto final usando cADN de *C. xamachana* como molde. (A, B, C y D) Amplificación en gradiente de *GLUT-3*, *GLUT-8* y *AQGP-9* usando cADN como molde a 55, 58, 60 y 62 °C. (E y F) Amplificación de *GLUT-3* y *GLUT-8* usando los cADNs sintetizados de las muestras Control (C 1, C2 y C3) y blanqueadas (M 1, M2, M3 y M4) al día 0, 14 y 21 (cada carril representa la muestra de una misma medusa). **M**: marcador de peso molecular 100 pb Quick-Load® 100 pb ADN.

2.15 Amplificación del fragmento identificado del gen que codifica para la proteína Factor de Elongación 1 alfa

Con el uso de los cebadores *PF-Feal-Fwd* y *PF-Feal-Rev* (Tabla 11) mediante un gradiente de temperaturas y usando cADN de *C. xamachana* como molde, se obtuvo un producto de 300 pb (Figura 44 A). Se usó al *FE1 α* como gen de referencia para los ensayos de PCR cuantitativa ya que se ha reportado su estabilidad comparado con otros genes de referencia (Nicot *et al.*, 2005) y su uso en otros ensayos de RT-PCR (Suescún-Bolívar *et al.*, 2016). En la amplificación, los controles negativos (-) con ADN correspondiente a bacterias y ADN de simbionte que se usaron como templado, no reflejaron ningún producto de amplificación (Figura 44 B).

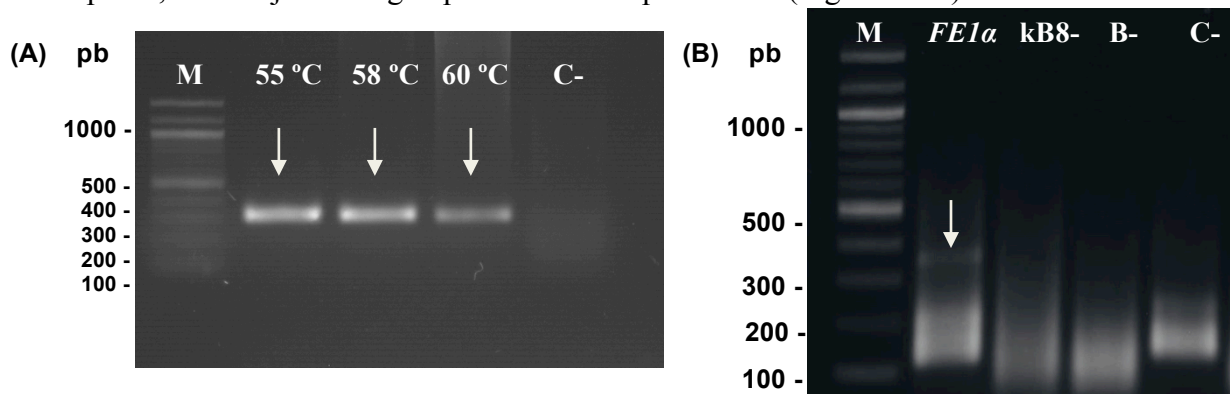


Figura 44. (A) Amplificación de *FE1 α* en gradiente. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los cebadores PF-Feal-Fwd y PF-Feal-Rev. En las reacciones esperadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado de 300 pb (flechas blancas) a 55 °C, 58 °C y 60 °C. **(B)** En el control negativo (-) con ADN molde de *Symbiodinium* (KB8-) y ADN de bacterias (B-) así como en el control negativo (-) sin ADN molde no se detectó ningún producto. **M:** marcador de peso molecular de 100 pb Quick-Load® 100 pb ADN.

2.16 Secuenciación para la identificación de los fragmentos codificantes de los genes *GLUT-3* y *GLUT-8*

Para corroborar que los cebadores amplifican los fragmentos de *GLUT-3* y *GLUT-8* mediante PCR en punto final se verificó que los fragmentos amplificados sólo dieran un producto de 167 pb y 189 pb, respectivamente usando como molde cADN de *C. xamachana* (Figuras 45 A y 46 A). Como controles negativos se usaron como templados ADN de bacterias y de simbionte (*Symbiodinium* KB8) y un control negativo sin cADN, los cuales no reflejaron ningún producto de amplificación. Para la secuenciación de los fragmentos amplificados de *GLUT-3* y *GLUT-8*, se hicieron cuatro reacciones con dos productos esperados de 167 pb y 180 pb, respectivamente usando cADN como molde (Figuras 45 B y 46 B). Los dos fragmentos amplificados para *GLUT-3* y *GLUT-8* fueron

purificados del gel de agarosa en cuatro reacciones (Figuras 45 C y 46 C). Estos fragmentos amplificados y purificados fueron usados para corroborar las identidades de *GLUT-3* y *GLUT-8* mediante secuenciación en el Instituto de Fisiología celular de la UNAM, usando los cebadores *CxGLUT6F-CxGLUT6R* de *GLUT-3* y *CxGLUT8F-CxGLUT8R* para *GLUT-8* (Ver tabla 11).

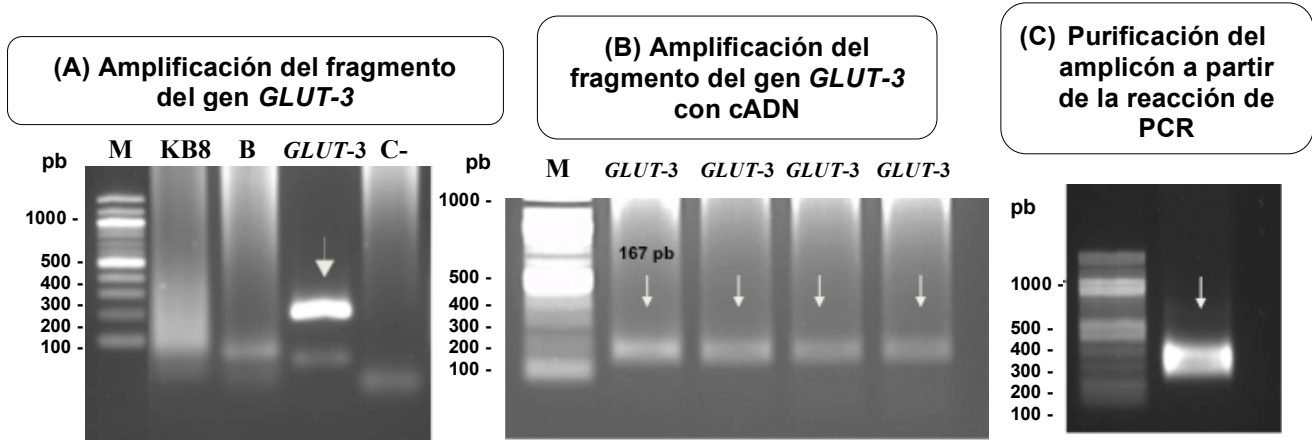


Figura 45. Amplificación del fragmento de la secuencia correspondiente al fragmento del gen que codifica para *GLUT-3*. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los cebadores *CxGLUT6F-CxGLUT6R*. En las reacciones esperadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado de 167 pb. En los controles negativos (-) con ADN molde de *Symbiodinium* (KB8-) y ADN de bacterias (B-) así como en el control negativo (-) sin ADN molde no se detectaron productos de amplificación. M: marcador de peso molecular de 100 pb. (B) Productos de amplificación del fragmento del gen *GLUT-3* usados para la purificación en gel. (C) Purificación de ADN de los amplicones generados para el fragmento del gen *GLUT-3*.

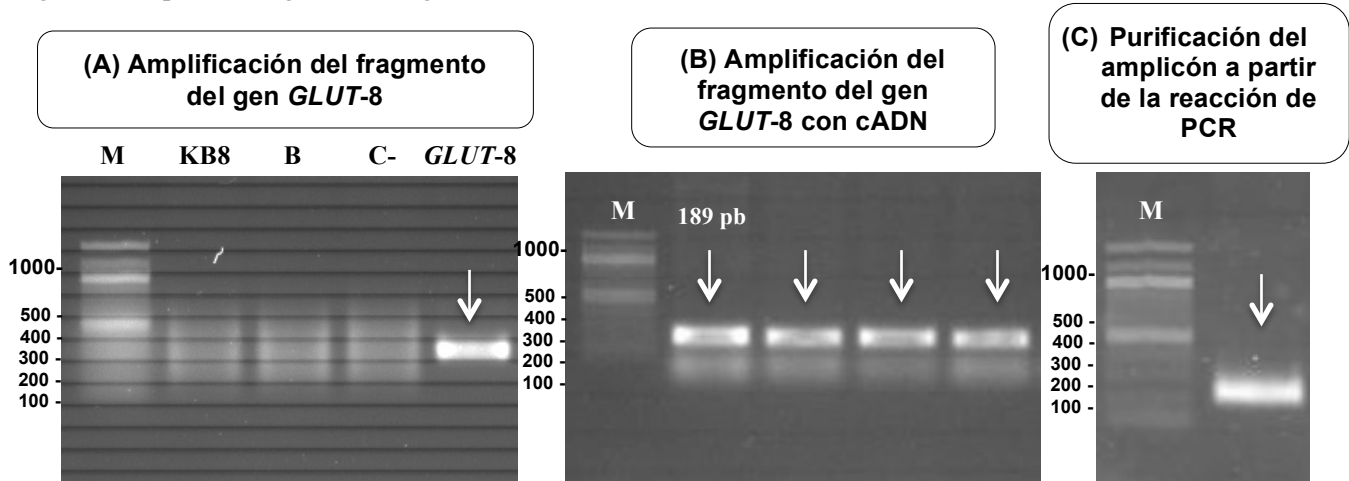


Figura 46. Amplificación, clonación y secuenciación del fragmento del gen que codifica para la proteína *GLUT-8*. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los cebadores *CxGLUT8F-CxGLUT8R*. En las reacciones esperadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado de 189 pb. En los controles negativos (-) con ADN molde de *Symbiodinium* (KB8) y ADN de bacterias (B-) así como en el control negativo (-) sin ADN molde no se detectaron productos de amplificación. M: marcador de peso molecular de 100 pb Quick-Load® 100 pb ADN. (B) Productos de amplificación del fragmento del gen *GLUT-8* usados para la purificación en gel. (C) Purificación de ADN de los amplicones generados para el fragmento del gen *GLUT-8*.

2.17 Identificación de los fragmentos amplificados de los genes que codifican para *GLUT-3* y *GLUT-8* de *C. xamachana*

Para la identificación de los fragmentos amplificados que corresponden a transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8*, la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada gen amplificado fue traducida a aminoácidos (usando el programa ExPASy, Sistema Experto de Análisis de Proteínas). Por otro lado, se seleccionaron secuencias de nucleótidos reportadas en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information, en inglés; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de genes que codifican para proteínas *GLUT* presentes en otros cnidarios. Mediante un alineamiento **BLAST** (por sus siglas en inglés, Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local; (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>),) (Altschul *et al.*, 1997), se buscaron secuencias de nucleótidos con homología a los fragmentos amplificados de los genes que codifican para las proteínas *GLUT-3* (>TRINITY_DN109051) y *GLUT-8* (Transcript (3204 bp)/CDS Sequence (1545 bp)) de *C. xamachana*. Para *GLUT-3*, el alineamiento indicó que las secuencias amplificadas tenían un porcentaje de identidad arriba del 50 % con la secuencia del transportador *GLUT 1 y 3* en otros cnidarios y un porcentaje de identidad de 70.37 % con la secuencia del transportador facilitador de glucosa *GLUT-3* del cnidario *Actinia tenebrosa* (Tabla 13). Para *GLUT-8*, el alineamiento indicó que las secuencias amplificadas tenían un porcentaje de identidad arriba del 50 % con la secuencia del transportador *GLUT-8* en otros cnidarios y un porcentaje de identidad de 75 % con la secuencia del transportador facilitador de glucosa *GLUT-8* del cnidario *Stylophora pistillata* (Tabla 14).

Tabla 13. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador facilitador de glucosa *GLUT-3* en *C. xamachana* en comparación con secuencias de otros cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>GLUT-3</i>	<i>Actinia tenebrosa</i>	0.001	70.37 %	XM_031698557.1
<i>GLUT-3</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	9e-05	68.97 %	XM_032374881.1
<i>GLUT-3</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	1e-04	68.97 %	XP_002162640.3
<i>GLUT-1</i>	<i>Exaiptasia diaphana</i>	0.008	59.26 %	XM_021058085.2
<i>GLUT-1</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	0.044	48.72 %	XM_027191065.1

Tabla 14. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador facilitador de glucosa *GLUT-8* en *C. xamachana* en comparación con secuencias de otros cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>GLUT-8</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	0.010	75.00 %	PFX26081.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	0.004	74.19 %	PFX26078.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	0.016	70.97 %	XP_032240204.1
<i>GLUT-8</i>	<i>Acropora millepora</i>	0.027	58.97 %	XP_029202863.2
<i>GLUT-8</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	0.044	57.89 %	XP_027055162.1

A partir de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos secuenciados de *GLUT-3* y *GLUT-8* de *C. xamachana* se hizo un alineamiento en el programa **Clustal Omega** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con la secuencia de aminoácidos de los transportadores *GLUT-3* y *GLUT-8* identificados en el transcriptoma de *C. xamachana*. En este alineamiento se identificaron los motivos conservados **PETK**, **GR** y **GK** (G= glicina, R= arginina, P= prolina, E= ácido glutámico, T= treonina y K= lisina) característicos de estas proteínas y que cumplen la función del transporte de azúcar (Figura 47). El porcentaje de identidad en el alineamiento de la secuencia de nucleótidos del transcriptoma de *C. xamachana* con la secuencia de *GLUT-3* secuenciado fue del 69% (Figura 48). Para *GLUT-8*, el porcentaje de identidad en el alineamiento de la secuencia de nucleótidos del transcriptoma de *C. xamachana* con la secuencia de *GLUT-8* secuenciado fue del 98% (Figura 49).

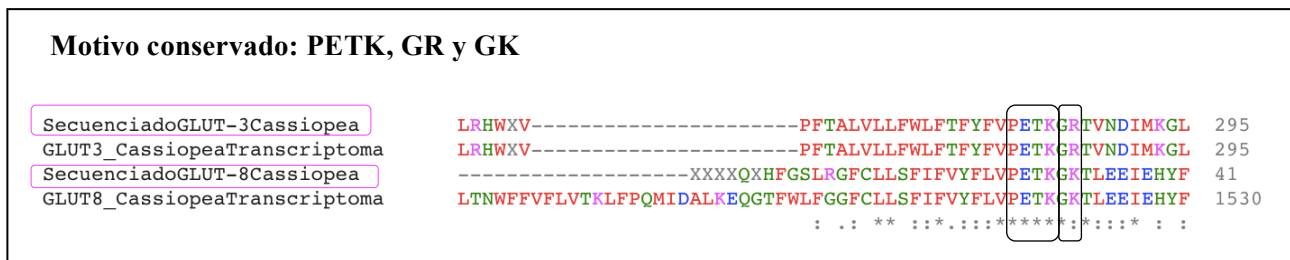


Figura 47. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de *GLUT-3* y *GLUT-8* a partir del transcriptoma de *C. xamachana*. Se observan los motivos conservados PETK, GR y GK (G=glicina, R=arginina, P= prolina, E= ácido glutámico, T= treonina y K= lisina) traducidos a partir de los fragmentos secuenciados de los transportadores *GLUT-3* y *GLUT-8*. El alineamiento se realizó con el programa Clustal Omega.

Fragmento	Valor E	Identidad %	Longitud
<i>GLUT-3</i>	4e-07	75/109 (69%)	139 pb
<i>GLUT-3_Transcriptoma</i>	42	GTTCTATTTT GTTTCCTGAAACAAAGGGTAG -----AACCG-TC-AATG-ACATCATGAA	92
<i>GLUT-3_Secuenciado</i>	10	GTTCTATTTT GTTTCNTGAAGCACACGTGAGTTATGNAGCCNCTCGAATGCACATCATGAA	69
<i>GLUT-3_Transcriptoma</i>	3	AGG-ATTAGAA-AAGAAGAGTTACGGAGCAACTGCTCAGAGAGAAGATG	139
<i>GLUT-3_Secuenciado</i>	70	AGGGATTAGAAGANNNGANAAAAGGGATCANNNGCTCAGAGAGANGATG	118

Figura 48. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *GLUT-3* del transcriptoma de *C. xamachana* con el fragmento secuenciado. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado correspondiente al transportador *GLUT-3* con la secuencia de *GLUT-3* en el transcriptoma de *C. xamachana*. El porcentaje de identidad en el alineamiento fue de 69%. Se ubica la región conservada PETK (recuadro azul).

Fragmento	Valor E	Identidad %	Longitud
<i>GLUT-8</i>	5e-71	143/146 (98%)	189 pb
<i>GLUT-8_Transcriptoma</i>	45	AGGCACATTTTGGCTCTTTG-GTGGTTTTTGCCTTTTAAAGTTTCATATTTGTGTACTIONTTT	103
<i>GLUT-8_Secuenciado</i>	14	AGGCNCATTTTGGCTCTTTGCGGGTTTTTGCCTTTTAAAGTTTCATATTTGTGTACTIONTTT	73
<i>GLUT-8_Transcriptoma</i>	104	TT GTTCCAGAAACAAAGGGAAAACTCTTGAGGAAATGAACATTATTTCTCTGAGGGAT	163
<i>GLUT-8_Secuenciado</i>	74	TTGTTCCAGAAACAAAGGGAAAACTCTTGAGGAAATGAACATTATTTCTCTGAGGGAT	133
<i>GLUT-8_Transcriptoma</i>	164	ATTTTCCTACTGAGACTGTGCGAGAT	189
<i>GLUT-8_Secuenciado</i>	134	ATTTTCCTACTGAGACTGTGCGAGAT	159

Figura 49. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *GLUT-8* del transcriptoma de *C. xamachana* con el fragmento secuenciado. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado correspondiente al transportador *GLUT-8*, con la secuencia de *GLUT-8* en el transcriptoma de *C. xamachana*. El porcentaje de identidad en el alineamiento fue de 98%. Se ubica la región conservada PETK (recuadro azul).

2.18 Identificación de los fragmentos amplificados de los genes *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2*

Para corroborar la identidad de los fragmentos que amplifican para las secuencias de los genes *AQGP9-1* y *AQGP9-2*, mediante PCR en punto final se verificó que el fragmento amplificado sólo dieran los productos de 177 pb y 180 pb, respectivamente usaron como molde cADN de *C. xamachana* (Figuras 50 A y 51 A). Como controles negativos se usaron ADN de bacterias y de simbionte (*Symbiodinium* KB8) y un control negativo sin cADN, los cuales no reflejaron ningún producto de amplificación. Para la secuenciación de los fragmentos amplificados de la *AQGP-9-*

gen1 y *AQGP-9-gen2*, se hicieron cuatro reacciones con los productos esperados de 177 pb y 180 pb, respectivamente usando cADN como molde (Figura 50 B y 51 B). Los fragmentos amplificados para *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* fueron purificados del gel de agarosa en las cuatro reacciones (Figuras 50 C y 51 C). Estos fragmentos amplificados y purificados fueron usados para la reacción de ligación. El ligado se transformó en células químico competentes de *E. coli* TOP 10, dicho procedimiento se describe en los métodos (sección 7.17) (Figuras 50 D y 51 D). Se hizo una PCR en colonia seleccionando algunas clonas con los insertos de *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* y se observaron los productos esperados de 177 pb y 189 pb, respectivamente (Figuras 50 E y 51 E). Se purificaron los plásmidos (Figuras 50 F y 51 F), y las clonas se secuenciaron en el Instituto de Fisiología celular de la UNAM, usando cebadores universales.

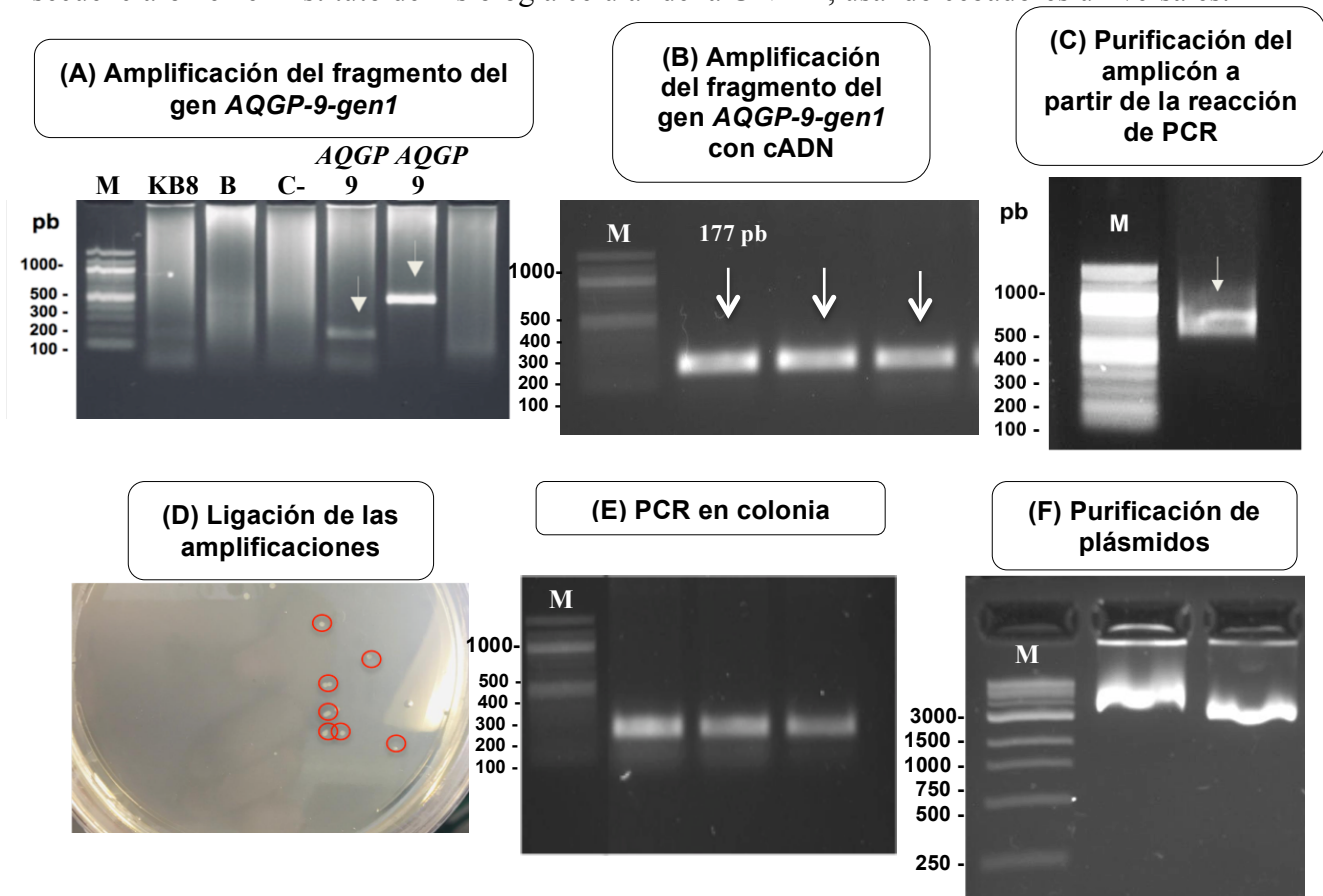


Figura 50. Amplificación, clonación y secuenciación de *AQGP-9-gen1*. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los cebadores *CxAQ61F* y *CxAQ62R*. En las reacciones esperadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado de 177 pb. En los controles negativos (-) con ADN molde de *Symbiodinium* (KB8) y ADN de bacterias (B) así como en el control negativo (-) sin ADN molde no se detectaron productos de amplificación. **M**: marcador de peso molecular de 100 pb Quick-Load® 100 pb ADN. (B) Productos de amplificación del fragmento que codifica para la proteína *AQGP-9-gen1* usados para la purificación en gel. (C) Purificación de ADN de los amplicones generados para el fragmento del gen que codifica para *AQGP-9-gen1*. (D) Ligación y transformación del inserto del fragmento del gen *AQGP-9-gen1* en células químico competentes de *Escherichia coli* TOP 10. (E) PCR en colonia. (F) Plásmidos purificados con el inserto del fragmento del gen *AQGP-9-gen1*.

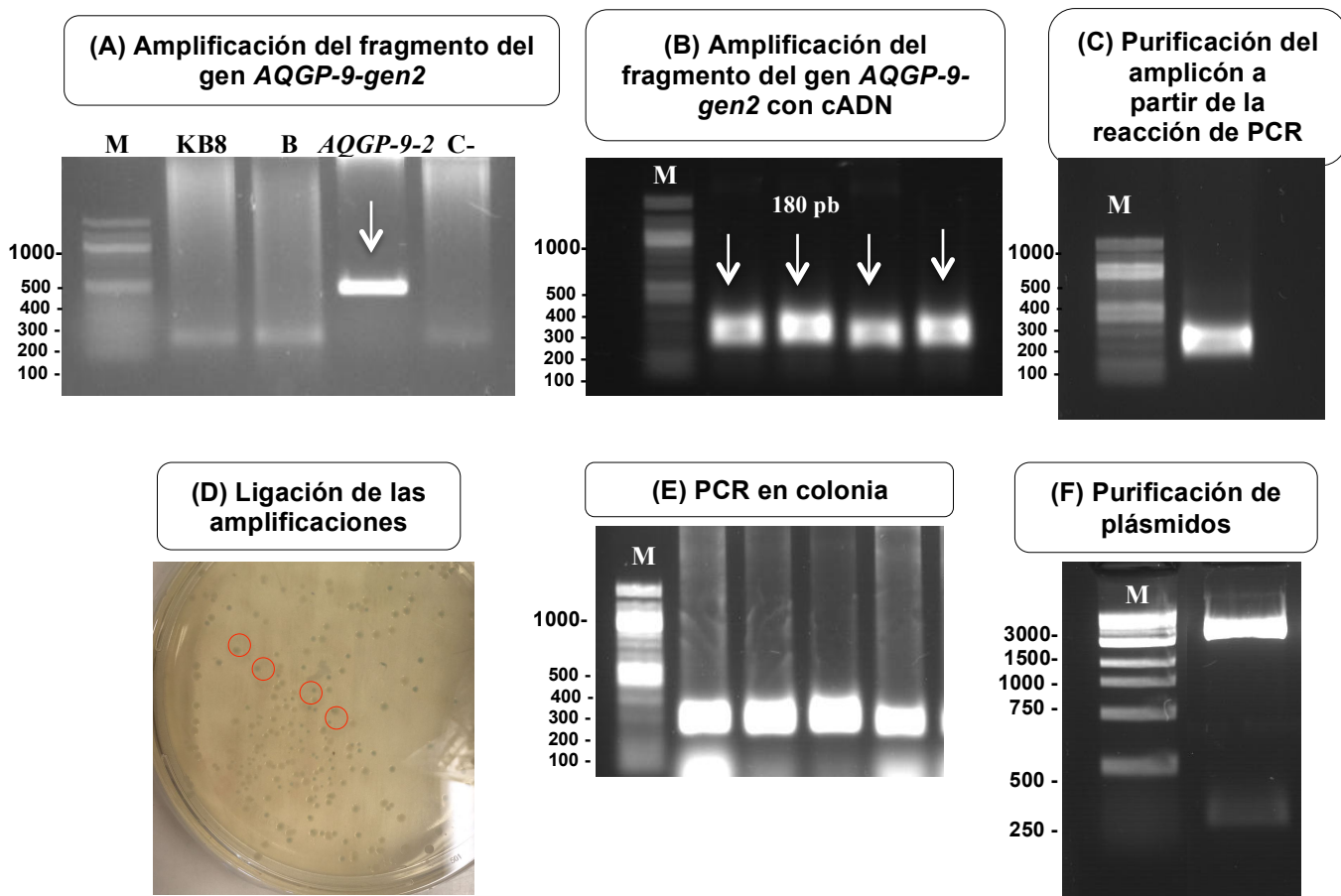


Figura 51. Amplificación, clonación y secuenciación de *AQGP-9-gen2*. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación realizada con los cebadores CxAQ63F y CxAQ64R. En las reacciones esperadas se observa un producto de amplificación único del tamaño esperado de 180 pb. En los controles negativos (-) con ADN molde de *Symbiodinium* (KB8) y ADN de bacterias (B) así como en el control negativo (-) sin ADN molde no se detectó ningún producto de amplificación. **M:** marcador de peso molecular de 100 pb Quick-Load® 100 pb ADN. (B) Productos de amplificación de *AQGP-9-gen2* usados para la purificación en gel. (C) Purificación de ADN de los amplicones generados para el fragmento del gen que codifica para *AQGP-9-gen2*. (D) Ligación y transformación del inserto del fragmento del gen que codifica para *AQGP-9-gen2* en células químico competentes de *Escherichia coli* top 10. (E) PCR en colonia. (F) Plásmidos purificados con el inserto del fragmento del gen que codifica para *AQGP-9-gen2*.

2.19 Secuenciación para la identificación de *AQGP-9* en *C. xamachana*

Para la identificación del fragmento amplificado correspondiente al fragmento del gen que codifica para las proteínas *AQGP-9-gen1* (Transcript (807 bp)/CDS Sequence (807 bp)) y *AQGP-9-gen2* (Transcript (945 bp)/CDS Sequence (945 bp)) la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada gen amplificado fue traducida a aminoácidos (usando el programa ExPASy, Sistema Experto de

Análisis de Proteínas). Por otro lado, se seleccionaron secuencias de nucleótidos reportadas en la base de datos NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de genes que codifican para proteínas transportadoras de glicerol (*AQGP*) presentes en otros cnidarios. Mediante un alineamiento **BLAST** (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) se buscaron secuencias de nucleótidos con homología a los fragmentos de genes amplificados que corresponden a *AQGP-9* en *C. xamachana*. Para *AQGP9-gen1* y *AQGP-9-gen2*, el alineamiento indicó que los fragmentos de los genes amplificados tenían un porcentaje de identidad arriba del 50% con la secuencia del gen que codifica para transportadores *AQGP-9* de otros cnidarios. Para el gen 1 de *AQGP-9* el porcentaje de identidad fue de 75 % con la secuencia del fragmento del gen que codifica para transportador *AQGP-9* de *Hydra vulgaris* (Tabla 15) y para *AQGP-9-gen2*, el porcentaje de identidad fue de 61.67 % con la secuencia del fragmento del gen que codifica para el transportador *AQGP-9* de *Nematostella vectensis* (Tabla 16).

Tabla 15. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador de glicerol *AQGP-9-gen1* en *C. xamachana* en comparación con secuencias de otros cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>AQGP-9</i>	<i>Hydra vulgaris</i>	2e-20	75.00 %	XP_002156497.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	2e-14	50.75 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Acropora digitifera</i>	1e-12	50.75 %	XP_015764992.1

Tabla 16. Identidad de la secuencia del fragmento amplificado del transportador de glicerol *AQGP-9-gen2* en *C. xamachana* en comparación con secuencias de otros cnidarios.

Descripción	Especie	Valor E	% Identidad	Número de acceso
Cnidarios				
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	5e-13	61.67 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	2e-13	60.32 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-9</i>	<i>Stylophora pistillata</i>	3e-11	58.33 %	XP_032242959.1
<i>AQGP-7</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	3e-12	58.73 %	XP_027047621.1
<i>AQGP-3</i>	<i>Pocillopora damicornis</i>	8e-12	58.73 %	XP_027040161.1

A partir de las secuencias de aminoácidos traducidas a partir de los fragmentos secuenciados de *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* de *C. xamachana* se hizo un alineamiento en el programa **Clustal Omega** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con las secuencias traducidas a partir de los ARN de los transportadores *AQGP-9* identificados en el transcriptoma de *C. xamachana*. En este alineamiento se identificó el motivo conservado **NPARDL** (N = asparagina, P = prolina, A = alanina, R = arginina, D = ácido aspártico y L = leucina) característicos de estas proteínas y que cumplen la función del transporte de glicerol (Figura 52). El porcentaje de identidad en el alineamiento de la secuencia de nucleótidos del transcriptoma de *C. xamachana* con la secuencia de *AQGP-9-gen1* secuenciado fue del 99% (Figura 53). Para *AQGP-9-gen2*, el porcentaje de identidad en el alineamiento de la secuencia de nucleótidos del transcriptoma de *C. xamachana* con la secuencia de *AQGP-9-gen2* secuenciado fue del 98% (Figura 54).



Figura 52. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos traducidas de *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* traducidos a partir del transcriptoma de *C. xamachana*. Se observan el motivo conservado NPARDL (N: asparagina, P: prolina, A: alanina, R: arginina, D: ácido aspártico y L: leucina) en los fragmentos de las secuencias correspondientes a los transportadores *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2*. El alineamiento se realizó con el programa Clustal Omega.

Fragmento	Valor E	Identidad %	Longitud
<i>AQGP-9-gen1</i>	4e-49	100/101 (99%)	876 pb

AQGP-9-1_Transcriptoma	97	TGAT CAGCTTCTTGCAACTGCC ATATTTGTTGGTACTATCTTTGCACTACTTGACAACAA	156
AQGP-9-1_Secuenciado	232	TGATCAGCTTCTTGCAACTGCCATATTTGTTGGTACTATCTTTGCACTACTTGACAACAA	173
AQGP-9-1_Transcriptoma	157	GAACATTGGGCCTGGTTCTAACATGGCACCTCTGCTGATTG	197
AQGP-9-1_Secuenciado	172	GAACATTGGGCCTGGCTCTAACATGGCACCTCTGCTGATTG	132

Figura 53. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *AQGP-9-gen1* del transcriptoma de *C. xamachana* con el fragmento secuenciado para cada gen. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado correspondiente al transportador *AQGP-9-gen1*, con la secuencia de *AQGP-9-gen1* en el transcriptoma de *C. xamachana*. El porcentaje de identidad en el alineamiento fue de 99%. Se ubica la región conservada NPARDL (recuadro azul).

Fragmento		Valor E	Identidad %	Longitud
<i>AQGP-9-gen2</i>		1e-91	178/180 (99%)	180 pb
<i>AQGP-9-2_Transcriptoma</i>	1	GATCAGGTTTTTGGCCACTATGATTCTTGTTCAGTACGATTTTCGCATTGACTGACAGAAAA		60
<i>AQGP-9-2_Secuenciado</i>	1	GATCAGGTTTTTGGCCACTATGATTCTTGTTCAGCACGATCTTCGCATTGACTGACAGAAAA		60
<i>AQGP-9-2_Transcriptoma</i>	61	AACAATGGCGTTGATTTCGACGCAGCTGCCGTTTATGGTTGGGTGCCTCGTTTGGGTTATT		120
<i>AQGP-9-2_Secuenciado</i>	61	AACAATGGCGTTGATTTCGACGCAGCTGCCGTTTATGGTTGGGTGCCTCGTTTGGGTTATT		120
<i>AQGP-9-2_Transcriptoma</i>	121	GGCATGACAATGGGGCTCAATTGTGGTTATGGAATCAACCCAGCACGTGATCTTATCCCA		180
<i>AQGP-9-2_Secuenciado</i>	121	GGCATGACAATGGGGCTCAATTGTGGTTATGGAATCAACCCAGCACGTGATCTTATCCCA		180

Figura 54. Alineamiento de secuencia de nucleótidos de *AQGP-9-gen2* del transcriptoma de *C. xamachana* con el fragmento secuenciado para cada gen. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado correspondiente al transportador *AQGP-9-gen2*, con la secuencia de *AQGP-9-gen2* en el transcriptoma de *C. xamachana*. El porcentaje de identidad en el alineamiento fue de 99%. Se ubica la región conservada NPARDL (recuadro azul).

2.20 Detección de la concentración de cADN para los ensayos de q-PCR cuantitativa

Se hizo una PCR en punto final del fragmento identificado del gen Factor de Elongación 1 alfa y se usaron los cebadores del fragmento identificado del gen *GLUT-3* y el mix del SYBR-Green, con la finalidad de determinar la concentración de cADN que no saturara la reacción de RT-PCR (Figura 55). De este modo se determinó que una concentración de 20 ng de cADN fue la adecuada para los ensayos de PCR cuantitativa. Las condiciones de PCR para la detección de la concentración de cADN fueron las siguientes: Un ciclo de 95 °C durante 10 min, 40 ciclos: 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 30 s y un ciclo de extensión final de 72 °C por 1 min.

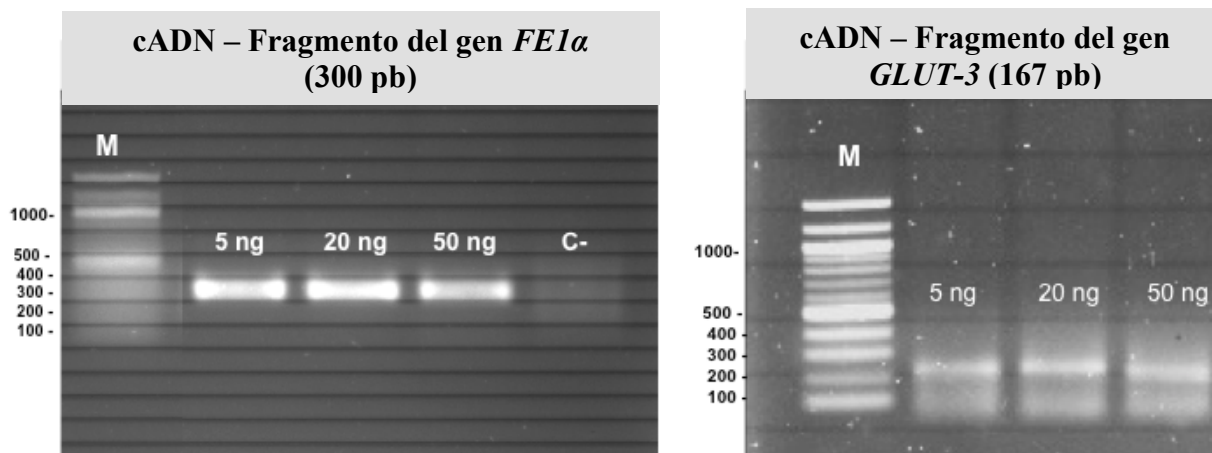


Figura 55. Detección de la concentración de cADN usado como templado para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Se detectaron productos de amplificación para *FE1a* y *GLUT-3*, usando 5 ng, 10 ng y 50 ng de cADN como templado. Se observa un producto de amplificación adecuado para cada tipo de concentración.

2.21 Ensayo RT-PCR: Gráficas de cinética de amplificación de secuencias correspondientes a los genes *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1*, *AQGP-9-gen2* y *FE1a*

Mediante RT-PCR usando como fluoróforo reportero SYBR-Green y 20 ng de cADN de *C. xamachana* en cada reacción de amplificación, se cuantificó la expresión del fragmento correspondiente a los genes *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1*, *AQGP-9-gen2* y *FE1a* en medusas control (C1, C2 y C3) (Figuras 56, 59 y 61) y blanqueadas (M1, M2, M3 y M4) (Figuras 57, 58, 60 y 61) al día 0, día 14 y día 21. Durante el proceso de amplificación, se distinguieron tres fases: 1) geométrica en donde la eficiencia de la reacción era del 100% y la cinética de amplificación tuvo un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de ADN se generaron 2 moléculas de ADN; 2) la fase lineal o exponencial; y 3) fase meseta en donde la cantidad de producto de amplificación para cada gen fue constante. El umbral o línea base (threshold, en Inglés) de la curva de amplificación en donde el cambio en la señal de fluorescencia es mínimo, se seleccionó automáticamente para que las muestras pudieran ser comparadas entre sí. Se buscó que la línea base se encontrara por encima de la fluorescencia de referencia (ruido de fondo) y por debajo de la fase de meseta para obtener de manera adecuada el valor de C_T (ciclo de cuantificación) para cada reacción y en donde el número de ciclo en el que la emisión de fluorescencia (ΔR_n) estaba significativamente por encima del fondo. De este modo, fue posible estimar la cantidad de templado, es decir cADN o ARN mensajero (ARNm) inicial para cuantificar *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1*, *AQGP-9-gen-2* y *FE1a*. Mientras mayor fue la cantidad de templado ARNm para cada gen y tipo de muestra, menor número de ciclos (C_T) fueron requeridos para alcanzar el umbral de detección; diferencias en un C_T indicaron el doble o la mitad de cantidad de templado inicial.

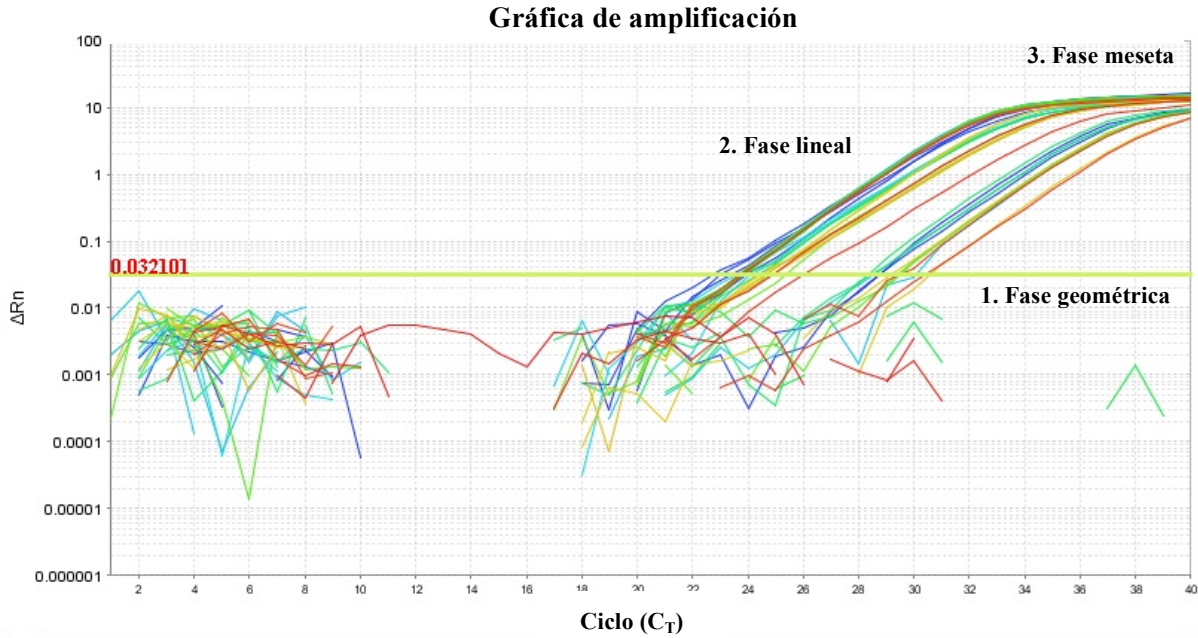


Figura 56. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *GLUT-3*, *GLUT-8* y *FE1a*. Amplificación de muestras de medusas control C1, C2 y C3 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado acumuló suficiente fluorescencia (ΔRn) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.032101.

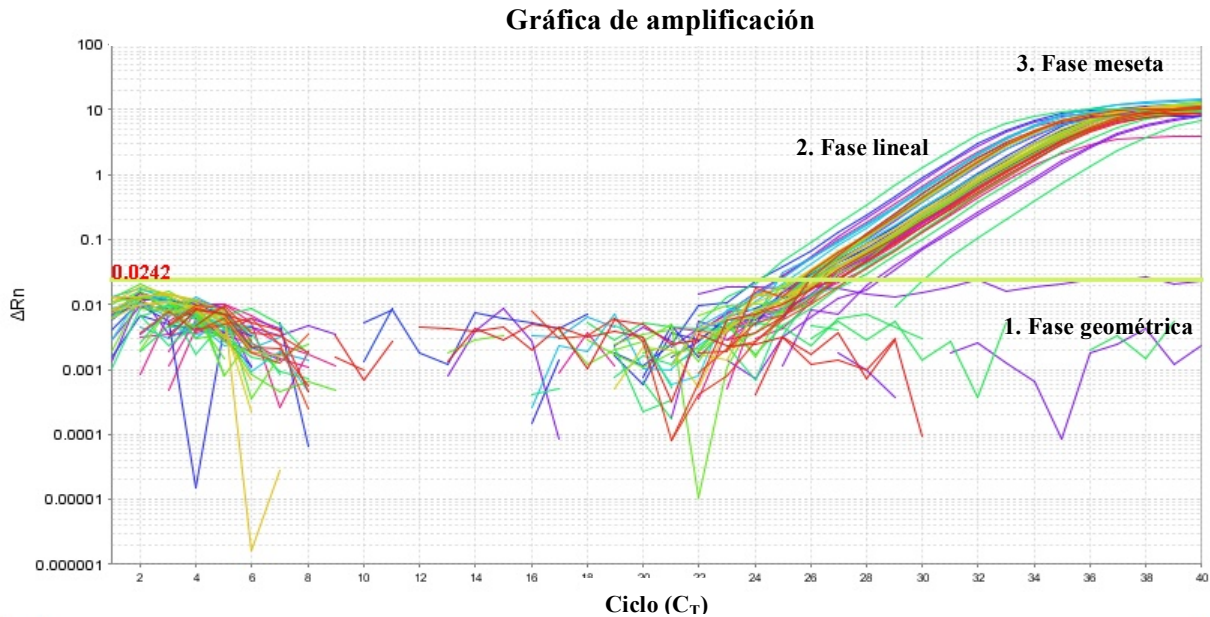


Figura 57. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *GLUT-3*, *GLUT-8* y *FE1a*. Amplificación de muestras de medusas blanqueadas M1 y M2 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado acumuló suficiente fluorescencia (ΔRn) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.0242.

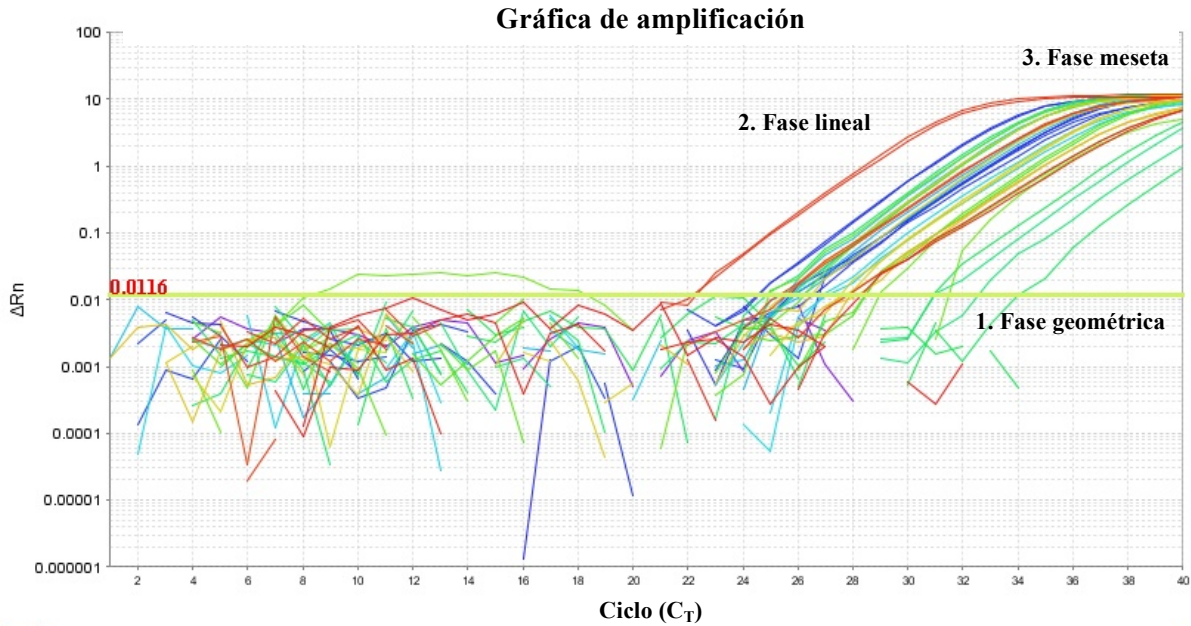


Figura 58. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *GLUT-3*, *GLUT-8* y *FE1a*. Amplificación de muestras de medusas blanqueadas M3 y M4 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado acumuló suficiente fluorescencia (ΔR_n) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.0116.

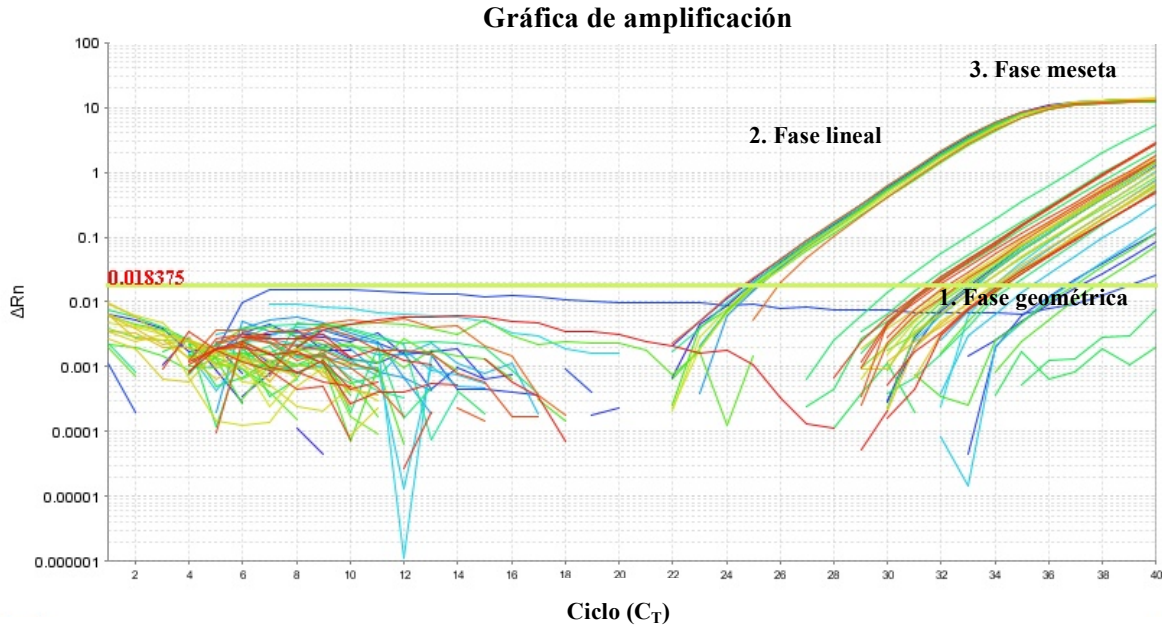


Figura 59. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *AQGP-9-gen1* y *FE1a*. Amplificación de muestras de medusas control C1, C2 y C3 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado para cada gen acumuló suficiente fluorescencia (ΔR_n) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.018375.

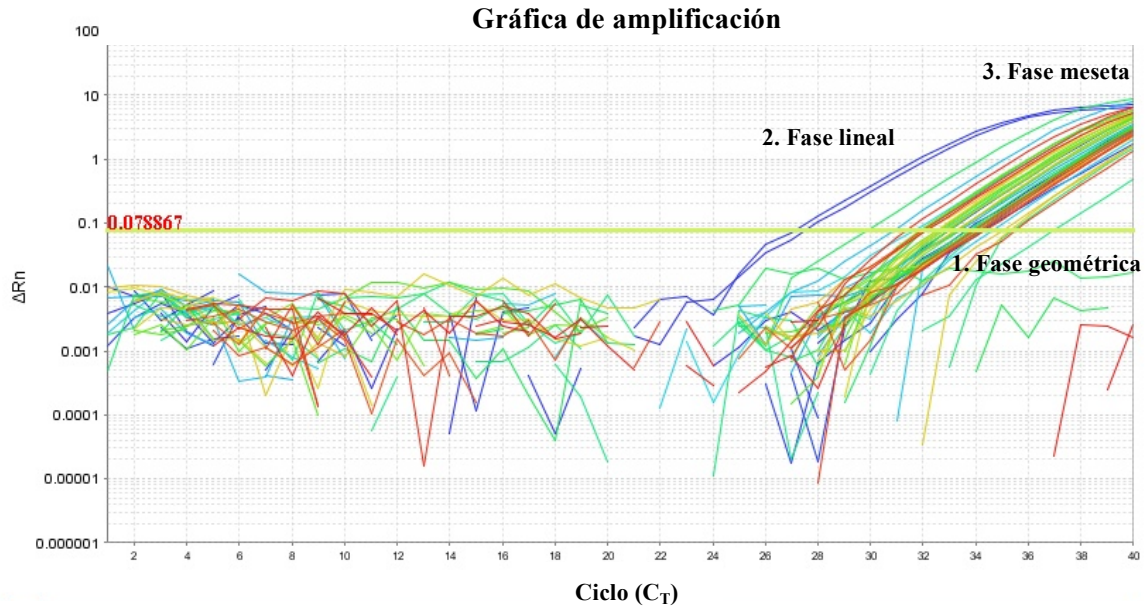


Figura 60. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *AQP-9-gen1* y *FE1a*. Amplificación para las muestras de medusa blanqueadas M1, M2 M3 y M4 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado acumuló suficiente fluorescencia (ΔRn) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.078867.

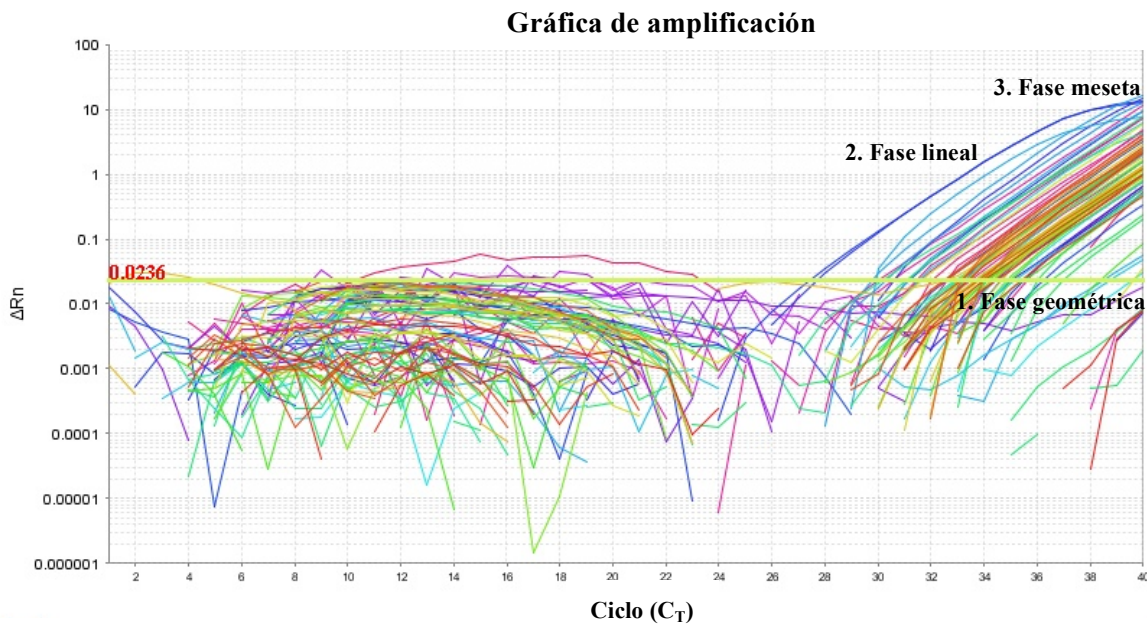


Figura 61. Gráfica de cinética de amplificación en tiempo real de los fragmentos amplificados de *AQP-9-gen2* y *FE1a*. Amplificación de muestras de medusas control C1, C2 y C3 y medusas blanqueadas M1, M2, M3 y M4 usando 20 ng de cADN como molde al día 0, día 14 y día 21. Se observa la línea base que pasó gradualmente a la región exponencial (lineal) seguida de la meseta que indicó que la amplificación se estaba reduciendo, así como el número de ciclos (C_T) en el que el cADN de las muestras amplificado para cada gen acumuló suficiente fluorescencia (ΔRn) para cruzar el umbral. Valor del umbral de detección: 0.0236.

2.22 Curvas de fusión (disociación o curva melting) de amplificación del fragmento de los genes que codifican para *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-1*, *AQGP-9-2* y *FE1 α* .

Durante la PCR cuantitativa (RT-PCR), el agente reportero SYBR-green emitió la señal de fluorescencia y se intercaló en las moléculas de ADN generadas en cada ciclo de amplificación para cada cADN (medusas blanqueadas: M1, M2, M3 y M4 y control: C1, C2 y C3). Se realizó el proceso de validación con la finalidad de corroborar que un solo producto de amplificación fuera generado y que la fluorescencia registrada correspondiera al producto de amplificación para cada cADN de cada muestra y gen en particular y no a productos inespecíficos o dímeros de cebadores. Para demostrar esto, después del proceso de amplificación, se realizó el ensayo de disociación (curva melt), en donde la temperatura (T_m) incrementó gradualmente a 95°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso. Al incrementar la temperatura, las cadenas de ADN se desnaturalizaron gradualmente, disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada, al llegar a la T_m del amplicón esperado para cada gen, la velocidad de disociación incrementó drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encontraba desnaturalizado y la curva de disociación presentó un punto de inflexión a diferente temperatura para cada gen.

En la curva de disociación de productos específicos de RT-PCR con el par de cebadores para el fragmento del gen *FE1 α* , al usar SYBR-Green la T_m osciló entre 79.93 °C y 79.78 °C para muestras control y blanqueadas, respectivamente (Figura 62 A y B). En la curva de disociación de productos específicos de q-PCR para *GLUT-3* la T_m osciló entre 75.02 °C y 73.69 °C (control y blanqueadas), respectivamente (Figura 62 C y D). Para *GLUT-8* la T_m osciló entre 76.96 °C y 76.96 °C (control y blanqueadas), respectivamente (Figura 62 E y F). Para *AQGP-9-gen1* la T_m osciló entre 79.34 °C y 79.40 °C (control y blanqueadas), respectivamente (Figura 62 G y H). Para *AQGP-9-gen2* la T_m osciló entre 83.35 °C y 83.65 °C (control y blanqueadas), respectivamente (Figura 62 I y J). Se observó un solo pico de disociación a la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación de todos los genes.

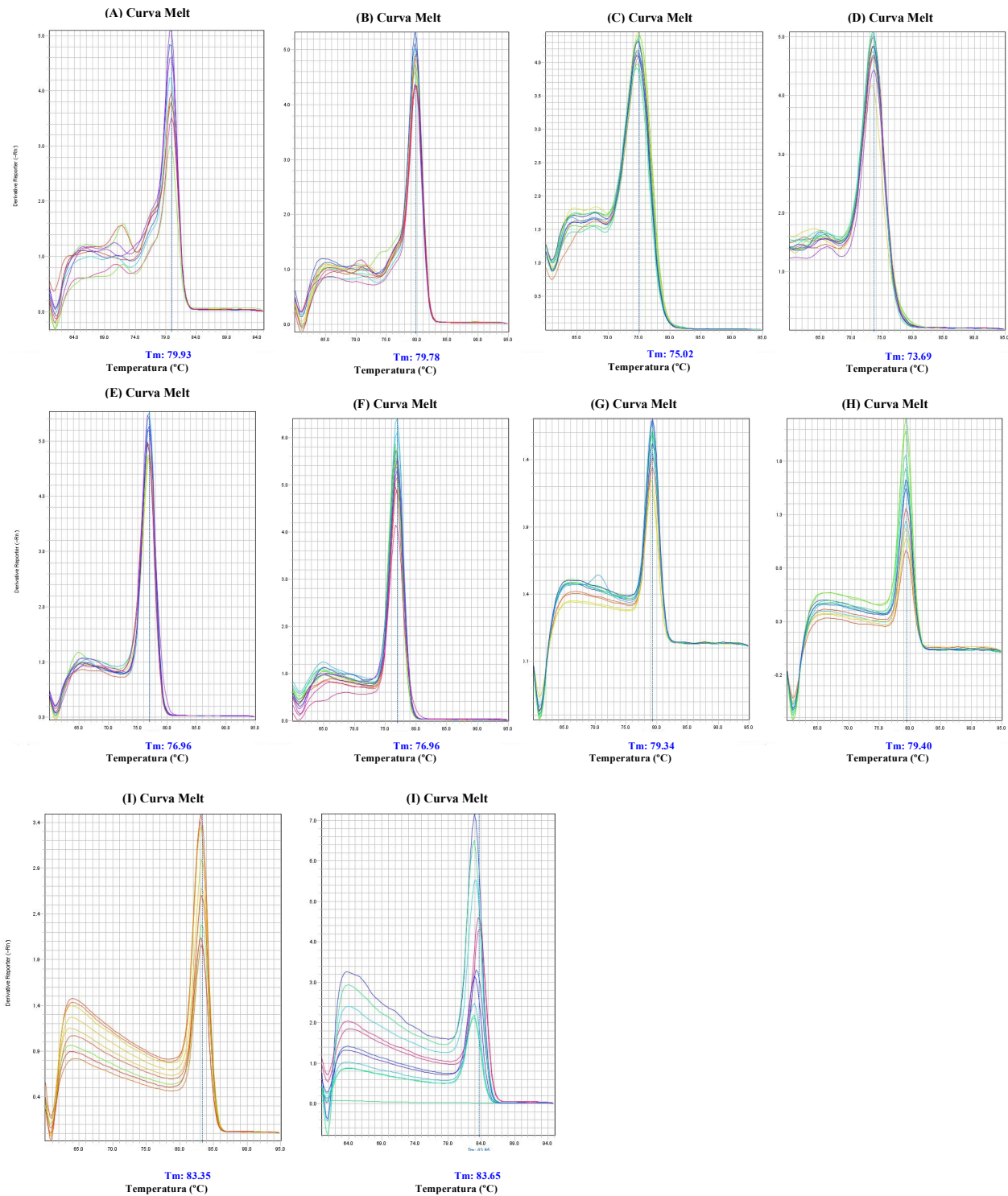


Figura 62. Curvas de disociación de productos específicos de RT-PCR con el par de oligonucleótidos para los fragmentos amplificados de *FE1a* (A-B), *GLUT-3* (C-D), *GLUT-8* (E-F), *AQGP-9-gen1* (G-H) y *AQGP-9-gen2* (I-J) usando SYBR-Green como reportero. El pico representa el valor de la temperatura (T_m) del producto de PCR específico correspondiente a muestras de cADN de medusas control (A, C, E, G, I) y blanqueadas (B, D, F, H, J). Se muestra el valor de la temperatura (T_m) del producto de PCR específico correspondiente a cada tipo de muestra.

2.23 Niveles de expresión de los fragmentos de los genes codificantes para transportadores *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* en medusas simbióticas y blanqueadas

Se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm de los fragmentos codificantes para transportadores *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* mediante RT-PCR usando el fragmento del gen que codifica para *FE1 α* como referencia, mediante el método comparativo ΔC_T (Tabla 17).

Tabla 17. Valores de C_T del método comparativo (ΔC_T) del gen de referencia *FE1 α* con los genes blanco al día 0 (T0), día 14 (T14) y día 21 (T21).

GEN	T0	T0	T14	T14	T21	T21
	Control	Bleach	Control	Bleach	Control	Bleach
<i>GLUT-3</i>	-4.36258	-3.93108	-3.34958	-4.25175	-5.6075	-3.52868
<i>GLUT-3</i>	-4.38808	-4.81408	-4.20008	-4.05125	-4.26408	-4.16918
<i>GLUT-3</i>	-4.76158	-5.68325	-4.13558	-3.74575	-4.66608	-3.62368
<i>GLUT-8</i>	-2.80258	-3.70425	-2.39508	-3.61275	-3.85208	-2.58968
<i>GLUT-8</i>	-5.87208	-3.77675	-4.65008	-4.91775	-5.74658	-3.56668
<i>GLUT-8</i>	-5.78358	-5.47475	-5.62758	-2.14625	-5.70408	-1.04518
<i>AQGP-9-1</i>	2.03491	4.10025	4.50441	5.86641	3.61291	3.75841
<i>AQGP-9-1</i>	2.52391	3.35625	4.04541	4.66541	7.642	4.69025
<i>AQGP-9-1</i>	1.32341	2.65225	6.43091	4.86641	3.74291	4.75141
<i>AQGP-9-2</i>	-0.329	4.55012	-0.325	-0.81333	2.57	1.63
<i>AQGP-9-2</i>	-1.915	1.46512	0.01	-1.43833	-0.035	-1.08
<i>AQGP-9-2</i>	-0.493	2.31512	0.341	1.59	2.845	-0.42

Mediante el método CT comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ se confirmó la expresión relativa de los fragmentos génicos codificantes de *GLUT-3* (1 ± 0), *GLUT-8* (1 ± 0), *AQGP-9-gen1* (1 ± 0) y *AQGP-9-gen2* (1 ± 0) de muestras control de medusas simbióticas al día 0 (Ctrl-T0) (Figura 63 B, Tabla 17). Estas medusas contaban con una densidad de simbiontes de 1.023×10^7 células $ml^{-1}g^{-1}$ (Figura 63 A). En el día 14 (Ctrl-T14) en medusas control, se observó una disminución en los niveles de expresión relativa de los fragmentos codificantes para *GLUT-3* (0.673 ± 0.111), *GLUT-8* (0.693 ± 0.138) y *AQGP-9-gen2* (0.607 ± 0.213) respecto al control tiempo 0, sin embargo las diferencias significativas sólo se presentaron en los valores de los niveles de expresión de *AQGP-9-gen1* (0.185 ± 0.092) que disminuyó su nivel de expresión (Figura 63 B, Tabla 18; Anexo 3. Tabla 1: ANOVA de una vía: $p < 0.001$). En estas muestras de medusas control al día 14 la densidad de

simbiontes fue menor que al tiempo inicial con 1.008×10^7 células $\text{ml}^{-1}\text{g}^{-1}$ (Figura 63.A). En muestras control del día 21 (Ctrl-T21) se observó un aumento de la expresión relativa de los fragmentos codificantes de *GLUT-3* (1.990 ± 1.063) y *GLUT-8* (1.310 ± 0.379), pero las diferencias no fueron significativas respecto al control T0. Respecto a los valores en los niveles de expresión del fragmento codificante de *AQGP-9-gen1* (0.183 ± 0.088) se mantuvieron bajos y los niveles de expresión del fragmento codificante de *AQGP-9-gen2* (0.168 ± 0.052) también tuvieron valores bajos, presentando diferencias significativas respecto al control del día 0 (T0) (Figura 62 B, Tabla 18-19; Anexo 3. Tabla 1: ANOVA de una vía: $p = < 0.001$). En el día 21 la densidad de simbiontes en medusas control incrementó nuevamente con 1.269×10^7 células $\text{ml}^{-1}\text{g}^{-1}$ (Figura 63 A).

Por otro lado, los datos del CT comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, mostraron cambios significativos en los niveles de expresión de los fragmentos génicos en medusas blanqueadas (Bleach) respecto al control simbiótico. En medusas previas al blanqueamiento del día 0 (Bleach T0) se observó la expresión relativa de los fragmentos génicos de *GLUT-3* (1 ± 0), *GLUT-8* (1 ± 0), *AQGP-9-gen1* (1 ± 0) y *AQGP-9-gen2* (1 ± 0) (Figura 63 B, Tabla 18-19). Estas medusas al inicio contaban con una densidad de simbiontes de 1.536×10^7 células $\text{ml}^{-1}\text{g}^{-1}$ (Figura 63 A). En medusas blanqueadas al día 14 (Bleach-T14) no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de los fragmentos génicos de *GLUT-3* (1.17 ± 0.347) y *GLUT-8* (1.206 ± 0.503) (Figura 63 B, Tabla 18). Los cambios importantes en los niveles de ARNm o de expresión de los fragmentos codificantes, fueron observados para *AQGP-9-gen1* (1.332 ± 0.0816) y *AQGP-9-gen2* (1.517 ± 0.668). Se observó el aumento en los valores de expresión génicos que fueron significativamente diferentes al control simbiótico T14 (Ctrl-T14) (Figura 63.B, Tabla 18; Anexo 3. Tabla 1: ANOVA de una vía: $p = < 0.001$). En estas medusas del día 14, se cuantificó una menor concentración en la densidad de simbiontes de 0.056×10^7 células $\text{ml}^{-1}\text{g}^{-1}$ (Figura 63 A).

Después del día 14, se suspendió el tratamiento de blanqueamiento con azúcares y las medusas pasaron siete días sin alimento y en estado de blanqueamiento hasta los 21 días. El C_T comparativo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ al día 21 (Bleach T21) indicó una disminución de los niveles de expresión de los fragmentos codificantes de *GLUT-3* (0.519 ± 0.395) y *GLUT-8* (0.225 ± 0.210), con valores de niveles de expresión que fueron significativamente diferentes al control simbiótico del día 21 (Ctrl T21) (Figura 63 B, Tabla 18; Anexo 3. Tabla 1: ANOVA de una vía: $p = < 0.001$). Por otro lado, se pudo

observar un aumento en los niveles de expresión de *AQGP-9-gen1* (3.045 ± 0.287) y *AQGP-9-gen2* (2.718 ± 0.654) (Figura 63 B, Tabla 17) con valores de niveles de expresión que también fueron significativamente diferentes al control simbiótico del día 21 (Figura 63 B, Tabla 18; Anexo 3. Tabla 1: ANOVA de una vía: $p = < 0.001$). En este día 21, la densidad de simbiontes se mantuvo en niveles bajos con 0.004×10^7 células $\text{ml}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Figura 63.A), valores que indicaron que las medusas aún se encontraban en estado de blanqueamiento.

Tabla 18. Valores de C_T del método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) de las cuantificaciones de los genes blanco con las muestras tratadas al día 0 (T0), día 14 (T14) y día 21 (T21).

GEN	T0	T14	T21	T0	T14	T21
	Control	Control	Control	Bleach	Bleach	Bleach
<i>GLUT-3</i>	1	0.673 ± 0.111	1.990 ± 1.060	1	1.178 ± 0.347	0.519 ± 0.231
<i>GLUT-8</i>	1	0.693 ± 0.138	1.310 ± 0.379	1	1.206 ± 0.503	0.225 ± 0.108
<i>AQGP-9-1</i>	1	0.185 ± 0.092	0.183 ± 0.088	1	1.332 ± 0.816	3.045 ± 0.166
<i>AQGP-9-2</i>	1	0.607 ± 0.213	0.168 ± 0.052	1	1.517 ± 0.668	2.718 ± 0.654

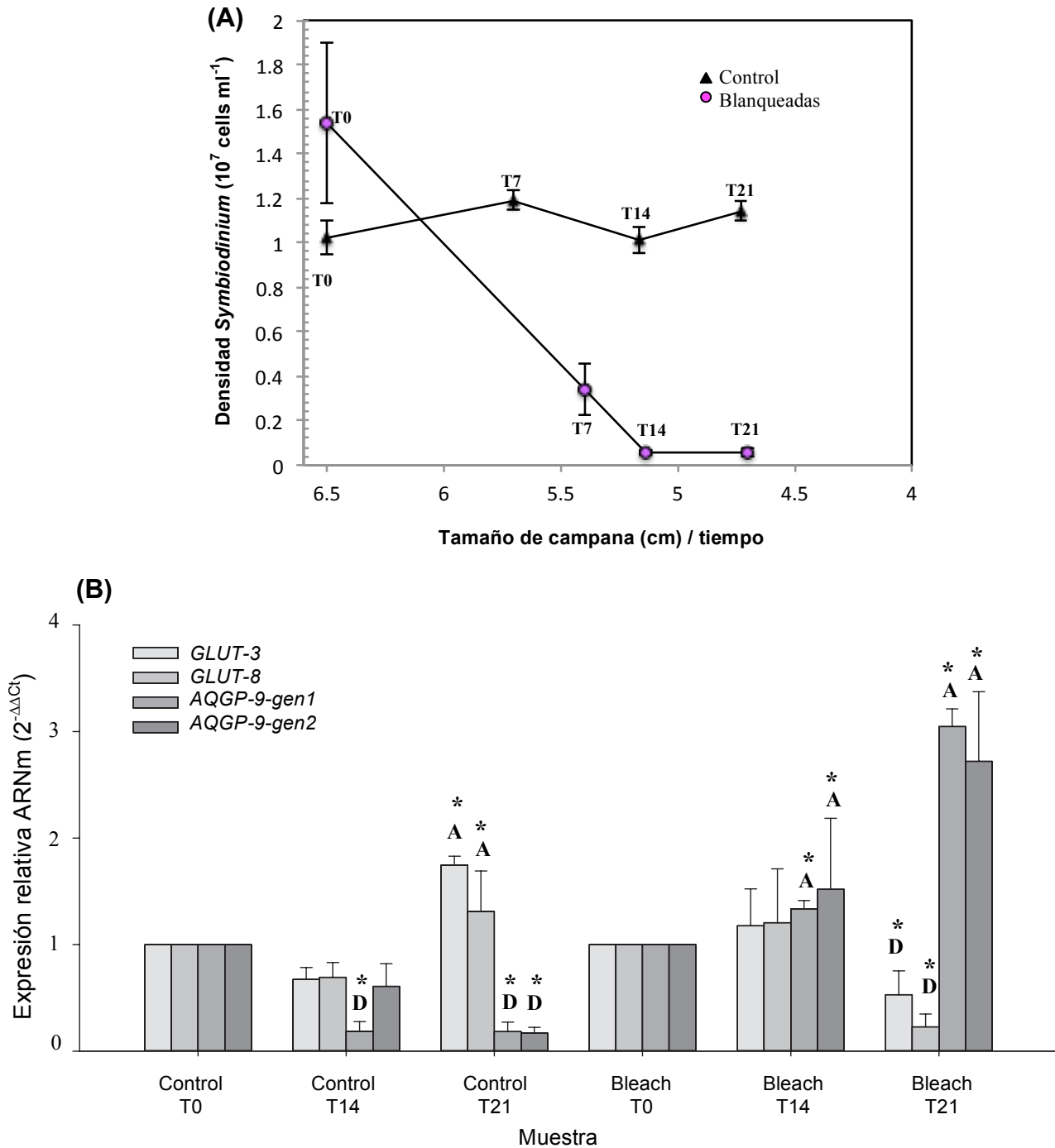


Figura 63. Niveles de expresión génica de secuencias de los fragmentos amplificados de *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQP-9-gen1* y *AQP-9-gen2* en medusas simbióticas (Control) y blanqueadas (Bleach) y cuantificación celular de *Symbiodinium*. **A:** Se observa la cuantificación celular en medusas blanqueadas durante 21 días (círculos rosas) y medusas control (triángulos cerrados) (valores media \pm sem; n= 3) al día 0 (T0), día 14 (T14) y día 21 (T21). **B:** Se observan los niveles de expresión génica de *GLUT-3*, *GLUT-8*, *AQP-9-gen1* y *AQP-9-gen2* en medusas simbióticas (Control) y blanqueadas (Bleach). En donde: **A**= Aumento en los transcritos de ARN mensajero y **D** = Disminución en los transcritos de ARN mensajero. * = Diferencias significativas en los valores de los niveles de expresión de cada gen respecto a su control: Ctrl-T0 vs. Ctrl-T14, Ctrl-T0 vs. Ctrl-T21, Ctrl-T14 vs. Bleach-T14 y Ctrl-T21 vs. Bleach-T21.

DISCUSIÓN

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA *GLUT-3*, *GLUT-8* Y GLICEROL *AQGP-9*

En este estudio evaluamos el efecto de la disminución de simbioses sobre la expresión relativa de proteínas de membrana encargadas del transporte de glucosa y glicerol en el organismo modelo *C. xamachana*. La adición de azúcares como método de blanqueamiento fue previamente discutido en el apartado: discusión parte I, 1.1. En nuestro estudio se usó el método de blanqueamiento con azúcares (Pogoreutz *et al.*, 2017), el cual indujo la reducción de hasta el 99% de la densidad de simbioses en *C. xamachana* seguido de una reducción importante de la biomasa. Como se ha visto en otros estudios las medusas adultas de *C. xamachana* pierden tamaño y peso cuando están blanqueadas (disminución de simbioses) o desprovistas de luz (inhibición de la fotosíntesis) aún cuando exista otro tipo de alimento disponible (Lampert, 2016). Además, la disminución de simbioses en medusas blanqueadas, es un escenario similar a lo que se ha reportado en el estudio de corales simbióticos que fueron estresados por adición de carbono orgánico disuelto (DOC) o por calor (blanqueamiento térmico), en donde el blanqueamiento también implicó la disminución de células simbioses en el hospedero; no obstante, en estos otros estudios también se ha reportado la descomposición del aparato fotosintético del simbiote y la disminución del suministro de nutrientes esenciales hacia el cnidario hospedero (Yonge y Nichols 1931; Goreau y Goreau 1960; Muscatine y Lenhoff 1965; Tchernov *et al.*, 2004; Pogoreutz *et al.*, 2017). Los transportadores tipo *GLUT* actúan por difusión facilitada; tienen afinidades variadas hacia la glucosa y sus genes se inducen o reprimen de acuerdo a la concentración de glucosa (Gremlich *et al.*, 1997). En humanos los transportadores tipo *GLUT-3* se ubican en neuronas y otros tejidos, mientras que *GLUT-8* se presenta en retículo endoplásmico y en lisosomas (Schmidt *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, seleccionamos dentro del genoma de *C. xamachana* dos secuencias de nucleótidos que corresponden a las proteínas transmembrana *GLUT-3* y *GLUT-8* las cuales están asociadas al transporte de glucosa. De acuerdo a diversos autores, estas proteínas podrían estar localizadas en membranas internas, plasmática y posiblemente en la membrana del simbiosoma (Fitt y Trench, 1983; Rands *et al.*, 1993; Wakefield y Kempf, 2001; Uldry y Thorens, 2004; Lehnert *et al.*, 2014; Sproles *et al.*, 2018). En cnidarios se han reportado hasta 23 secuencias que

son homólogas a proteínas *GLUT* que estructuralmente cuentan con 12 dominios transmembrana con los extremos amino (NH₂) y carboxilo (COOH-) y se ubican en el citoplasma, lo cual es una característica típica de las proteínas de la súper familia de facilitadores principales (MFS, en Inglés) donde se agrupan los transportadores *GLUT* (Reddy *et al.*, 2012). En el genoma de *C. xamachana* pudimos identificar ocho genes que potencialmente codifican para transportadores tipo *GLUT*.

En nuestros resultados, el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos traducidas de los genes *GLUT-3* y *GLUT-8* del genoma de *C. xamachana* con secuencias de los transportadores de glucosa *GLUT* en otros cnidarios, permitió la identificación de los genes *GLUT-3* y *GLUT-8* de interés en nuestro estudio mediante el reconocimiento de los motivos conservados GR, GRR y PETK (aminoácidos: G: glicina, R: arginina, P: prolina, E: ácido glutámico, T: treonina y K: lisina). De acuerdo a Joost y Thorens (2001), estos motivos conservados se consideran necesarios para la función de transporte de azúcar. Otros estudios indican que existe un motivo conservado DRXGRR/K (aminoácidos: D = ácido aspártico, R = arginina, G = glicina, K = lisina) entre los segmentos transmembrana (TMH, en inglés) 2 y 3, 8 y 9 que se encuentra en todos los transportadores de azúcar de la familia MFS en donde se ubican los transportadores *GLUT*, y se considera de importancia estructural e igualmente todos parecen estar glicosilados en alguna de sus asas extracelulares (Maiden *et al.*, 1987). En los últimos años, ha habido un incremento en la información de estos transportadores, reconociéndose hasta 14 miembros de *GLUTs* (Bermúdez *et al.*, 2007).

Por otro lado, se identificó un total de 3 genes que potencialmente codifican para acuagliceroporinas tipo *AQGP-9* ó *AQGP-3*. Entre estos, los resultados del alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los genes correspondientes a las proteínas transportadoras de glicerol (acuagliceroporina) de *C. xamachana* contra secuencias de transportadores de glicerol en otros cnidarios, permitió la identificación de secuencias correspondientes a *AQGP-9* de interés en el presente estudio, así como de los motivos conservados NPA, NPA y D (aminoácidos: N: asparagina, P: prolina, A: alanina y D: ácido aspártico). Estudios reportan que estos motivos conservados junto con otros aminoácidos que forman un filtro de selectividad (SF) aromático/arginina (ar/RSF) determinan en gran medida la especificidad del soluto y el transporte

del sustrato a través de las *AQGP* (Deshmukh *et al.*, 2015). En otros cnidarios se han identificado 16 secuencias con homología a *AQGP* todas con al menos seis dominios transmembrana característicos de estas proteínas con los extremos NH₂ y COOH en el citoplasma. Además, se ha predicho que la mayoría de estos homólogos se ubican en membranas internas (Agre *et al.*, 2002). En nuestros resultados identificamos los dos motivos NPA y un residuo D en el segundo motivo NPA en los dos genes de *AQGP-9* de *C. xamachana*. De acuerdo a Agre y colaboradores (2002), estos motivos forman el poro acuoso para el transporte de glicerol, mientras que el residuo D está presente en acuagliceroporinas y ensancha la abertura del poro permitiendo la transferencia de solutos más grandes. En otros estudios se ha reportado que el transportador *AQGP-9* también puede transportar moléculas más grandes, como lactato, purinas y pirimidinas (Ishibashi *et al.*, 2011). Sin embargo, se necesita evidencia experimental para confirmar cuál de estos pequeños solutos transportan las proteínas *AQGP* en cnidarios simbióticos.

Por otro lado, en nuestros resultados observamos cambios en los transcritos de ARN de los transportadores de glucosa *GLUT-3*, *GLUT-8* y de glicerol *AQGP-9* (gen 1 y 2) cuando se presentó la ruptura de la simbiosis. Nuestros datos indicaron que la variación en los niveles de transcritos se relacionaron con la alta o baja densidad de simbioses tanto en medusas control como en blanqueadas; esta correlación, se ha reportado en otros estudios, en donde se ha visto que los niveles de transcritos de ARNm de transportadores de glucosa como *GLUT-8* disminuyeron en anémonas aposimbióticas e incrementaron importantemente en anémonas simbióticas (Lehnert *et al.*, 2014).

En nuestros datos previamente normalizados por el gen de referencia (*FE1α*), se observó que los valores en los transcritos de ARNm fueron más variables bajo la condición blanqueada. Como se pudo observar, las muestras control simbióticas al día 14 mostraron densidades más bajas de simbioses en comparación con la densidad inicial y esto coincidió con una disminución de los niveles de transcritos de *GLUT-3*, *GLUT-8* y los dos genes de *AQGP-9*; sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes respecto a las muestras del tiempo inicial. No obstante, los valores de densidad de simbioses incrementaron al día 21 (Ctrl-T21) y en este punto, los transcritos correspondientes a transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8* mostraron un incremento en sus niveles. De acuerdo a otros estudios en la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae,

la alanina y la glucosa son la fuente primaria de compuestos orgánicos comúnmente asimilada por invertebrados marinos (Williams 1975; West *et al.*, 1977; Stephens 1981; Gomme 1982; Stephens and Rice 1982). En particular, se ha observado que la glucosa es el principal compuesto liberado por el simbiote y se presenta en niveles más altos en cnidarios simbióticos en comparación con cnidarios blanqueados (Burriesci *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2017).

En contraste, en muestras control al día 14 y día 21 nuestros resultados indicaron una disminución en los niveles de transcritos para los fragmentos codificantes de los dos genes del transportador *AQGP-9*. Estudios previos han sugerido que el glicerol juega un papel importante como un metabolito producto de la fotosíntesis de la microalga simbiote y que es translocado hacia el cnidario (Burriesci *et al.*, 2012; Muscatine, 1967; Swanson y Guldberg, 1998; Sproles *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que en tejidos del cnidario simbiótico hospedero, los niveles de glicerol marcado en están por debajo de los niveles de glucosa, indicando que el glicerol recién sintetizado por la microalga simbiote no es transferido de inmediato al hospedero para ser convertido metabólicamente en glucosa (Burriesci *et al.*, 2012; Muscatine, 1967; Swanson y Guldberg, 1998; Sproles *et al.*, 2018). Más aún se ha visto que el glicerol en particular, es producido por los simbiotes mayormente como parte de una respuesta al estrés, un fenómeno que también se observa en otros organismos (Suescún-Bolivar *et al.*, 2016; Westfall *et al.*, 2004).

En nuestros resultados, se observó el efecto de la ausencia de simbiotes sobre las variaciones en los niveles de transcritos de los transportadores de glucosa y glicerol. Los resultados nos indicaron que en medusas blanqueadas al día 14 la expresión de los genes *GLUT-3* y *GLUT-8* fue más baja que en medusas blanqueadas del día 0, pero no fue significativamente diferente, aún cuando en estas medusas se cuantificó una menor concentración en la densidad de simbiotes respecto a las blanqueadas del día 0. Hasta el día 14, las medusas contaron con una fuente de glucosa como tratamiento para el blanqueamiento, por lo que es probable que esto anulara el efecto de la disminución de simbiotes sobre los niveles de transcritos del *GLUT-3* y *GLUT-8*. Estudios previos sugieren que la adición de azúcares o estrés por carbono orgánico disuelto (DOC), así como el estrés térmico como inductores del blanqueamiento, en un principio estimulan la actividad bacteriana de fijación de nitrógeno (N) en el holobionte que es absorbido rápidamente por el simbiote (Cardini *et al.*, 2016, Bednarz *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2014). Esto conduce a la

inanición de fósforo (P) y alteración de la composición de las membranas de los simbioses seguida de una inducción en el mal funcionamiento del fotosistema II del aparato fotosintético lo que causa un blanqueamiento debido a la producción de oxígeno y acumulación de radicales de superóxido y peróxido de hidrógeno que provocan estrés oxidativo en el simbiote (Lesser y Shick, 1989). Al interrumpirse la limitación por nitrógeno aumenta la retención de carbono fijado por los simbioses, obligando al cnidario hospedero a agotar sus propias reservas de energía (Pogoreutz *et al.*, 2017).

Este efecto del uso de las fuentes de reserva de energía por parte del cnidario en condiciones de blanqueamiento, fue observado con mayor claridad en nuestros resultados de medusas blanqueadas al día 21 que no contaban con una fuente de glucosa ni de alimento heterótrofo. En este día 21, en medusas blanqueadas, los niveles de transcritos del fragmento génico de los transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8* disminuyeron y estas medusas presentaron los niveles más bajos en la densidad de simbioses, con una disminución de simbioses del 99% en sus tejidos. El transportador *GLUT-8*, fue considerado de importancia en el presente estudio, ya que se ha reportado en estudios previos su función tanto como transportador de hexosas en las membranas intracelulares así como en la membrana del simbiosoma (Augustin *et al.*, 2005); esto es consistente con lo que se observó en nuestros resultados donde sus niveles de transcritos disminuyeron significativamente en medusas blanqueadas del día 21. Nuestros resultados mostraron niveles de transcritos de transportadores de glucosa mayores en comparación con medusas blanqueadas, lo que estaría de acuerdo con la propuesta de que la glucosa es un metabolito que se transloca del simbiote al hospedero (Burrelli *et al.*, 2012). Además, observamos que el tratamiento con azúcares para el blanqueamiento, por sí solo no fue suficiente para cubrir las necesidades del hospedero hasta el día 14 del tratamiento y condujo a una pérdida constante de tamaño de la campana en medusas tanto simbióticas como blanqueadas. La mayor reducción en talla fue para las medusas blanqueadas al día 21 así como la mayor disminución en los niveles de ARNm de los transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8*.

Por otro lado, nuestros resultados indicaron que las medusas blanqueadas del día 21 presentaron un aumento en la cantidad de transcritos de los dos genes de *AQGP-9* que fueron significativamente mayores respecto al control del día 21. Estudios previos han reportado que los niveles de glicerol

aumentan aproximadamente tres veces en cnidarios blanqueados, sugiriendo el catabolismo de lípidos por parte del animal hospedero, como se ha documentado que ocurre ante un déficit de nutrientes (Fitt *et al.*, 1981; Molina *et al.*, 2017). Además, el incremento de los niveles de glicerol se ha documentado en otros trabajos que sugieren una degradación de lípidos por parte del cnidario blanqueado, que podría compensar la disminución de glucosa que adquiere de su microalga simbiote (Molina *et al.*, 2017).

Estudios previos han identificado lípidos no polares, como los triglicéridos (o triacil gliceroles, TAG) y los diglicéridos (o diacil gliceroles, DAG) como los lípidos más abundantes en cnidarios simbióticos; además, se considera que los ácidos grasos y los lípidos representan las principales reservas de carbono y energía en animales hospederos (Molina *et al.*, 2017; Garrett *et al.*, 2013). Otros estudios mencionan que el ciclo de nutrientes simbiótico puede ser alterado, es decir, que el cese de la transferencia de fotosintetatos, puede ser la causa directa de la expulsión del simbiote reduciendo gradualmente la translocación de carbono por parte del simbiote, lo que finalmente lleva al sistema simbiótico a un estado limitado por carbono (Rädecker *et al.*, 2021).

En nuestros resultados, los altos niveles de expresión de los dos genes que codifican a transportadores de glicerol, sugiere que las medusas blanqueadas podrían estar degradando lípidos y transportando glicerol a través de una proteína tipo AQP para compensar la ausencia de simbiotes; así como la falta de glucosa de la cual dependen como nutriente indispensable. Debido a que el glicerol se produce por degradación de lípidos y se utiliza para la gluconeogénesis, su transporte hacia el cnidario hospedero mediante un transportador AQP-9 también podría estar modulando el metabolismo de las grasas (Hibuse *et al.*, 2006; Madeira *et al.*, 2015). En el estudio de Molina y colaboradores (2017) observaron que la reducción de la reserva de glucosa condujo a un aumento en los grupos de glicerol-3 fosfato (G3P), así como una actividad específica disminuida del gliceraldehído-3 fosfato. Este proceso se relaciona con la síntesis de glicerol y un aumento en la actividad específica de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) que participa en la vía de las pentosas en donde se regenera el NADPH para el metabolismo anabólico, y en la reducción de la biosíntesis de ácidos grasos (Park *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir en forma de diagrama (Figura 64) el metabolismo celular de las reservas energéticas mediante el proceso de lipólisis (digestión de lípidos) en medusas blanqueadas. En dicho proceso, los triglicéridos (TAG) y diglicéridos (DAG), que son las moléculas principales de reserva de energía en cnidarios simbióticos, son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol (Figura 67 A) por la acción de enzimas conocidas como lipasas que se encuentran en el tejido adiposo de los animales (Li *et al.*, 2012). Los ácidos grasos forman acil-CoA y son transportados al interior de la mitocondria con la ayuda de la L-carnitina donde tiene lugar la β -oxidación (Figura 67 B). En este proceso oxidativo, los ácidos grasos se convierten en acetil-CoA, sustrato del ciclo del ácido cítrico que posteriormente generará energía en forma de ATP (adenosín trifosfato). Nuestros resultados respecto al aumento de transcritos de ARNm de los dos fragmentos codificantes para los transportadores *AQGP-9*, sugieren que las medusas blanqueadas podrían estar desplazando su metabolismo hacia el catabolismo de las reservas de lípidos transportando más glicerol (Figura 67 C). El glicerol es una molécula pequeña que puede atravesar la membrana mitocondrial externa a través de proteínas de tipo acuaporinas (AQGP) (Figura 67 C) para llegar a otras células y entrar a la vía glicolítica y/o de la gluconeogénesis para la producción de energía (ATP) y cubrir las demandas metabólicas (Figura 67 D). El glicerol que se transporta, es previamente fosforilado y transformado en glicerol-3-fosfato (G3P) por la enzima glicerol quinasa (Molina *et al.*, 2017).

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que debido a la disminución en los niveles de transcritos de los transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8* en medusas blanqueadas al día 21, la glucosa dejó de ser la principal molécula móvil de energía y, esto probablemente esté relacionado con un aumento en el transporte de glicerol, producto de la degradación de lípidos (Figura 67 E). Además, la síntesis de glucosa a partir del glicerol por la vía de la gluconeogénesis, resultaría poco favorable para la célula, ya que es una vía que consume energía (Figura 67 F).

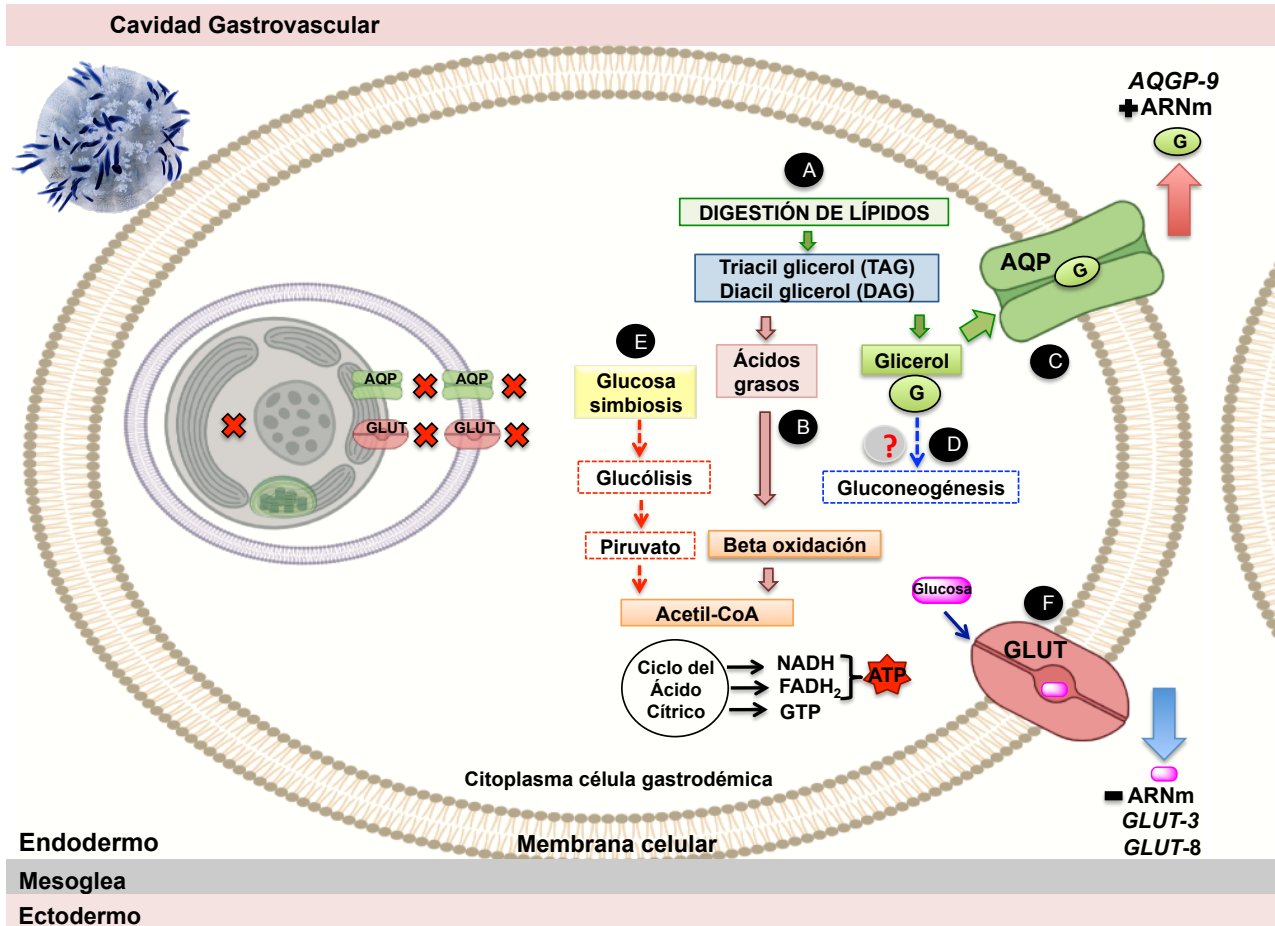


Figura 64. Representación esquemática del metabolismo celular de las reservas energéticas mediante el proceso de lipólisis (digestión de lípidos) en medusas blanqueadas. (A) Los triglicéridos (TAG) y diglicéridos (DAG) que son las moléculas principales de reserva de energía en cnidarios simbióticos, son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol. **(B)** Los ácidos grasos son transportados al interior de la mitocondria donde tiene lugar la β -oxidación que los convierten en acetil-CoA, sustrato del ciclo del ácido cítrico que posteriormente generará energía en forma de ATP. **(C-D)** Catabolismo de las reservas de lípidos, transporte de glicerol y aumento en los transcritos de ARNm de *AQGP-9*. El glicerol puede ser transportado a través de proteínas *AQGP-9* para llegar a otras células, entrar a la vía glicolítica y/o de la gluconeogénesis para la producción de energía (ATP). **(E)** Ausencia de la oxidación de la glucosa (glucólisis) que en condiciones de simbiosis es translocada por el simbiote. **(F)** Disminución en los transcritos de ARNm de *GLUT-3* y *GLUT-8*. Debido a la ausencia de simbiotes, la glucosa dejó de ser la principal molécula móvil.

CONCLUSIÓN

El efecto de la disminución de simbioses en medusas *C. xamachana* estuvo relacionado con la disminución en los niveles de transcritos de los transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8*, lo cual apunta a una disminución de su expresión. En nuestro estudio, se pudo determinar que la ausencia de simbioses condujo al incremento en los niveles de transcritos de los dos genes encargados del transporte de glicerol. Estos resultados sugieren que la glucosa, al ser la principal molécula móvil transportada para la obtención de energía del cnidario en condiciones de simbiosis, fue reemplazada por el catabolismo de lípidos lo que tuvo como consecuencia un aumento en el transporte de glicerol en medusas blanqueadas. La disminución en los niveles de transcritos de los transportadores de glucosa *GLUT-3* y *GLUT-8* en medusas blanqueadas sugieren que en ausencia de simbioses no existe un transporte significativo de glucosa. Esto probablemente debido a que el glicerol fue limitante para su conversión a glucosa.

CAPÍTULO III DISCUSIÓN GENERAL

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL MUCUS Y EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL TRANSPORTE DE CARBONO EN MEDUSAS *C. xamachana*

C. xamachana es una medusa simbiótica que se beneficia de la asociación que mantiene con su simbiote. Sin embargo, no se sabe hasta que punto esta medusa necesita su enlace simbiote, y si fuentes externas de alimento pueden reemplazar la contribución de los simbiotes. El trabajo pionero de Hofmann y Kremer en 1981, sugirió que la glucosa y el glicerol son fotosintetatos que le transfiere el simbiote al hospedero en la medusa *Cassiopea andromeda*. Los resultados reportados en el Capítulo I y II del presente trabajo, mostraron que debido a la disminución de simbiotes (blaqueamiento) en medusas *C. xamachana* se hizo evidente la presencia de asociados patógenos como *Vibrio* así como la disminución en el nivel de transcritos de transportadores de glucosa (*GLUT*) aunado un aumento en los niveles de transcritos de transportadores *AQGP* de glicerol. La translocación de carbono fijado fotosintéticamente (fotosintetatos) del simbiote al hospedero es probablemente una de las características más estudiadas de la simbiosis cnidario-dinoflagelado (Muscatine, 1990; Devies, 1992; Rosenberg *et al.*, 2007; Yellowless *et al.*, 2008; Burriesci *et al.*, 2012; Davy *et al.*, 2012). Como se ha demostrado, la glucosa es el principal metabolito translocado del simbiote al hospedero y puede ser transportada por difusión facilitada a través de proteínas tipo *GLUT*. Del mismo modo, el glicerol como fuente de carbono para el cnidario hospedero se transloca mediante difusión facilitada por proteínas *AQGP* (Gordon y Leggat, 2010; Davy *et al.*, 2012; Sproles *et al.*, 2018). Diversos estudios han planteado que la composición del mucus en cnidarios simbióticos influye fuertemente en la estructuración de la comunidad bacteriana asociada, mismo que se sintetiza a partir del carbono orgánico fijado fotosintéticamente y translocado al cnidario hospedero por las algas simbiotes (Davies, 1984; Crossland, 1987; Edmunds y Davies, 1989; Wild *et al.*, 2004; Brown y Bythell, 2005; Tremblay *et al.*, 2011).

En nuestros resultados, la presencia de géneros bacterianos asociados estables en el mucus de medusas simbióticas y los valores de transcritos de los genes transportadores de glucosa *GLUT-3* y

GLUT-8, sugieren que taxones bacterianos como las *Endozoicomonas* habitan en el complejo mucoso cuando la translocación de glucosa es funcional. Como se ha descrito en otros estudios, la glucosa, translocada desde el simbiote así como la arabinosa, manosa, galactosa, xilosa y *N*-acetilglucosamina, ramnosa, y fucosa, son las fuentes primarias para determinar el crecimiento de las poblaciones bacterianas del mucus (Lee *et al.*, 2015; Ainsworth *et al.*, 2015). Por ende, cambios en el contenido de carbono orgánico del mucus podrían estar relacionados con cambios en la estructura de las comunidades bacterianas asociadas (Ritchie, 2006; Klaus *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2011).

La disminución en la abundancia relativa de bacterias *Endozoicomonas* en medusas blanqueadas, después de la adición de una mezcla de azúcares, no se puede explicar fácilmente, ya que este grupo de bacterias está provisto de transportadores de azúcares que podrían haber sustituido la translocación de fotosintetatos por los azúcares añadidos. Si bien la disminución en la translocación de fotosintetatos coincidió con una disminución en el nivel de transcritos que codifican a transportadores tipo *GLUT*, esto parece no haber sido suficiente para mantener la dominancia de las *Endozoicomonas*, lo que más bien sugiere la presencia de este grupo de bacterias depende de la presencia de los simbiositos. A pesar de que distintos taxones bacterianos asociados al mucus pueden utilizar potencialmente la glucosa como fuente de alimento, los taxones como *Vibrio* son más eficientes utilizando una amplia gama de azúcares como fuente de energía cuando las condiciones son desfavorables (Lee *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha visto que bajo un estrés térmico la composición bioquímica del mucus cambia cuando se disminuye la concentración de determinados azúcares como glucosa, galactosa y manosa (Wooldridge, 2009; Krediet *et al.*, 2012). Esto podría tener un impacto en la comunidad bacteriana en donde patógenos como *Vibrio* pueden proliferar y reemplazar a los miembros dominantes de la comunidad bacteriana nativa (Wooldridge, 2009; Krediet *et al.*, 2012). En nuestro trabajo no es posible concluir de manera contundente si los cambios en las bacterias dominantes fueron un resultado directo de los cambios en la composición del mucus; sin embargo, nuestros datos sugieren que los altos niveles en los transcritos de transportadores de glucosa en medusas simbióticas y los bajos niveles de estos mismos bajo las condiciones de blanqueamiento indican un cambio en el metabolito primario translocado, lo que podría potencialmente conducir a una re-estructuración de la comunidad bacteriana nativa del mucus en la medusa *C. xamachana*.

REFERENCIAS

- Aeby GS, Kenyon J, Maragos JE and Potts DC. 2003. First record of mass coral bleaching in the Northwestern Hawaiian Islands. *Coral Reefs* **22(3)**:256. DOI: 10.1007/s00338-003-0309-2.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A and Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology* **542(1)**:3-16. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.020818.
- Ainsworth TD, Krause L, Bridge T, Torda G, Raina JB, Zakrzewski M, Gates RD, Padilla-Gamiño JL, Spalding HL, Smith C, Woolsey ES, Bourne DG, Bongaerts P, Hoegh-Guldberg O and Leggat W. 2015. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME Journal* **9(10)**:2261-2274. DOI: 10.1038/ismej.2015.39.
- Ainsworth TD, Thurber RV and Gates RD. 2010. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends in Ecology & Evolution* **25(4)**:233-240. DOI: 10.1016/j.tree.2009.11.001.
- Aleyda AAR, Galindo UAR y Pérez AC. 2012. Biología Celular. Tercer año. Primera edición. *Academia Estatal de Biología*. Pp. 56-60.
- Altschul S.F, Madden TL, Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*. **25(17)**:3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Apprill A, Weber LG and Santoro AE. 2018. Distinguishing between microbial habitats unravels ecological complexity in coral microbiomes. *mSystems* **1(5)**:e00143-16. DOI: 10.1128/mSystems.00143-16.
- Arai MNA. 1997. Functional biology of Scyphozoa. Londres: Editorial Chapman and Hall. Pp. 1-35.
- Augustin R, Riley J and Moley KH. 2005. GLUT8 contains [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment *Traffic* **6**:196-1212. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2005.00354.x.
- Baker N, Glovera L, Munday JC, Andrés DA, Barrettb MP, Koningb HP and Horn D. 2012. Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109(27)**:10996-11001. DOI: 10.1073/pnas.1202885109.
- Bayer T, Arif C, Ferrier-Pagès C, Zoccola D, Aranda M and Voolstra CR. 2013. Bacteria of the genus *Endozoicomonas* dominate the microbiome of the Mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Marine Ecology Progress Series* **479**:75-84. DOI:10.3354/meps10197.
- Bednarz VN, Grover Maguer JF, Fine M and Ferrier-Pages C. 2017. The assimilation of diazotroph-derived nitrogen by scleractinian corals depends on their metabolic status. *Ecosystems*, **8(1)**:e02058- 16.
- Berg JM, Tymoczko TJ and Stryer L. 2008. Bioquímica. Sexta edición. Editorial Reverté. Pp. 326-463.
- Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Rodríguez M, Sey H, Amell A, Carrillo M, Silva C, Acosta A, Añez J, Andara C, Angulo V and Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* **26(2)**:76-86. ISSN 0798-0264.
- Berryman M. 2016. Upside-down Jellyfish *Cassiopea xamachana*. 2016. Marine invertebrates of Bermuda (Disponible en línea: www.thecephalopodpage.org/MarineInvertebrateZoology/Cassiopea_xamachana).
- Bigelow R. 1900. The anatomy and development of *Cassiopea xamachana*. *Boston Society of Natural History* **5**: 193-236.
- Bourne D, Iida Y, Uthicke S and Smith-Keune C. 2007. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME Journal* **2(4)**:350-363. DOI: 10.1038/ismej.2007.112.
- Bourne DG and Webster NS. 2013. Coral reef bacterial communities. In: Rosenberg E, EF DeLong, S Lory, E Stackebrandt and F Thompson (Eds). *The Prokariotes* **10**:163-187. DOI: 10.1007/978-3-642-30123-0_48.
- Bourne DG, Dennis PG, Uthicke S, Soo RM, Tyson GW and Webster N. 2013. Coral reef invertebrate microbiomes correlate with the presence of photosymbionts. *ISME Journal* **7(7)**:1452-1458. DOI:10.1038/ismej.2012.172.
- Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW and Harvell CD. 2009. Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology* **17(12)**:554-562. DOI: 10.1016/j.tim.2009.09.004.
- Brown BE and Bythell JC. 2005. Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series* **296**:291-309. DOI: 10.3354/meps296291.
- Burmester EM, Finnerty JR, Kaufman L and Rotjan RD. 2017. Temperature and symbiosis affect lesion recovery in experimentally wounded, facultatively symbiotic temperate corals. *Marine Ecology Progress Series* **570**:87-99. DOI: 10.3354/meps12114.

- Burriesci MS, Raab TK and Pringle JR. 2012. Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **215**(pt19):3467-3477. DOI: 10.1242/jeb.070946.
- Bythell JC and Wild C. 2011. Biology and ecology of coral mucus release. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **408**(1-2):88-93. DOI:10.1016/j.jembe.2011.07.028
- Cabral-Arellano P, Islas-Flores T, Thomé PE and Villanueva MA. 2017. Indomethacin reproducibly induces metamorphosis in *Cassiopea xamachana* scyphistomae. *Peer Journal* **5**:e2979. DOI: 10.7717/peerj.2979
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA and Holmes SP. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**(7):581-583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight and Kuczynski RJ. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**(5):335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303
- Cardini U, Bednarz V, van Hoytema N, Rovere A, Naumann M, Al Rshaidat M and Wild C. 2016. Budget of primary production and dinitrogen fixation in a highly seasonal Red Sea coral reef. *Ecosystems* **19**(5):771-785.
- Castrejón V, Carbó R y Martínez M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la Glucosa. *Revista de Educación Bioquímica* **26**(2):49-57.
- Chappell J. 1980. Coral morphology, diversity and reef growth. *Nature* **286**:249-252. DOI: 10.1038/286249a0.
- Cho HB, Lee JK and Choi YK. 2003. The genetic diversity analysis of the bacterial community in groundwater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Journal of Microbiology* **41**(4):327-334.
- Cleary DR, Becking LE, Polónia AM, Freitas RM and Gomes NM. 2016. Jellyfish associated bacterial communities and bacterioplankton in Indonesian marine lakes. *FEMS Microbiology Ecology* **92**(5):1-14. DOI: 10.1093/femsec/fiw064.
- Colley NJ and Trench RK. 1983. Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma stage of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **219**(1214):61-82. DOI: 10.1098/rspb.1983.0059.
- Crossland CJ. 1987. In situ release of mucus and DOC-lipid from the corals *Acropora variabilis* and *Stylophora pistillata* in different light regimes. *Coral Reefs* **6**:35-42. DOI: 10.1007/BF00302210.
- Curtis H, Barnes NS, Schnek A and Flores G. 2007. Invitación a la biología. 7ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Pp. 384-386.
- Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collin AG, Dawson MN, Fautin DG, Frances SC, McFadden CS, Opresko DM, Rodríguez E, Romano SL and Stake JL. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* **1668**(1):127-182. DOI: 10.5281/zenodo.180149.
- Davies PS, 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* **2**:181-186. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00263571>.
- Davy SK, Allemand D and Weis VM. 2012. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**(2):229-261. DOI: 10.1128/MMBR.05014-11.
- De Bary HA. 1879. Die Erscheinung der Symbiose (Karl L. Trubner, Strasburg. Citado en inglés en Relman DA. 2008. Till death do us part: coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology* **6**(10):721-724. DOI: 10.1038/nrmicro1990.
- DeBoer ML, Krupp DA and Weis VM. 2007. Proteomic and transcriptional analyses of coral larvae newly engaged in symbiosis with dinoflagellates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **2**(1):63-73. DOI: 10.1016/j.cbd.2006.11.003.
- Deering RW, Chen J, Sun J, Ma H, Dubert J, Barja JL, Seeram NP, Wang H and Rowley DC. 2016. N-Acyl Dehydrotyrosines, tyrosinase Inhibitors from the Marine Bacterium *Thalassotalea* sp. *Journal of Natural Products* **79**(2):447-450. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00972.
- Deshmukh RK, Vivancos J, Ramakrishnan G, Guérin V, Carpentier G, Sonah H, Labbé C, Isering P, Belzile FJ and Bélanger RR. 2015. A precise spacing between the NPA domains of aquaporins is essential for silicon permeability in plants. *Plant Journal*. **83**:489-500. DOI: 10.1111/tpj.12904.
- Devies PS. 1992. Endosymbiosis in marine cnidarians. In: (John DM, Hawkins SJ, Price, J.H. Eds.). Plant-animal interactions in the marine benthos. *Clarendon Press, Oxford*. Pp. 511-540.
- Devlin TM. 2004. Bioquímica, 4ª edición. Reverté, Barcelona. Pp. 49-54. ISBN 84-291-7208-4.
- Díaz HDP y Burgos HLC. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?. *IATREIA* **15**(3):11.
- Encyclopaedia de la Vida. 2014. *Cassiopea xamachana* upsidedown jellyfish. (Disponible en: <http://eol.org/pages/203396/overview>, consultado el 23 junio, 2019).
-

- Escher SA and Rasmuson-Lestander A. 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic comparisons, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas* **130(2)**:95-103. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1999.00095.x.
- Fenton-Navarro B, García-Hernández E, Heimer E, Aguilar MB, Rodríguez-A C, Arreguín-Espinosa R and Falcón A. 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis* [corrected]. *Toxicon* **42(5)**:525-32. DOI: 10.1016/s0041-0101(03)00231-9. Erratum in: *Toxicon* **42(7)**:819. PMID: 14529734.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT and Falkowski P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281(5374)**:237-240. DOI: 10.1126/science.281.5374.237.
- Fiore CL, Labrie M, Jarett JK and Lesser MP. 2015. Transcriptional activity of the giant barrel sponge, *Xestospongia muta* holobiont: molecular evidence for metabolic interchange. *Frontiers in Microbiology* **6**:364. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00364.
- Fitt WK and Costley K. 1998. The role of temperature in survival of the polyp stage of the tropical Rhizostome jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **222(1-2)**:79-91. DOI:10.1016/S0022-0981(97)00139-1.
- Fitt WK and Pardy RL. 1981. Effects of starvation, and light and dark on the energy metabolism of symbiotic and aposymbiotic sea anemones, *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology* **61(2-3)**:199-205.
- Fitt WK and Trench RK. 1983. Endocytosis of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* freudenthal by endodermal cells of the scyphistomae of *Cassiopea xamachana*. *Journal of Cell Science* **64**:195-212.
- Fleck J and Fitt WK. 1999. Degrading mangrove leaves of Rhizophora mangle provide a natural cue for settlement and metamorphosis of the upside down jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* **234(1)**:83-94. DOI: 10.1016/S0022-0981(98)00140-3.
- Forget NL and Juniper SK. 2013. Free-living bacterial communities associated with tubeworm (*Ridgeia piscesae*) aggregations in contrasting diffuse flow hydrothermal vent habitats at the Main Endeavour Field, Juan de Fuca Ridge. *Microbiology Open* **2(2)**:259-275. DOI: 10.1002/mbo3.70.
- Former OM, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I form divers metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3(5)**:294-299. PMID: 7881515.
- Fraune S, Anton-Erxleben F, Augustin R, Franzenburg S, Knop M, Schröder K., Willoweit-Ohl D and Bosch TCG. 2015. Bacteria-bacteria interactions within the microbiota of the ancestral metazoan *Hydra* contribute to fungal resistance. *The ISME Journal* **9(7)**: 1543–1556. DOI: 10.1038/ismej.2014.239.
- Garrett TA, Schmeitzel JL, Klein JA, Hwang JJ and Schwarz JA. 2013. Comparative lipid profiling of the cnidarian *Aiptasia pallida* and its dinoflagellate symbiont. *PLoS ONE* **8(3)**:e57975. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057975>.
- Gasca R y Loman-Ramos L. 2014. Biodiversidad de medusozoa (Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**:154-163. DOI: 10.7550/rmb.32513.
- Glasl B, Herndl GJ and Frade PR. 2016. The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *The ISME Journal* **10(9)**:2280-2290. DOI: 10.1038/ismej.2016.9.
- Gomme J. 1982. Epidermal nutrient absorption in marine invertebrates: a comparative analysis. *American Zoologist*, **22**:691-708.
- Gordon BR and Leggat W. 2010. *Symbiodinium*-invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine Drugs* **8(10)**:2546–2568. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md8102546>.
- Goreau TF and Goreau NI. 1960. Distribution of labeled carbon in reef-building corals with and without zooxanthellae. *Science*, **131**:668–669. DOI: 10.1126/science.131.3401.668.
- Grace S, 2017. Winter quiescence, growth rate, and the release from competition in the temperate scleractinian coral *Astrangia poculata* (Ellis and Solander 1786). *Northeastern Naturalist* **24(sp7)**. Pp.119-134.
- Gremlich S, Bonny C, Waeber G and Thorens B. 1997. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *Journal of Biological Chemistry* **272(48)**:30261-30269. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30261>.
- Har JY, Helbig T, Lim JH, Fernando SC, Reitzel AM, Penn K and Thompson JR. 2015. Microbial diversity and activity in the *Nematostella vectensis* holobiont: insights from 16S rRNA gene sequencing, isolate genomes, and a pilot-scale survey of gene expression. *Frontiers in Microbiology* **6**:818. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00818.

- Hernández-Agreda A, Leggat W, Bongaerts P and Ainsworth TD. 2016. The microbial signature provides insight into the mechanistic basis of coral success across reef habitats. *Marine Biology* **7(4)**:e00560-16. DOI: 10.1128/mBio.00560-16.
- Hibuse T, Maeda N, Nagasawa A and Funahashi T. 2006. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758(8)**:1004-11. DOI: 10.1016/j.bbame.2006.01.008.
- Hillyer KE, Tumanov S, Villas-Bôas S and Davy SK. 2016. Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **219(Pt4)**:516-527. DOI: 10.1242/jeb.128660.
- Hofmann D, Fitt WK and Fleck J. 1996. Checkpoints in the life-cycle of *Cassiopea* spp.: control of metagenesis and metamorphosis in a tropical jellyfish. *International Journal of Developmental Biology* **40(1)**:331-338. PMID: 8735945.
- Hofmann DK and Kremer BP. 1981. Carbon metabolism and strobilation in *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa: Significance of endosymbiotic dinoflagellates. *Marine Biology* **65(1)**:25-33.
- Holst S. 2012. Effects of climate warming on strobilation and ephyra production of North Sea scyphozoan jellyfish. *Hydrobiologia* **690(1)**:127-140. DOI: 10.1007/s10750-012-1043-y.
- Horton HR, Moran LA, Laurence A, Scrimgeour KG, Perry MD and Rawn JD. 2008. Principios de Bioquímica. Cuarta edición. Pearson – Prentice Hall, Madrid (España). Pp. 253-570.
- Hügler M and Sievert SM. 2011. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Annual Review of Marine Science* **3(1)**:261-289. DOI: 10.1146/annurev-marine-120709-142712.
- Hume BCC, D'Angelo C, Smith EG, Stevens JR, Burt J and Wiedenmann J. 2015. *Symbiodinium thermophilum* sp. nov., a thermotolerant symbiotic alga prevalent in corals of the world's hottest sea, the Persian/Arabian Gulf. *Scientific Reports* **5(8562)**:2067-2073. DOI: 10.1038/srep08562.
- Ishibashi K, Kondo S, Hara S and Morishita Y. 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **300(3)**:566-576. DOI: 10.1152/ajpregu.90464.2008.
- Jensen S, Duperron S, Birkeland NK and Hovland M. 2010. Intracellular Oceanospirillales bacteria inhabit gills of *Acesta bivalves*. *FEMS Microbiology Ecology* **74(3)**:523-533. DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00981.x.
- Jessen C, Villa Lizcano JF, Bayer T, Roder C, Aranda M, Wild C and Voolstra CR. 2013. In-situ effects of eutrophication and overfishing on physiology and bacterial diversity of the Red Sea coral *Acropora hemprichii*. *PLoS ONE* **8(4)**:e62091. DOI: 10.1371/journal.pone.0062091.
- Joost H, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schu A, Seino S and Thorens B. 2002. Nomenclature of the *GLUT/SLC2A* family of sugar/ polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **282(4)**:E974-976. doi: 10.1152/ajpendo.00407.2001.
- Joost HG and Thorens B. 2001. The extended *GLUT*-family of sugar/polyol transporter facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (Review). *Molecular Membrane Biology* **18(4)**:247-256. DOI: 10.1080/09687680110090456.
- Katharios P, Seth-Smith HMB, Fehr A, Mateos JM, Qi W, Richter D, Nufer L, Ruetten M, Soto MG, Ziegler U, Thomson NR, Schlapbach R and Vaughan L. 2015. Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpnose seabream: striking genomic and morphological features of novel *Endozoicomonas* sp. *Scientific Reports* **5(1)**:17609. DOI: 10.1038/srep17609.
- Katoh K and Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software versión 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30(4)**:772-780. DOI: 10.1093/molbev/mst010.
- Kelly LW, Williams GJ, Barott KL, Carlson CA, Dinsdale EA, Edwards RA, Haas AF, Haynes M, Lim YW, McDole T, Nelson CE, Sala E, Sandin SA, Smith JE, Vermeij MJA, Youle M and Rohwer F. 2014. Local genomic adaptation of coral reef-associated microbiomes to gradients of natural variability and anthropogenic stressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111(28)**:10227-10232. DOI: 10.1073/pnas.1403319111.
- Klaus JS, Janse I, Heikoop JM, Sanford RA and Fouke BW. 2007. Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environmental Microbiology* **9(5)**:1291-1305. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01249.x.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M and Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41(1)**:e1. DOI: 10.1093/NAR/GKS808.
- Kline DI, Kuntz NM, Breitbart M, Knowlton N and Rohwer F. 2006. Role of elevated organic carbon levels and microbial activity in coral mortality. *Marine Ecology Progress Series* **314**:119-125. DOI: 10.3354/meps314119.

- Kopp C, Domart-Coulon I, Escrig S, Humbel BM, Hignette M and Meibom A. 2015. Subcellular investigation of photosynthesis-driven carbon and nitrogen assimilation and utilization in the symbiotic reef coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology* **6(1)**:e02299-14. DOI: 10.1128/mBio.02299-14.
- Kramar M K, Tinta T, Lucic D, Malej A and Turk V. 2019. Bacteria associated with moon jellyfish during bloom and post-bloom periods in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *PLoS ONE* **14(1)**:e0198056. DOI: 10.1371/journal.pone.0198056.
- Krediet CJ, Ritchie KB and Teplitski M. 2009. Catabolite regulation of enzymatic activities in a white pox pathogen and commensal bacteria during growth on mucus polymers from the coral *Acropora palmata*. *Diseases of Aquatic Organisms* **87(1-2)**:57-66. DOI: 10.3354/dao02084.
- Krediet CJ, Ritchie KB, Alagely A and Teplitski M. 2012. Members of native coral microbiota inhibit glycosidases and thwart colonization of coral mucus by an opportunistic pathogen. *The ISME Journal* **7(5)**:980-990. DOI: 10.1038/ismej.2012.164.
- Kuo J, Chen MC, Lin CH and Fang LS. 2004. Comparative gene expression in the symbiotic and aposymbiotic *Aiptasia pulchella* by expressed sequence tag analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318(1)**:176-186. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.191.
- LaJeunesse TC, Parkinson JE and Reimer JD. 2012. A genetics-based description of *Symbiodinium minutum* sp. nov. and *S. psygmophilum* sp. nov. (Dinophyceae), two dinoflagellates symbiotic with cnidaria. *Journal of Phycology* **48(6)**:1380-1391. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01217.x.
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR and Santos SR. 2018. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Current Biology* **28(16)**:2570-2580. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.008.
- LaJeunesse TC. 2001. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *Journal of Phycology* **37(5)**:866-880. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2001.01031.x.
- Lalonde S, Wipf D and Frommer WB. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and skin. *Annual Review of Plant Biology* **55(1)**:341-372. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141758.
- Lampert KP. 2016. *Cassiopea* and its zooxanthellae. in *The Cnidaria, Past, Present and Future: The World of Medusa and Her Sisters*. Eds. S. Goffredo and Z. Dubinsky Springer International Publishing Pp. 415-423. DOI: 10.1007/978-3-319-31305-4_26.
- Lee STM, Davy SK, Tang SL, Fan TY and Kench PS. 2015. Successive shifts in the microbial community of the surface mucus layer and tissues of the coral *Acropora muricata* under thermal stress. *FEMS Microbiology Ecology* **91(12)**:fiv142. DOI: 10.1093/femsec/fiv142.
- Lee STM, Davy SK, Tang SL and Kench PS. 2016. Mucus sugar content shapes the bacterial community structure in thermally stressed *Acropora muricata*. *Frontiers in Microbiology* **7(fiv142)**:371. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00371.
- Lehnert EM, Mouchka ME, Burriesci MS, Gallo ND, Schwarz JA and Pringle JR. 2014. Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **4(2)**:277-295. DOI:10.1534/g3.113.009084.
- Lenaers G, Maroteaux L, Michot B and Herzog M. 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution* **29(1)**:40-51. DOI: 10.1007/BF02106180.
- Lesser MP and Shick JM. 1989. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Marine Biology* **102(2)**:243-255. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00428286>.
- Lesser MP. 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* **41(2)**:271-283. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.2.0271>.
- Lewis DH and Smith DC. 1971. The autotrophic nutrition of symbiotic marine coelenterates with special reference to hermatypic corals. I. Movement of photosynthetic products between the symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B* **178(1050)**:111-129. DOI: 10.1098/rspb.1971.0055.
- Li X, Benning C, Kuo MH. 2012. Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity. *Eukaryotic Cell* **11(12)**:1451-62. DOI: 10.1128/EC.00268-12.
- Littman RA, Willis BL and Bourne DG. 2011. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology Reports* **3(6)**:651-660. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00234.x.
-

- Madeira A, Moura, TF and Soveral G. 2015. Aquaglyceroporins: implications in adipose biology and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72(4)**:759-771. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1773-2>.
- Maiden MC, Davis EO, Baldwin SA, Moore DC and Henderson PJ. 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325(6105)**:641-643.
- Mansson M, Gram L and Larsen A. 2011. Production of bioactive secondary metabolites by marine Vibrionaceae. *Marine Drugs* **9(9)**:1440-1468. DOI: 10.3390/md9091440.
- McDevitt-Irwin JM, Baum JK, Garren M and Vega-Thurber RL. 2017. Responses of coral-associated bacterial communities to local and global stressors. *Frontiers in Marine Science* **4**:262. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00262>.
- McMurdie PJ and Holmes S. 2013. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **8(4)**:e61217. DOI: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Miller DJ, Hemmrich G, Ball EE, Hayward DC, Khalturin K, Funayama N, Agata K and Bosch CGT. 2007. The innate immune repertoire in cnidaria-ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biology* **8(4)**:R59. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r59.
- Molina VH, Castillo-Medina RE and Thomé PE. 2017. Experimentally induced bleaching in the sea anemone *Exaiptasia*, supports glucose as the main metabolite associated to its symbiosis. *Journal of Marine Biology* **3**:1-7. DOI: 10.1155/2017/3130723.
- Morandini AC, Stampar SN, Maronna M and Da Silveira FL. 2017. All non-indigenous species were introduced recently? The case study of *Cassiopea* (Cnidaria: Scyphozoa) in Brazilian waters. *Journal of the Marine Biology Association* **97(2)**:321-328. DOI: 10.1017/S0025315416000400.
- Morrow KM, Bourne DG, Humphrey C, Botté ES, Laffy P, Zaneveld J, Uthicke S, Fabricius KE and Webster NS. 2015. Natural volcanic CO₂ seeps reveal future trajectories for host-microbial associations in corals and sponges. *The ISME Journal* **9(4)**:894-908. DOI:10.1038/ismej.2014.188.
- Morrow KM, Moss AG, Chadwick NE and Liles MR. 2012. Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Applied and Environmental Microbiology* **78(18)**:6438-6449. DOI: 10.1128/AEM.01162-12.
- Mouchka ME, Hewson I and Harvell ID. 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integrative and Comparative Biology* **50(4)**:662-674. DOI: 10.1093/icb/icq061.
- Moya A, Peretó J, Gil R and Latorre A. 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics* **9(3)**:218-229.
- Muller-Parker G, McCloskey LR, Hoegh-Guldberg O and McAuley PJ. 1994. Effect of ammonium enrichment on animal and algal biomass of the coral *Pocillopora damicornis*. *Pacific Science* **48(3)**:273-283. DOI: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Murray KR, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW and Weil PA. 2009. HARPER-Bioquímica Ilustrada. 20a edición, McGraw-Hill Companies, Inc. Pp. 406-425.
- Muscatine L and Lenhoff HM. 1965. Symbiosis of hydra and algae. II. Effects of limited food and starvation on growth of symbiotic and aposymbiotic hydra. *Biological Bulletin* **129**:316-328. DOI:10.2307/1539848
- Muscatine L and Porter JW. 1977. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrients poor environments. *BioScience* **27(7)**:454-460. DOI: 10.2307/1297526.
- Muscatine L, Grossman D and Doiño J. 1991. Release of symbiotic algae by tropical sea anemones and corals after cold shock. *Marine Ecology Progress Series* **77**:233-243. DOI:10.3354/meps077233.
- Muscatine L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science* **156(3774)**:516-519. DOI: 10.1126/science.156.3774.516.
- Muscatine L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In: Dubinsky, Z. (Ed.), *Ecosystems of the World. Coral Reefs* **25**:75-87.
- Neave MJ, Michell CT, Apprill A and Voolstra CR. 2017. *Endozoicomonas* genomes reveal functional adaptation and plasticity in bacterial strains symbiotically associated with diverse marine hosts. *Scientific Reports* **7**:40579. DOI: 10.1038/srep40579.
- Neave MJ, Rachmawati R, Xun L, Michell CT, Bourne DG, Apprill A and Voolstra CR. 2016. Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas* endosymbionts across global scales. *The ISME Journal* **11(1)**:186-200. DOI: 10.1038/ismej.2016.95.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffman L and Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **56(421)**:2907-2914. DOI: 10.1093/jxb/eri285.

- Ohdera AH, Abrams MJ, Ames CL, Baker DM, Suescún-Bolívar LP, Collins AG, Freeman CJ, Gamero-Mora E, Goulet TL, Hofmann DK, Jaimes-Becerra A, Long PF, Marques AC, Miller LA, Mydlarz LD, Morandini AC, Newkirk CR, Putri SP, Samson JE, Stampar SN, Steinworth B, Templeman M, Thomé PE, Vlok M., Woodley CM, Wong JCY, Martindale MQ, Fitt WK and Medina M. 2018. Upside-down but headed in the right direction: review of the highly versatile *Cassiopea xamachana* system. *Frontiers in Ecology and Evolution* **6**:35. DOI: 10.3389/FEVO.2018.00035.
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'hara B, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH and Wagner H. 2009. Vegan: community ecology package. R package versión 1.15-2. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. (Disponible en: <http://cran.r-project.org/http://vegan.r-forge.r-project.org>).
- Olson ND, Ainsworth TD, Gates RD and Takabayashi M. 2009. Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian *Montipora* corals: diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **371(2)**:140–146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.01.012>.
- Pallas PS. 1774. Spicilegia Zoologica. quibus novate imprimis et obscurae animalium species iconibus, Descriptionibus Atque Commentariis Illustrantur. Berolini: Prostant apud Gottl. Pp: 1767-1811. DOI: 10.5962/bhl.title.39832.
- Paracer S and Ahmadjian V. 1987. Symbiosis: an introduction to biological associations. *Oxford University Press* **19(4)**:439-441. DOI: 10.1017/S0024282987000410.
- Park JJ, Wang H, Gargouri M, Deshpande RR, Skepper JN, Holguin FO, Juergens MT, Shachar-Hill Y, Hicks LM and Gang DR. 2015. The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: A systems biology analysis. *The Plant Journal* **81(4)**:611-624. DOI: 10.1111/tbj.12747.
- Pasaribu B, Weng LC, Lin IP, Camargo E, Jason TTC, Ching-Hsiu T, Shin-Lon H, Mong-Rong L, Li-Hsueh W, Chii-Shiang C and Pei-Luen J. 2015. Morphological variability and distinct protein profiles of cultured and endosymbiotic *Symbiodinium* cells isolated from *Exaiptasia pulchella*. *Scientific Reports* **5**:15353. DOI: 10.1038/srep15353.
- Pawlowski J., Bolívar I., Fahrni J. F., DeVargas C. and Bowser S. 1999. Molecular evidence that *Reticulomyxa filosa* is a freshwater naked foraminifer: *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **46(6)**:612-7. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05137.x.
- Pernice M, Meibom A, Heuvel AVD, Kopp C, Domart-Coulon I, Hoegh-Guldberg O and Dove S. 2012. A single-cell view of ammonium assimilation in coral-dinoflagellate symbiosis. *The ISME Journal* **6(7)**:1314-1324. DOI: 10.1038/ismej.2011.196.
- Péron F and Lesueur CA. 1810. Tableau des caractères génériques et spécifiques de toutes les espèces de méduses connues jusqu'à ce jour. *Annales du Muséum national d'histoire naturelle de Paris* **14**:325-366.
- Perry CT, Murphy GN, Kench PS, Smithers SG, Edinger EN, Steneck RS and Mumby PJ. 2013. Caribbean-wide decline in carbonate production threatens coral reef growth. *Nature Communications* **4**:1402. DOI: 10.1038/ncomms2409.
- Pogoreutz C, Rådecker N, Cárdenas A, Gärdes A, Voolstra CR and Wild C. 2017. Sugar enrichment provides evidence for a role of nitrogen fixation in coral bleaching. *Global Change Biology* **23(9)**:3838-3848. DOI: 10.1111/gcb.13695.
- Price MN, Dehal PS and Arkin AP. 2010. FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* **5(3)**:e9490. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.
- Rådecker N, Pogoreutz C, Gegner HM, Cárdenas A, Roth F, Bougoure JJ, Guagliardo P, Wild C, Pernice M, Raina J, Meibom A and Voolstra CR. 2021. Heat stress destabilizes symbiotic nutrient cycling in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **118(5)** e2022653118 | DOI:10.1073/pnas.2022653118.
- Radjasa OK, Salasia SIO, Sabdono A, Weise J, Imhoff JF, Lämmler C and Risk MJ. 2007. Antibacterial activity of marine bacterium *Pseudomonas* sp. associated with soft coral *Simularia polydactyla* against *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. *International Journal of Pharmacology* **3(2)**:170-174. DOI: 10.3923/ijp.2007.170.174.
- Rands ML, Loughman BC and Douglas AE, 1993. The symbiotic interface in an alga-invertebrate symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **253(1)**:161-165. DOI: 10.1098/rspb.1993.0097.
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI and Saier MH. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS Journal*. **(279)**:2022-2035. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x.
- Ritchie KB. 2006. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* **322**:1-14. DOI: 10.3354/meps322001.
- Rivera-Ortega J and Thomé PE. 2018. Contrasting antibacterial capabilities of the surface mucus layer from three symbiotic cnidarians. *Frontiers in Marine Science* **5**:392. DOI: 10.3389/fmars.2018.00392.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C and Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**:e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584.
-

- Rohwer F, Seguritan V, Azam F and Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* **243**:1-10. DOI: 10.3354/meps243001.
- Rojek A, Praetorius J, Frøkiaer J, Nielsen S and Fenton RA. 2008. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annual Review of Physiology* **70**:301-327. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100452.
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R and Zilber-Rosenberg I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology* **5**(5):355-362. DOI: 10.1038/nrmicro1635.
- Röthig T, Puntin G, Wong JCY, Burian A, McLeod W and Baker DM. 2021. Holobiont nitrogen control and its potential for eutrophication resistance in an obligate photosymbiotic jellyfish. *Microbiome* **9**(1):127. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01075-0>
- Rua CPJ, Trindade-Silva AE, Appolinario LR, Venas TM, Garcia GD, Carvalho LS, Lima A, Kruger R, Pereira RC, Berlinck RGS, Valle RAB, Thompson CC and Thompson F. 2014. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *PeerJ* **2**:e419. DOI:10.7717/peerj.419.
- SAMMO. 2018-2019. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Servicio Académico de Monitoreo Meteorológico y Oceanográfico, Puerto Morelos Q. Roo México. Tomado de: www.sammo.icmyl.unam.mx.
- Santos HF, Carmo FL, Duarte G, Dini-Andreote F, Castro CB, Rosado AS, Jan DE and Peixoto RS. 2014. Climate change affects key nitrogen-fixing bacterial populations on coral reefs. *The ISME Journal* **8**(11):2272-2279.
- Scheepers A, Joost HG and Schürmann A. 2015. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **28**(5):364-371. DOI: 10.1177/0148607104028005364.
- Schmidt S, Joost HG and Schürmann A. 2009. GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **296**(4):E614-8. DOI: 10.1152/ajpendo.91019.2008.
- Schmitz K and Kremer BP. 1977. Carbon fixation and analysis of assimilates in a coral-dinoflagellate symbiosis. *Marine Biology* **42**(4): 305-313. DOI: 10.1007/BF00402192.
- Sharp KH, Pratte ZA, Kerwin AH, Rotjan RD and Stewart FJ. 2017. Season, but not symbiont state, drives microbiome structure in the temperate coral *Astrangia poculata*. *Microbiome* **5**(1):120. DOI: 10.1186/s40168-017-0329-8.
- Shiu JH, Yu SP, Fong CL, Ding JY, Tan CJ, Fan TY, Lu CY and Tang SL. 2020. Shifting in the dominant bacterial group *Endozoicomonas* is independent of the dissociation with coral symbiont algae. *Frontiers Microbiology*. **11**:1791. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01791
- Smith DC and Douglas AE. 1987. The biology of symbiosis. In: Willis, A.J. and M.A. Sleight (ed. London, UK: Edward Arnold). Pp. 302. ISBN : 0713129395.
- Smith TM and Smith RL. 2009. Elements of Ecology, 7th Edition. (Emeritus) West Virginia University. Ed. Pearson Pp. 130. ISBN-13: 9780321559579.
- Solomon B and Vilee M. 1996. Biología de Vilee; 3ra ed.. Editorial Interamericana, Mc Graw – Hill, México.
- Sproles AE, Kirk NL, Kitchen SA, Oakley CA, Grossman AR, Weis VM and Davy SK. 2018. Phylogenetic characterization of transporter proteins in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **120**:307-320. DOI: 10.1016/j.ympev.2017.12.007.
- Stanley JG. 2006. Ecology, photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. *Science* **312**(5775):857-858. DOI: 10.1126/science.1123701.
- Stat M, Carter D and Hoegh-Guldberg O. 2006. The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts–Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **8**(1):23-43. DOI: 10.1016/j.ppees.2006.04.001.
- Stephens GC and Rice MA. 1982. Transport of dissolved amino acids by the mussel, *Mytilus edulis*: demonstration of net uptake from natural seawater. *Science* **215**:1235-1255.
- Stephens, GC. 1981. The trophic role of dissolved organic material. In *Analysis of marine ecosystems*, Edited by: Longhurst, London: Academic Press. Pp. 271-291.
- Sterrer W. 1986. Marine fauna and flora of Bermuda. A systematic guide to the identification of marine organisms. *John Wiley and Sons, Inc.* Pp. 158-159. ISBN-13: 978-0471823360.
- Suescún-Bolívar LP, Iglesias-Prieto R and Thomé PE. 2012. Induction of glycerol synthesis and release in cultured *Symbiodinium*. *PLoS ONE* **7**(10):e47182. DOI: 10.1371/journal.pone.0047182.
- Suescún-Bolívar LP, Traverse GMI and Thomé PE. 2016. Glycerol outflow in *Symbiodinium* under osmotic and nitrogen stress. *Marine Biology* **163**(5):128. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2899-6>.
- Swanson R and Guldberg OH. 1998. Amino acid synthesis in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Marine Biology* **131**(1):83-93. DOI: 10.1007/s002270050299.
-

- Tanaka Y, Miyajima T, Koike I, Hayashibara T and Ogawa H. 2006. Translocation and conservation of organic nitrogen within the coral-zooxanthella symbiotic system of *Acropora pulchra*, as demonstrated by dual isotope-labeling techniques. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **336(1)**:110-119. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.04.011.
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas V, Yadav SN, Milligan AJ, Häggblom M and Falkowski PG. 2004. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101(37)**:13531–13535. doi.org/10.1073/pnas.0402907101.
- Tinta T, Kogovšek T, Klun K, Malej A, Herndl GJ and Turk V. 2019. Jellyfish-associated microbiome in the marine environment: exploring its biotechnological potential. *Marine Drugs* **17(2)**:94. DOI: [10.3390/md17020094](https://doi.org/10.3390/md17020094).
- Tout J, Siboni N, Messer LF, Garren M, Stocker R, Webster NS, Ralph PJ and Seymour JR. 2015. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. *Frontiers in Microbiology* **6**:432. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00432>.
- Tremblay P, Peirano A and Ferrier-Pagès C. 2011. Heterotrophy in the Mediterranean symbiotic coral *Cladocora caespitosa*: Comparison with two other scleractinian species. *Marine Ecology Progress Series* **422**:165-177. DOI: 10.3354/meps08902.
- Trench RK. 1979. Cell biology of plant-animal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **30**: 485-531. DOI: 10.1146/annurev.pp.30.060179.002413.
- Uldry M and Thorens B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **447(5)**:480-489. DOI: 10.1007/s00424-003-1085-0.
- Vega-Thurber R, Barrot K, Rodriguez-Brito B, Liu H, Hall D and Edwards RA. 2008. Metagenomic analysis indicated that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105(47)**:18413-18418. DOI: 10.1073/pnas.0808985105.
- Vega-Thurber R, Willner-Hall D, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards RA, Angly F, Dinsdale E, Kelly L and Rohwer F. 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environmental Microbiology* **11(8)**:2148-2163. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01935.x.
- Viver T, Orellana LH, Hatt JK, Urdiain M, Díaz S, Richter M, Anton J, Avian M, Amann R, Konstantinidis KT and Rosselló-Móra R. 2017. The low diverse gastric microbiome of the jellyfish *Cotylorhiza tuberculata* is dominated by four novel taxa. *Environmental Microbiology* **19(8)**:3039-3058. DOI:10.1111/1462-2920.13763.
- Wakefield TS and Kempf SC. 2001. Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Biological Bulletin* **200(2)**:127-143. DOI: doi: 10.2307/1543306.
- Wang JT and Douglas AE. 1998. Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga–invertebrate symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **201(16)**:2445-2453.
- Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, González A, Lozupone C, Zaneveld J, Vázquez-Baeza Y, Birmingham A, Hyde E and Knight Rob. 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* **5(1)**:27. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>.
- West B, de Burgh M and Jeal F. 1977. Dissolved organics in the nutrition of benthic invertebrates. In *Biology of benthic organisms*, Edited by: Keegan, BF, O’Ceidigh, P and Boaden, *Philippine Journal of Science* Pp. 587–593. Oxford: Pergamon Press.
- Westfall P, Ballou D and Thorner J. 2004. When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* **306(5701)**:1511-1512. DOI: 10.1126/science.1104879.
- Whitehead LF and Douglas AE. 2003. Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *Journal of Experimental Biology* **206(Pt18)**:3149-3157. DOI: 10.1242/jeb.00539.
- Wickham H. 2016. ggplot2. *Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer International Publishing. Pp. 260. DOI: 10.1007/978-3-319-24277-4.
- Wild C, Huettel M, Kluever A et al. 2004a. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* **428(6978)**:66-70. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02344>.
- Williams AD, Brown BE, Putschin L and Sweet MJ. 2015. Age-related shifts in bacterial diversity in a reef coral. *PLoS ONE* **10(12)**:e0144902. DOI: 10.1371/journal.pone.0144902.
- Williams, PJB. 1975. Biological and chemical aspects of dissolved organic material in sea water. In *Chemical oceanography*, 2nd, Edited by: Riley, JP and Skirrow, G. **2**:301-363. London: Academic Press.
- Wood IS and Trayhurn P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* **89(1)**:3-9. DOI: 10.1079/BJN2002763.
- Wooldridge SA. 2009. A new conceptual model for the enhanced release of mucus in symbiotic reef corals during ‘bleaching’ conditions. *Marine Ecology Progress Series* **396**:145-152. DOI: 10.3354/meps08310.
-

- Wright EM. 2013. Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Molecular Aspects of Medicine* **34(2-3)**:183-196. DOI: 10.1016/j.mam.2012.11.002.
- Yellowlees D, Rees TAV, Ree V and Leggat W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell and Environment* **31(5)**:679-694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x.
- Yonge CM and Nichols G. 1931. Studies on the physiology of corals. V. The effect of starvation in light and darkness on the relationship between corals and zooxanthellae. Great Barrier Reef Expedition, 1928–1929. *Scientific Reports* **1**:177–211. BioStor: 175050.
- Zaneveld JR, Burkepile DE, Shantz AA, Pritchard CE, McMinds R, Payet JP, Welsh R, Correa AMS, Lemoine NP, Rosales S, Fuchs C, Maynard JA and Thurber RV. 2016. Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. *Nature Communications* **7**:11833. DOI: 10.1038/ncomms11833.
- Zhang Z, Green BR and Cavalier-Smith T. 2000. Phylogeny of ultrarapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *Journal of Molecular Evolution* **51(1)**:26-40. DOI: 10.1007/s002390010064.

ANEXO 1.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN DE TENTÁCULOS DE *C. xamachana*

Se realizó la extracción de ARN total a partir de los tentáculos de *C. xamachana* previamente muestreados (n=21). La cantidad e integridad del ARN obtenido con este procedimiento, fue adecuado para síntesis de cADN. Previo a la extracción de ARN, se preparó el material. Se preparó el buffer de extracción mezclando 1:1 fenol ácido y buffer de lisis. Se calentó la mezcla en un baño seco a 95 °C. Se hizo esto en la campana de extracción de humos. Se puso la mezcla en tubos de 2.0 ml y se agregaron 750 µl de fenol y 750 µl de buffer de lisis. Se debe tener cuidado al destapar los tubos.

Para la extracción de ARN, los tentáculos congelados se manipularon con una espátula libre de ARNasas y se colocaron en un mortero pre enfriado por al menos dos horas a -80 °C. El tentáculo se maceró hasta la obtención de un polvo fino con la ayuda de pequeñas adiciones de nitrógeno líquido. La totalidad del polvo obtenido se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 o 50 ml con la ayuda de una espátula libre de ARNasas. Tanto el tubo como la espátula deberán estar pre- enfriados a -80 °C.

Se adicionó en proporción 1:4 (material: buffer de lisis) del buffer caliente. Se tapó el tubo y se agitó en un agitador vórtex por dos min para obtener una suspensión homogénea de color rosa claro. De inmediato, se adicionó 1 µl de ARNase OUT por cada ml de suspensión final. Se mezcló y se distribuyó la suspensión en tubos de 1.5 ml (no llenar los tubos, poner máximo 1.2 ml). Se centrifugó a 12,000 x g durante 25 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo, cuidando de NO tocar nunca la interfase que se forma. Se adicionó igual volumen de cloroformo (CHCl₃), mezclando manualmente por 30 s. Se centrifugó por 20 min a 12,000 x g a 4 °C. Se recuperó de nuevo la fase acuosa y se repitió la extracción con CHCl₃.

Se midió exactamente el volumen de la fase acuosa obtenida después de la segunda extracción y se adicionó 1/3 de stock de cloruro de litio (LiCl) 8M. Se mezcló y se dejó precipitar el ARN a 4 °C por al menos 12 hasta 24 horas. Se centrifugó a 12,000 x g durante 25 min a 4 °C. Se lavó 2 veces la pastilla con etanol al 70% frío y se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min a 4 °C. En los lavados, se debe evitar calentar el tubo manteniéndolo siempre en hielo.

Para purificar el ARN y eliminar ADNasas se preparó una reacción de 50 µl (ARN 40 µl, ADNasa 1 µl, buffer 10X 5 µl y 4 µl H₂O) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (QIAGEN ADNse Max Kit). Posteriormente se agregaron 10 µl de resina (DRR) y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. La muestra se centrifugó a 14,000 x g durante 5 min y se rescató el sobrenadante (sin tocar la resina). Se preparó un segundo gel al 1% para determinar la integridad del ARN y se cuantificó mediante espectrofotometría.

ANEXO 2.

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS
 EN LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE *GLUT-3* Y *GLUT-8* DE *C. xamachana*

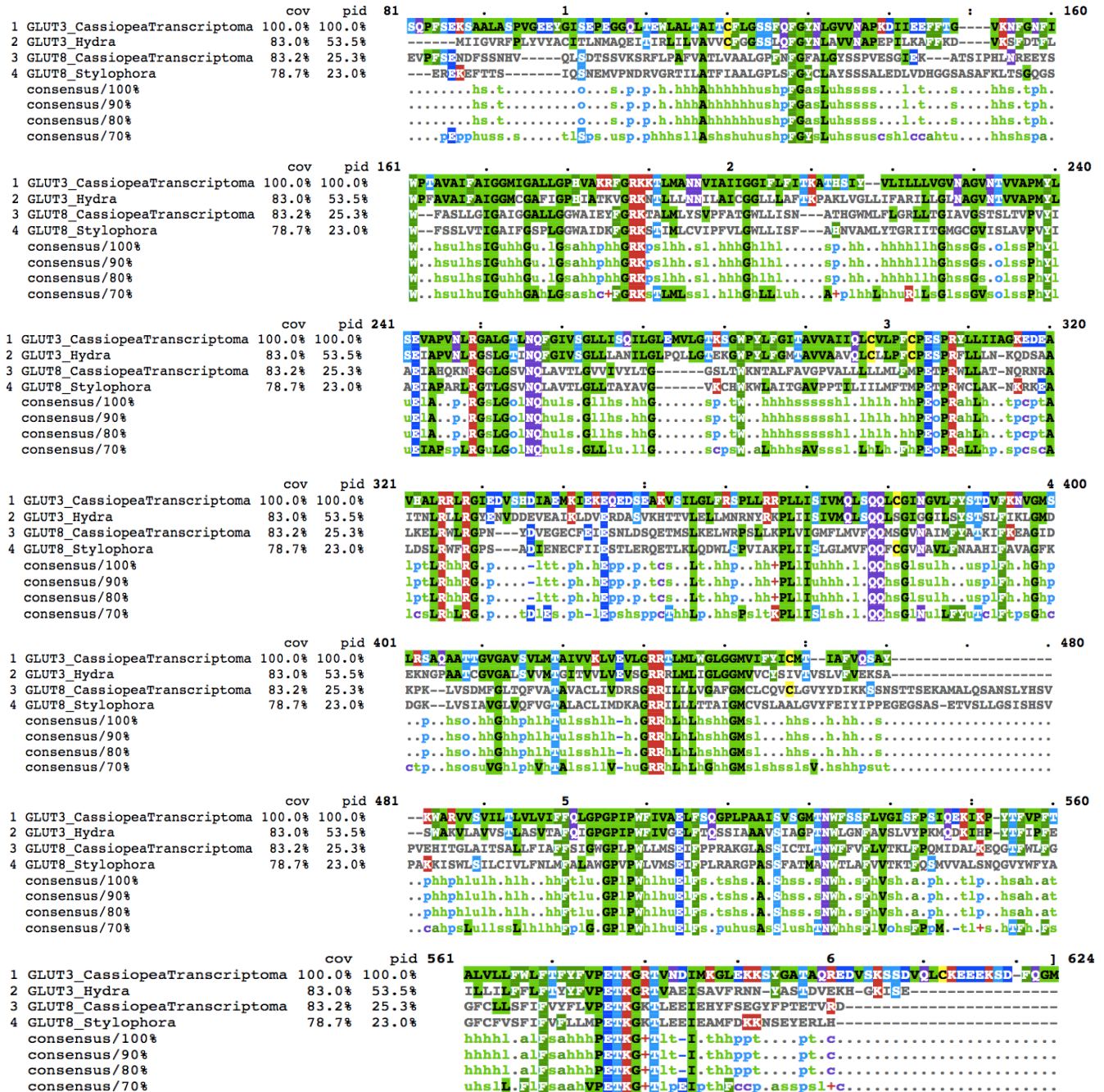


Figura 65. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de *GLUT-3* y *GLUT-8* traducidas del transcriptoma de *C. xamachana* con secuencias de cnidarios con mayor identidad. Los colores resaltan aminoácidos y regiones conservadas dentro de las secuencias de los genes *GLUT* de *C. xamachana*.

**ALINEAMIENTO MÚLTIPLE E IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS
 EN LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE *AQGP-9-gen1* Y *AQGP-9-gen2* DE *C. xamachana***

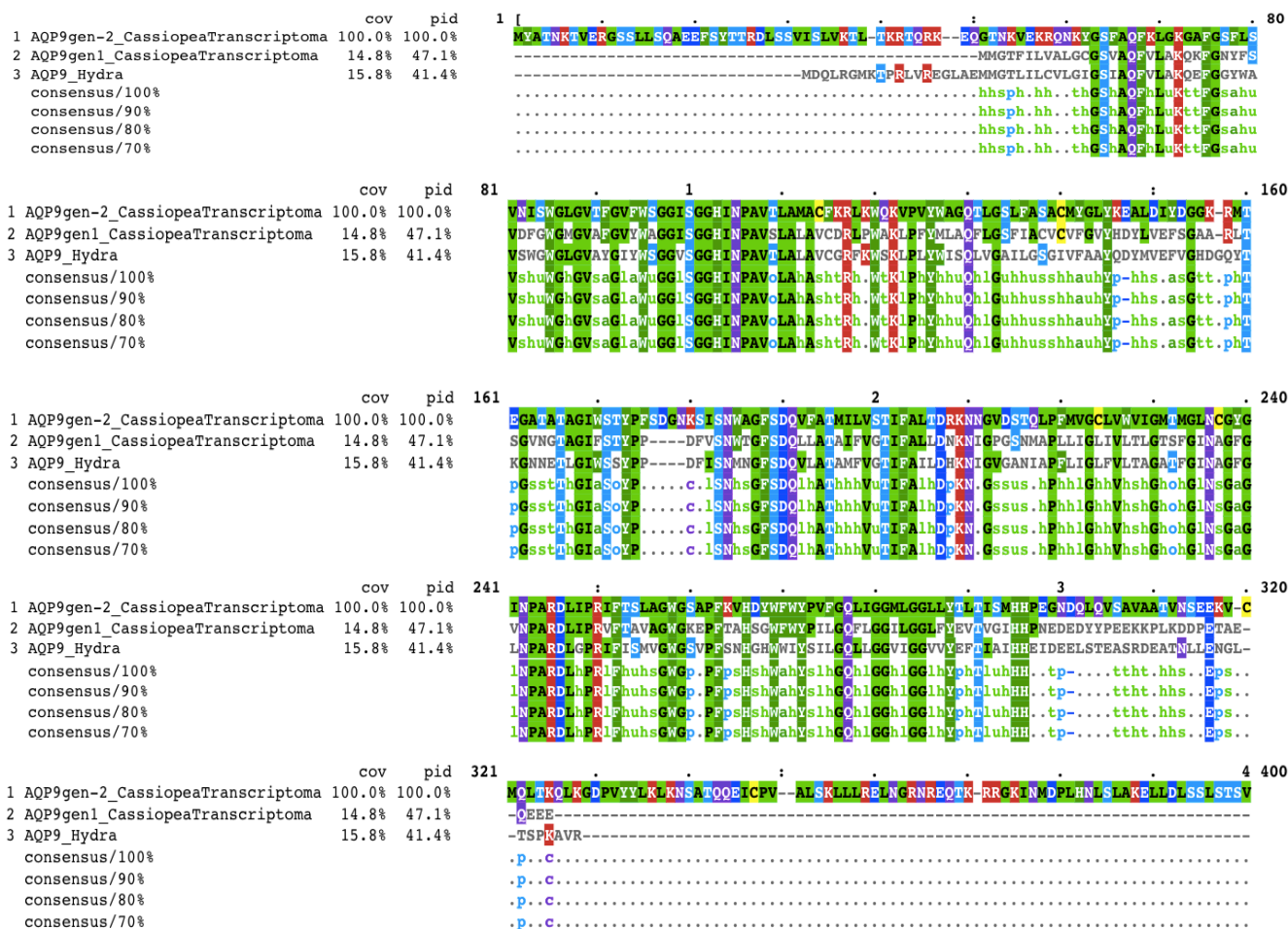


Figura 66. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de *AQGP-9-gen1* y *AQGP-9-gen2* traducidas del transcriptoma de *C. xamachana* con secuencias de cnidarios con mayor identidad. Los colores resaltan aminoácidos y regiones conservadas dentro de las secuencias de los genes *AQGP-9* de *C. xamachana*.

ANEXO 3.

ANOVA DE UNA VÍA: VALORES DE AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL FRAGMENTO DE GENES TRANSPORTADORES

Test de Normalidad (Shapiro-Wilk)

GLUT-3:	W-Statistic = 0.918	P = 0.488	Aprobado
GLUT-8:	W-Statistic = 0.922	P = 0.518	Aprobado
AQGP-9-gen1:	W-Statistic = 0.845	P = 0.143	Aprobado
AQGP-9-gen2:	W-Statistic = 0.922	P = 0.519	Aprobado

Una prueba que falla indica que los datos varían significativamente del patrón esperado si los datos se extrajeron de una población con una distribución normal. Una prueba que pasa (aprobado) indica que los datos coinciden con el patrón esperado si los datos se extrajeron de una población con una distribución normal.

ANOVA DE UNA VÍA: *GLUT-3*

Análisis ANOVA de una vía:

Ctrl= Control

Bleach= Blanqueadas

Fuente de los Datos: *GLUT-3* in DATOS GENES ESTADISTICA.JNB

Grupo	N	Missing	Mean	Desv Est	SEM
Ctrl-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Ctrl-T14	3	0	0.674	0.192	0.111
Ctrl-T21	3	0	1.408	0.833	0.0481
Bleach-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Bleach-T14	3	0	0.921	0.272	0.157
Bleach-T21	3	0	0.617	0.396	0.229

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre Grupos	5	1.204	0.241	5.263	0.009
Residual	12	0.549	0.0458		
Total	17	1.754			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores. Hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.009$). Poder de la prueba realizada con $\alpha = 0.050$: 0.831.

Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey):
Comparaciones por tratamientos:

Comparación	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Ctrl-T21 vs. Bleach-T21	0.791	6	6.401	0.007	Yes
Ctrl-T21 vs. Ctrl-T14	0.734	6	5.944	0.012	Yes
Ctrl-T21 vs. Bleach-T14	0.487	6	3.945	0.127	No
Ctrl-T21 vs. Bleach-T0	0.408	6	3.302	0.253	Do Not Test
Ctrl-T21 vs. Ctrl-T0	0.408	6	3.302	0.253	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T21	0.383	6	3.099	0.309	No
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T14	0.326	6	2.641	0.464	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T14	0.0794	6	0.643	0.997	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T0	0.000	6	0.000	1.000	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Bleach-T21	0.383	6	3.099	0.309	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Ctrl-T14	0.326	6	2.641	0.464	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Bleach-T14	0.0794	6	0.643	0.997	Do Not Test
Bleach-T14 vs. Bleach-T21	0.303	6	2.456	0.535	Do Not Test
Bleach-T14 vs. Ctrl-T14	0.247	6	1.999	0.719	Do Not Test
Ctrl-T14 vs. Bleach-T21	0.0565	6	0.458	0.999	Do Not Test

Se produce un resultado de "No probar: Do Not Test" para una comparación cuando no se encuentra una diferencia significativa entre dos medias que encierran esa comparación. Por ejemplo, si tuviera cuatro medias ordenadas en orden y no encontrara diferencias entre las medias 4 frente a 2, entonces no probaría 4 frente a 3 y 3 frente a 2, pero aún así probaría 4 frente a 1 y 3 frente a 1. (4 contra 3 y 3 contra 2 están encerrados por 4 contra 2: 4 3 2 1). Tenga en cuenta que no probar los medios incluidos es una regla de procedimiento, y un resultado de No probar debe tratarse como si no hubiera una diferencia significativa entre las medias.

ANOVA DE UNA VÍA: *GLUT-8*

Análisis ANOVA de una vía:

Ctrl= Control

Bleach= Blanqueadas

Fuente de los Datos: *GLUT-8* in DATOS GENES ESTADISTICA.JNB

Grupo	N	Missing	Mean	Desv Est	SEM
Ctrl-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Ctrl-T14	3	0	0.693	0.139	0.0801
Ctrl-T21	3	0	1.311	0.380	0.219
Bleach-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Bleach-T14	3	0	0.943	0.504	0.291
Bleach-T21	3	0	0.252	0.122	0.0702

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	1.940	0.388	5.382	0.008
Residual	12	0.865	0.0721		
Total	17	2.805			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores. Hay una diferencia estadísticamente significativa (P = 0.008). Poder de la prueba realizada con $\alpha = 0.050$: 0.843

Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey):
Comparaciones por tratamiento:

Comparación	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Ctrl-T21 vs. Bleach-T21	1.059	6	6.832	0.004	Yes
Ctrl-T21 vs. Ctrl-T14	0.618	6	3.984	0.122	No
Ctrl-T21 vs. Bleach-T14	0.368	6	2.375	0.568	Do Not Test
Ctrl-T21 vs. Bleach-T0	0.311	6	2.006	0.717	Do Not Test
Ctrl-T21 vs. Ctrl-T0	0.311	6	2.006	0.717	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T21	0.748	6	4.826	0.046	Yes
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T14	0.307	6	1.978	0.727	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T14	0.0572	6	0.369	1.000	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T0	0.000	6	0.000	1.000	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Bleach-T21	0.748	6	4.826	0.046	Yes
Bleach-T0 vs. Ctrl-T14	0.307	6	1.978	0.727	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Bleach-T14	0.0572	6	0.369	1.000	Do Not Test
Bleach-T14 vs. Bleach-T21	0.691	6	4.457	0.071	No
Bleach-T14 vs. Ctrl-T14	0.249	6	1.609	0.857	Do Not Test
Ctrl-T14 vs. Bleach-T21	0.441	6	2.848	0.389	Do Not Test

Se produce un resultado de "No probar: Do Not Test" para una comparación cuando no se encuentra una diferencia significativa entre dos medias que encierran esa comparación. Por ejemplo, si tuviera cuatro medias ordenadas en orden y no encontrara diferencias entre las medias 4 frente a 2, entonces no probaría 4 frente a 3 y 3 frente a 2, pero aún así probaría 4 frente a 1 y 3 frente a 1. (4 contra 3 y 3 contra 2 están encerrados por 4 contra 2: 4 3 2 1). Tenga en cuenta que no probar los medios incluidos es una regla de procedimiento, y un resultado de No probar debe tratarse como si no hubiera una diferencia significativa entre las medias.

ANOVA DE UNA VÍA: *AQGP-9-gen1*

Análisis ANOVA de una vía:

Ctrl= Control

Bleach= Blanqueadas

Fuente de los Datos: *AQGP-gen1* in DATOS GENES ESTADISTICA.JNB

Grupo	N	Missing	Mean	Desv Est	SEM
Ctrl-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Ctrl-T14	3	0	0.184	0.160	0.0922
Ctrl-T21	3	0	0.184	0.153	0.0884
Bleach-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Bleach-T14	3	0	1.332	0.895	0.0517
Bleach-T21	3	0	3.046	0.288	0.166

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	16.608	3.322	142.570	<0.001
Residual	12	0.280	0.0233		
Total	17	16.887			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores. Hay una diferencia estadísticamente significativa (P = <0.001). Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey):
Comparaciones por tratamiento:

Comparación	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Bleach-T21 vs. Ctrl-T21	2.862	6	32.482	<0.001	Yes
Bleach-T21 vs. Ctrl-T14	2.862	6	32.474	<0.001	Yes
Bleach-T21 vs. Bleach-T0	2.046	6	23.217	<0.001	Yes
Bleach-T21 vs. Ctrl-T0	2.046	6	23.217	<0.001	Yes
Bleach-T21 vs. Bleach-T14	1.714	6	19.445	<0.001	Yes
Bleach-T14 vs. Ctrl-T21	1.149	6	13.037	<0.001	Yes
Bleach-T14 vs. Ctrl-T14	1.148	6	13.030	<0.001	Yes
Bleach-T14 vs. Bleach-T0	0.332	6	3.772	0.154	No
Bleach-T14 vs. Ctrl-T0	0.332	6	3.772	0.154	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T21	0.816	6	9.265	<0.001	Yes
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T14	0.816	6	9.257	<0.001	Yes
Ctrl-T0 vs. Bleach-T0	0.000	6	0.000	1.000	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Ctrl-T21	0.816	6	9.265	<0.001	Yes
Bleach-T0 vs. Ctrl-T14	0.816	6	9.257	<0.001	Yes
Ctrl-T14 vs. Ctrl-T21	0.000658	6	0.00746	1.000	No

Se produce un resultado de "No probar: Do Not Test" para una comparación cuando no se encuentra una diferencia significativa entre dos medias que encierran esa comparación. Por ejemplo, si tuviera cuatro medias ordenadas en orden y no encontrara diferencias entre las medias 4 frente a 2, entonces no probaría 4 frente a 3 y 3 frente a 2, pero aún así probaría 4 frente a 1 y 3 frente a 1. (4 contra 3 y 3 contra 2 están encerrados por 4 contra 2: 4 3 2 1). Tenga en cuenta que no probar los medios incluidos es una regla de procedimiento, y un resultado de No probar debe tratarse como si no hubiera una diferencia significativa entre las medias.

ANOVA DE UNA VÍA: *AQGP-9-gen2*

Análisis ANOVA de una vía:

Ctrl= Control

Bleach= Blanqueadas

Fuente de los Datos: *AQGP-gen2* in DATOS GENES ESTADISTICA.JNB

Grupo	N	Missing	Mean	Desv Est	SEM
Ctrl-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Ctrl-T14	3	0	0.607	0.213	0.123
Ctrl-T21	3	0	0.168	0.0553	0.0319
Bleach-T0	3	0	1.000	0.000	0.000
Bleach-T14	3	0	1.517	0.669	0.386
Bleach-21	3	0	2.718	0.655	0.378

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	11.687	2.337	15.170	<0.001
Residual	12	1.849	0.154		
Total	17	13.536			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores. Hay una diferencia estadísticamente significativa (P = <0.001). Poder de la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

Todos los procedimientos de comparación múltiple por pares (prueba de Tukey):
 Comparaciones por tratamiento:

Comparación	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Bleach-21 vs. Ctrl-T21	2.550	6	11.252	<0.001	Yes
Bleach-21 vs. Ctrl-T14	2.111	6	9.315	<0.001	Yes
Bleach-21 vs. Bleach-T0	1.718	6	7.581	0.002	Yes
Bleach-21 vs. Ctrl-T0	1.718	6	7.581	0.002	Yes
Bleach-21 vs. Ctrl-T14	1.201	6	5.298	0.026	Yes
Bleach-T14 vs. Ctrl-T21	1.349	6	5.954	0.012	Yes
Bleach-T14 vs. Ctrl-T14	0.910	6	4.017	0.117	No
Bleach-T14 vs. Bleach-T0	0.517	6	2.283	0.605	Do Not Test
Bleach-T14 vs. Ctrl-T0	0.517	6	2.283	0.605	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T21	0.832	6	3.670	0.172	No
Ctrl-T0 vs. Ctrl-T14	0.393	6	1.733	0.817	Do Not Test
Ctrl-T0 vs. Bleach-T0	0.000	6	0.000	1.000	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Ctrl-T21	0.832	6	3.670	0.172	Do Not Test
Bleach-T0 vs. Ctrl-T14	0.393	6	1.733	0.817	Do Not Test
Ctrl-T14 vs. Ctrl-T21	0.439	6	1.937	0.743	Do Not Test

Se produce un resultado de "No probar:Do Not Test" para una comparación cuando no se encuentra una diferencia significativa entre dos medias que encierran esa comparación. Por ejemplo, si tuviera cuatro medias ordenadas en orden y no encontrara diferencias entre las medias 4 frente a 2, entonces no probaría 4 frente a 3 y 3 frente a 2, pero aún así probaría 4 frente a 1 y 3 frente a 1. (4 contra 3 y 3 contra 2 están encerrados por 4 contra 2: 4 3 2 1). Tenga en cuenta que no probar los medios incluidos es una regla de procedimiento, y un resultado de No probar debe tratarse como si no hubiera una diferencia significativa entre las medias.

ANEXO 4

ANOVA DE UNA VÍA
 DENSIDAD DE SIMBIOTES EN MEDUSAS BLANQUEADAS

Densidad de simbioses en medusas blanqueadas bajo el tratamiento de azúcares.

Nombre del grupo	N	Missing	Mean	Desv Est	SEM
Control Verano 0-día	4	0	1.023	0.0756	0.0436
Control Verano 7-día	4	0	1.192	0.0440	0.0254
Control Verano 14-día	4	0	0.896	0.0599	0.0346
Control Verano 21-día	4	0	1.142	0.0451	0.0260
Control Verano 28-día	4	0	1.270	0.0994	0.0574
Control Invierno 0-día	4	0	1.023	0.0756	0.0436
Control Invierno 7-día	4	0	1.192	0.0440	0.0254
Control Invierno 14-día	4	0	0.896	0.0599	0.0346
Control Invierno 21-día	4	0	1.142	0.0451	0.0260
Control Invierno 28-day	4	0	1.270	0.0994	0.0574
Blanqueadas Verano 0-día	4	0	1.536	0.360	0.208
Blanqueadas Verano 7-día	4	0	0.339	0.113	0.0653
Blanqueadas Verano 14-día	4	0	0.0565	0.0138	0.00799
Blanqueadas Verano 21-día	4	0	0.0560	0.0168	0.00972
Blanqueadas Verano 28-día	4	0	0.0479	0.0200	0.0115
Blanqueadas Invierno 0-día	4	0	1.379	0.231	0.134
Blanqueadas Invierno 7-día	4	0	0.384	0.0569	0.0328
Blanqueadas Invierno 14-día	4	0	0.0662	0.0366	0.0211
Blanqueadas Invierno 21-día	4	0	0.0579	0.0277	0.0160
Blanqueadas Invierno 28-día	4	0	0.00876	0.00703	0.00406

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	14	14.307	1.022	68.012	<0.001
Residual	30	0.451	0.0150		
Total	44	14.758			

Las diferencias en los valores medios entre los grupos de tratamiento son mayores de lo que cabría esperar por casualidad; hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = <0.001$). Poder de la prueba realizada con $\alpha = 0.050$: 1.000