

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**BÚSQUEDA DE RELACIONES ENTRE LA FILOGENIA DEL  
HOSPEDERO, SU MORFOLOGÍA Y LA COMUNIDAD  
MICROBIANA SIMBIONTE ASOCIADA A LOS  
OCTOCORALES DEL GÉNERO *Pacifigorgia* DEL OCÉANO  
PACÍFICO COLOMBIANO**

**Sandra Milena Montaña Salazar**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Maestría en Ciencias-Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2019

**BÚSQUEDA DE RELACIONES ENTRE LA FILOGENIA DEL  
HOSPEDERO, SU MORFOLOGÍA Y LA COMUNIDAD  
MICROBIANA SIMBIONTE ASOCIADA A LOS  
OCTOCORALES DEL GÉNERO *Pacifigorgia* DEL OCÉANO  
PACÍFICO COLOMBIANO**

**Sandra Milena Montaña Salazar**

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias- Microbiología**

Director:

Ph.D., Juan Armando Sánchez

Codirector:

Ph.D., Andrés Mauricio Pinzón Velasco

Línea de Investigación:

Ecología microbiana

Grupo de Investigación:

Grupo de biología molecular marina BIOMMAR

Grupo de Bioinformática y biología de sistemas GIBBS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Maestría en Ciencias- Microbiología

Bogotá, Colombia

2019

*“El océano es más antiguo que las montañas y nos sorprende con los recuerdos y los sueños del tiempo”*

*H.P. Lovecraft*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi director de tesis, Juan Armando Sánchez, por abrirme las puertas de BIOMMAR en la Universidad de los Andes, por enseñarme y haberme brindado la oportunidad de compartir en su laboratorio, por el apoyo continuo en el desarrollo de mi investigación. Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por todas las oportunidades brindadas, ya que gracias a la beca de auxiliar docente pude culminar mis estudios con éxito, además de permitirme desarrollar mi maestría. A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres, que me otorgo la beca durante mi segundo semestre de maestría. A mi codirector Andrés Pinzón que siempre estuvo dispuesto a ayudarme en la parte computacional de mi trabajo y mis compañeros del grupo GIBBS por su consejo y ayuda, particularmente Juan y Edwin, así como mis compañeros del grupo de BIOMMAR, especialmente a Stephanie Colmenares. Al profesor Daniel Uribe, por sus consejos y apoyo incondicional. Asimismo, quiero mostrar mi gratitud hacia la secretaria de Microbiología Socorro, quien desde un primer momento me ayudo con el proceso de matrícula y todos los tramites, además de ser una amiga y una persona muy especial a lo largo de mi maestría. Finalmente, a mis amigos, a Alvaro y a mi familia, en especial a mi madre hermosa por todo su amor constante y apoyo durante toda la maestría.

## RESUMEN

Los corales gorgonáceos albergan una abundante y diversa comunidad microbiana que contribuye en su metabolismo, procesos de adaptación y aclimatación, los cuales mantienen el fitness y resiliencia en el holobionte coralino. Estas comunidades microbianas son frecuentemente hospedero-específicas, además, podrían estar co-evolucionando con su hospedero. Filosimbiosis es un patrón eco-evolutivo en el cual cambios en la historia evolutiva del hospedero están asociados con cambios ecológicos en la microbiota. Sin embargo, la relación entre los rasgos de los abanicos de mar, la evolución del hospedero y la microbiota asociada a los corales es desconocida. Se estudió un metabarcoding bacteriano (16s rRNA) utilizando secuenciación con Illumina Miseq para evaluar si las comunidades bacterianas son fuerzas impulsoras de radiación adaptativa en el hospedero. Se determinó la estructura, composición y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en 16 especies simpátricas de *Pacifigorgia*. Adicionalmente, se realizó un análisis de congruencia entre la filogenia del octocoral y las disimilaridades bacterianas. La estructura filogenética de la comunidad bacteriana fue determinada y se calculó la señal filogenética considerando el microbioma como un rasgo, evaluando la influencia de diferentes rasgos a lo largo de la filogenia de *Pacifigorgia*. Se encontró evidencia de patrones filosimbióticos entre el octocoral y la comunidad bacteriana por medio de diferentes métodos, donde algunas especies de *Pacifigorgia* fueron dominadas por un solo filotipo bacteriano. Por ejemplo, géneros como *Endozoicomonas* y *Mycoplasma*, los cuales presentaron abundancia relativa diferencial entre muestras, mostraron señal filogenética significativa en la historia evolutiva de *Pacifigorgia* además de ensamblajes determinísticos. Se estableció patrones filosimbióticos a un nivel preciso de ASVs asociados con especies específicas de *Pacifigorgia*. Por otro lado, el número de pólipos, huecos, área de la malla, área superficie volumen y tipo de malla están correlacionados con la composición del microbioma en *P. curta*, *P. rubicunda*, *P. stenobrochis*, *P. bayeri* y *P. curta*. Este es el primer estudio de los ensamblajes bacterianos de los octocorales de *Pacifigorgia*, los cuales sufrieron probablemente una radiación adaptativa en respuesta a las oportunidades ecológicas, donde las comunidades microbianas provee información y recapitula los procesos evolutivos de *Pacifigorgia*. Este estudio, es un paso preliminar para entender mejor la biología de la simbiosis coral-microbioma.

**Palabras clave:** *Pacifigorgia*, microbioma, filosimbiosis, holobionte, Océano Pacífico oriental tropical

## ABSTRACT

Gorgonian corals host abundant and diverse microbial communities that contribute to their metabolism, adaptation and acclimation processes, which maintain *fitness* and resilience in the coral holobiont. These microbial communities are often host-specific, moreover hypothesized to co-evolve with their host. Phylosymbiosis is an eco-evolutionary pattern in which evolutionary changes in the host associate with ecological changes in the microbiota. However, the relationship between traits of sea fans, host evolution and microbiomes associated to corals are unknown. We studied bacterial metabarcoding (16s rRNA) using Illumina MiSeq sequencing to assess if bacterial communities are adaptive radiation drivers of the host. We determinate the structure, composition and diversity of bacterial communities present in 16 sympatric species of *Pacifigorgia*. Additionally, we performed congruence analyses between the octocoral phylogeny and the bacterial dissimilarities. Phylogenetic structure of bacterial communities was determined with phylogenetic signal considering the microbiome as a trait, then, we evaluated the influence of different traits throughout *Pacifigorgia* phylogeny. We found evidence of octocoral-bacterial communities phylosymbiotic patterns using different methods, where some species of *Pacifigorgia* were dominated by a single bacterial phylotype. For instance, genera such as *Endozoicomonas* and *Mycoplasma*, which have statistical differential abundance between sea fan samples, showed significant phylogenetic signal on the evolutionary history of *Pacifigorgia*, together with deterministic assemblages. We established phylosymbiotic patterns at the precise level of certain ASVs associated with specific *Pacifigorgia* species. For other hand, the number of polyps, holes, mesh area, surface area volume and mesh type are correlated with microbiome composition in *P. curta*, *P. rubicunda*, *P. stenobrochis*, *P. bayeri* and *P. curta*. This is the first study on bacterial assemblages from *Pacifigorgia* octocorals, which are presumably undergoing an adaptive radiation in response to ecological opportunities, where the microbial communities provide information and recapitulates *Pacifigorgia* evolutionary processes. This study is, thus, a preliminary step for better understanding the biology of coral-microbiome symbiosis.

**Keywords:** *Pacifigorgia*, microbial communities, phylosymbiosis, holobiont, Pacific tropical Eastern ocean

## CONTENIDO

<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Estado del arte</b>	5
2.1 Los arrecifes de coral	5
2.2 Octocorales del género <i>Pacifigorgia</i>	6
2.2.1 Vacíos de información de <i>Pacifigorgia</i> y problemática asociada	8
2.3 Comunidades microbianas asociadas a los corales	11
2.4 Papel evolutivo del microbioma en el holobionte	14
2.5 Filosimbiosis	14
2.5.1 Métodos para determinar filোসimbiosis y otros patrones eco-evolutivos	16
<b>3. Justificación y planteamiento del problema</b>	20
<b>4. Objetivos</b>	22
<b>5. Metodología</b>	23
5.1 Colecta y procesamiento de las muestras	23
5.2 Extracción de ADN, preparación de la librería y secuenciación	24
5.3 Análisis bioinformático de las secuencias	24
5.4 Análisis de la comunidad microbiana	25
5.5 Análisis de filোসimbiosis: Comparación de la filogenia del hospedero y los dendrogramas bacterianos	26
5.6 Patrones eco-evolutivos de la comunidad microbiana y corales de <i>Pacifigorgia</i>	27
5.7 Correlación entre caracteres morfológicos de <i>Pacifigorgia</i> y su microbioma	28
<b>6. Resultados</b>	
6.1 Caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana asociada a diferentes especies del género <i>Pacifigorgia</i>	30
6.2 Descripción de filোসimbiosis y patrones eco-evolutivos entre <i>Pacifigorgia</i> y sus comunidades bacterianas	42
6.3 Influencia relativa de las variables morfológicas del hospedero y factores ambientales en el microbioma	48
<b>7. Discusión</b>	50
<b>8. Conclusiones</b>	62
<b>9. Perspectivas</b>	64
<b>10. Bibliografía</b>	65
<b>11. Anexos</b>	86

## 1.INTRODUCCIÓN

El cierre del istmo de Panamá hace 7 millones de años (Montes et al., 2012) provocó cambios drásticos en la diversidad marina tropical proporcionando nuevas oportunidades ecológicas para diversos organismos (Coates et al., 1992) como los corales gorgonaceos (Octocorallia: Holaxonia: Gorgoniidae) que proveen hábitat, sustrato alimenticio y protección para numerosas especies marinas (Sánchez, 2016). El género de abanicos de mar *Pacifigorgia*, es un grupo hiperdominante que habita en simpatria en el océano Pacífico Colombiano y que luego de este evento geológico, sufrió una radiación adaptativa rápida que conllevó al establecimiento de 34 especies en el Océano Pacífico, y solo una especie, *Pacifigorgia elegans* (Milne Edwards & Haime, 1857) en el océano Atlántico (Vargas, Guzman, & Breedy, 2008). Se caracterizan por poseer forma de malla, la cual ha sido optimizada en forma de redes para captar partículas en suspensión de la columna de agua (Esford & Lewis, 1990). Bajo este escenario, la partición de nicho y la competencia podrían conllevar a la diversidad de este grupo, reflejada en su alta plasticidad fenotípica. Otra característica importante del género, es que no se han reportado asociaciones con el dinoflagelado *Symbiodinium*, que es un simbiote común en corales emparentados del mar Caribe, recalcando el vacío de información respecto a los simbioses y el microbioma asociado a los octocorales de este género.

Los corales gorgonaceos mantienen relaciones dinámicas y complejas con diferentes microorganismos como hongos, bacterias, archaeas y virus que en su conjunto han sido denominados holobionte coralino (Bourne, Morrow, & Webster, 2016). Estos microorganismos simbioses están implicados en el mantenimiento del *fitness* y en la resiliencia coralina (van de Water, Allemand, & Ferrier-Pagès, 2018). Dentro de las múltiples funciones que llevan a cabo dentro del coral está el ciclado de nutrientes (Azam & Malfatti, 2007; Falkowski, Fenchel, & Delong, 2008), la producción de antibióticos y vitaminas (Eugene Rosenberg, Koren, Reshef, Efrony, & Zilber-Rosenberg, 2007; Rypien, Ward, & Azam, 2010), la protección contra patógenos (Rohwer, Seguritan, Azam, & Knowlton, 2002; Rypien et al., 2010), además de estar involucrados en procesos evolutivos como adaptación y aclimatación transgeneracional del coral a diferentes condiciones ambientales e inmunidad (Webster & Reusch, 2017). Si bien se conocen ciertos mecanismos por medio de los cuales las bacterias median modificaciones en el fenotipo del hospedero, no se tiene suficiente conocimiento y claridad de cómo evoluciona la simbiosis coral-microorganismo (Pollock et al., 2018), y aunque se ha demostrado que los factores ambientales tienen más peso que factores genéticos y de la historia evolutiva del hospedero, falta más entendimiento respecto a la evolución de este sistema y de cuáles son los



efectos del hospedero en el ensamblaje de las comunidades microbianas (Brooks, Kohl, Brucker, van Opstal, & Bordenstein, 2016) y viceversa.

Varios estudios han demostrado que existe especificidad hospedero-microbioma en diferentes especies de coral (Bayer, Neave, et al., 2013; Morrow, Moss, Chadwick, & Liles, 2012; Rohwer et al., 2002; Sunagawa, Woodley, & Medina, 2010; van de Water et al., 2017) estableciendo que las comunidades microbianas similares en composición están asociadas con especies coralinas más relacionadas evolutivamente (Rosenberg, et al. , 2007), es decir, que los ensamblajes de las comunidades microbianas se dan por un proceso determinístico, siguiendo la diversificación de su hospedero o filosismbiosis. Este concepto describe un patrón eco-evolutivo, donde similitudes ecológicas de las comunidades microbianas están asociadas o reflejan similitudes en la historia evolutiva del hospedero (Leigh, Bordenstein, Brooks, Mikaelyan, & Bordenstein, 2018). Se ha determinado filosismbiosis en homínidos, avispas (Brucker & Bordenstein, 2012), hormigas, moscas, ranas (Bletz et al., 2017), aves, ratones, esponjas (Easson & Thacker, 2014; Steinert, Rohde, Janussen, Blaurock, & Schupp, 2017) y corales (Pollock et al., 2018), enfatizando la importancia y recurrencia de este patrón eco-evolutivo en la naturaleza, necesario para entender el rol evolutivo de los microorganismos en esta simbiosis.

El microbioma de un organismo contiene información valiosa y se ha demostrado que puede influir en la biología del hospedero, al realizar un balance entre un estado de salud y uno de enfermedad, afectando el comportamiento y desarrollo del hospedero, que en su conjunto son relevantes en la aptitud evolutiva del mismo (Bordenstein & Theis, 2015). Debido a que está involucrado en el comportamiento del hospedero, el microbioma podría llegar a contribuir en la trayectoria evolutiva, especiación y extinción de linajes, o en la diversificación del hospedero (Hird, 2019). Sin embargo, aún existen muchas preguntas sin resolver respecto al papel de los simbioses en la evolución del hospedero, siendo esta área de investigación una frontera en la biología evolutiva (Hird, 2017). La descripción de los ensamblajes de las comunidades microbianas dentro de cada hospedero coralino, permitiría determinar el efecto de los microorganismos en la historia evolutiva de los corales y aportar información relevante para el género, la cual sería complementada con los caracteres morfológicos del coral y factores ambientales, para describir esta simbiosis. En el caso del género *Pacificorgia*, que no cuenta con una coherencia entre sus caracteres morfológicos y sus caracteres genéticos (M. M. Soler-Hurtado, López-González, & Machordom, 2017), la taxonomía se torna un poco conflictiva a

la hora de clasificar estas especies, siendo el microbioma una posible solución que aportaría información en la biología evolutiva de este género.

Es posible que los endosimbiontes microbianos sean una estrategia de los octocorales del género *Pacifigorgia* para alcanzar diferentes demandas energéticas, que le permitieron sobrevivir y adaptarse a diversos nichos ecológicos en el POT luego del cierre del istmo, creando una relación de filosisimbiosis. Por tal motivo, se hace imperante la investigación del microbioma para entender la simbiosis *Pacifigorgia*-microbioma, y comprender la historia evolutiva de este sistema biológico. Actualmente, solo existe un estudio sobre el microbioma de *Pacifigorgia*, el cual se realizó exclusivamente en *Pacifigorgia cairnisi* localizada en la Isla de Malpelo. Se llevó a cabo una comparación entre corales sanos y enfermos con la enfermedad de los parches necróticos, determinando que el género bacteriano *Endozoicomonas* alcanzó 60% de abundancia dentro del core microbiano estando asociado a un estado saludable del coral, resaltando el aporte y la función de estos ensamblajes bacterianos en el holobionte coralino. El estudio concluye que entender los cambios de la comunidad microbiana frente a un disturbio o bajo un escenario de cambio climático o patogénesis, ayuda a comprender las dinámicas del holobionte y su papel en la homeostasis del coral (Quintanilla et al., 2018). Siendo este el único estudio del grupo, es claro que se necesitan más estudios para identificar las comunidades microbianas asociadas a las 16 especies presentes en Colombia, su estructura y función dentro del holobionte a la hora de establecer el estado de salud del coral y toda la dinámica asociada a esta simbiosis.

Por este motivo, el objetivo de este trabajo es identificar patrones eco-evolutivos entre diez especies del género *Pacifigorgia* y su microbioma asociado, para elucidar la estructura y la composición de los diferentes ensamblajes de las comunidades bacterianas a través de la historia evolutiva del género, entendiendo la simbiosis desde un punto de vista evolutivo y utilizar el microbioma como un insumo junto con los rasgos morfológicos del hospedero para entender más su historia evolutiva. Se colectaron 70 muestras en el océano Pacífico Oriental tropical (POT) colombiano, en las localidades de la Isla de Malpelo y Chocó. Posteriormente, se realizaron librerías para las respectivas muestras y se secuenció la región hipervariable V4 del gen ribosomal 16s RNA, prestando atención a los miembros del dominio Bacteria del microbioma. Asimismo, se tomó como insumo la filogenia de *Pacifigorgia* y se estableció la filogenia de las comunidades bacterianas para determinar los patrones eco-evolutivos y filosisimbiosis. Por otro lado, se tomaron datos de los caracteres morfológicos de los corales para correlacionarlos con la comunidad microbiana y evaluar la influencia de estos factores en el

microbioma coralino. Se encontró una relación positiva entre la disimilaridad de las comunidades bacterianas y las distancias filogenética de los octocorales. Se evidenció que el microbioma de este género está dominado por *Endozoicomonas* y *Mycoplasma*, estando diferencialmente expresados en los diferentes clados de *Pacifigorgia*. El patrón eco-evolutivo de filosismbiosis pudo ser evidenciado por tres metodologías, el test de Mantel, la señal filogenética encontrada en algunas bacterias con ciertas especies de *Pacifigorgia*, y los índices NRI y NTI, los cuales permitieron discernir que las comunidades microbianas se ensamblan determinísticamente en las diferentes especies de *Pacifigorgia*. Este es el primer estudio sobre los ensamblajes de las comunidades bacterianas en el género *Pacifigorgia* que presumiblemente evoluciono en el Pacífico por medio de radiación adaptativa, donde el microbioma aporta información y recapitula estos procesos evolutivos en *Pacifigorgia*.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Los arrecifes de coral

Los arrecifes coralinos son ecosistemas complejos constituidos por un ensamblaje de diversos animales, plantas, microorganismos y virus, representando grandes estructuras biológicas (Sebens, 1994). Los arrecifes están entre los ecosistemas más diversos y productivos de la Tierra (Connell, 1978; Hughes, Bellwood, & Connolly, 2002; Odum & Odum, 1955; Roberts et al., 2002) con elevadas tasas de productividad neta que oscilan entre 256 a 1696 mmol de carbono por día, productividad que se compara con la de un bosque tropical lluvioso (Mulhall, 2008; Silveira et al., 2017). Asimismo, proveen hábitat para un 25% de las especies marinas (Connell, 1978) pese a que ocupan un 1% del piso oceánico (Mulhall, 2008; Sheppard, Davy, & Pilling, 2009). Además, estos ecosistemas proveen múltiples bienes y servicios al ser humano siendo fuente invaluable de riqueza económica, cultural y ecológica (Cesar, Burke, & Pet-Soede, 2003). Entre estos servicios esta la pesca, servicios recreativos y turísticos, protección costera, beneficios culturales y estéticos (Moberg & Folke, 1999) evaluados en 30 billones de dólares al año (Cesar et al., 2003).

Los arrecifes coralinos son construcciones biogénicas que se forman gracias a la deposición de carbonato de calcio por corales escleractineos, hidrocorales y algas coralinas incrustantes (Sánchez, 2016) que forman estructuras tridimensionales siendo los mayores representantes del phylum Cnidaria (Daly, Fautin, & Cappola, 2003). Dentro de este phylum se encuentra la clase Anthozoa, caracterizada por poseer organismos coloniales con estructuras en forma de tubos con tentáculos denominados pólipos. Con estas estructuras, estos organismos capturan su alimento, sin embargo, pueden obtener reservas energéticas de sus simbioses (Bourne & Webster, 2013). Los corales presentan múltiples asociaciones mutualistas con una amplia variedad de microorganismos como bacterias, archaeas, virus, hongos, dinoflagelados del género *Symbiodinium* y cianobacterias (Rohwer et al., 2002), los cuales contribuyen a la estabilidad del coral. Dichas asociaciones interactúan dentro del holobionte (Bourne et al., 2009; Knowlton & Rohwer, 2003), el cual hace referencia al hospedero con todos sus microorganismos asociados.

Se ha determinado que las comunidades bacterianas son fundamentales para la supervivencia del coral ya que proveen múltiples beneficios para la salud del holobionte. Estas bacterias simbioses son reconocidas como participantes integrales en la aclimatización y adaptación de

eucariotas a distintos cambios en el ambiente (Bosch, 2013; Bosch & McFall-Ngai, 2011; McFall-Ngai et al., 2013; Sachs, Skophammer, & Regus, 2011), además de mantener la resiliencia y el *fitness* dentro del arrecife (Tout et al., 2014; van de Water et al., 2017).

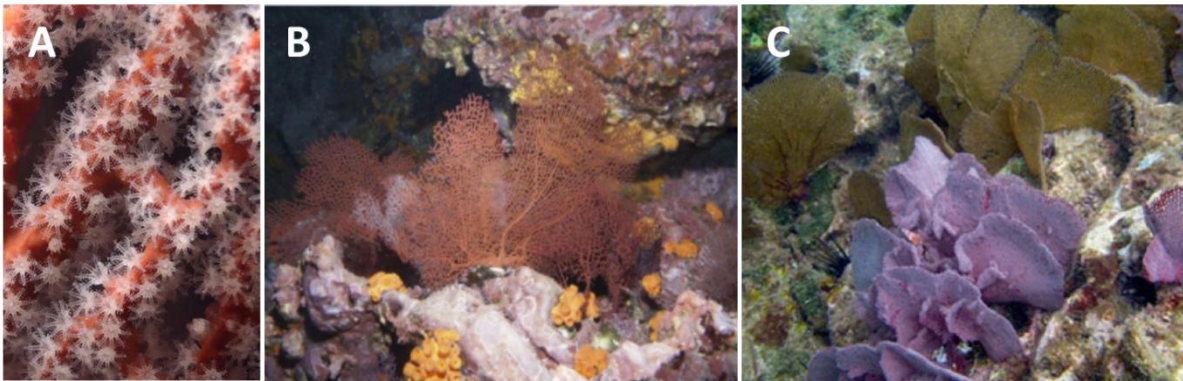
## **2.2. Octocorales del género *Pacifigorgia***

Los octocorales (Cnidaria: Octocorallia) son invertebrados con cuerpo suave que se caracterizan por tener pólipos con ocho tentáculos (Figura 1.a) y ocho mesenterios internos (Daly et al., 2007). Existen aproximadamente 3500 especies con 378 géneros descritos, además, han sido reportados en diversos ambientes marinos que varían desde aguas someras hasta hábitats profundos tanto en el trópico como en las regiones árticas y antárticas (McFadden, Sánchez, & France, 2010; van de Water, Allemand, et al., 2018). Asimismo, se encuentran en casi todos los hábitats bentónicos marinos formando densas comunidades dominadas por corales gorgonáceos (Octocorallia: Holaxonia: Gorgoniidae) que proveen hábitat para diversos organismos (Sánchez, 2016). Se caracterizan por ser altamente diversos y formar colonias (Vargas et al., 2008) que proporcionan complejidad estructural al ecosistema (van de Water, Allemand, et al., 2018). Cuentan con un papel importante en el acoplamiento bentónico-pelágico mediando la transferencia de energía en cadenas tróficas costeras (Gili & Coma, 1998).

Respecto a su morfología, las colonias son erectas, altamente ramificadas con forma de árbol (Figura 1.b) y ejes bien definidos (Velásquez & Sánchez, 2015), siendo característico del grupo la variedad de formas (Sánchez, 2004). Debido a estas características, la superficie de adhesión al sustrato es mínima, estando la mayor parte de su biomasa en contacto con la columna de agua por lo que se alimentan de partículas en suspensión (Jackson, 1977). Otro rasgo de las colonias de corales gorgonáceos es su alta densidad con predominio sobre los sustratos rocosos (Figura 1.c) (Sánchez, 2016), siendo bastante comunes en el océano Pacífico oriental tropical (POT) abarcando desde Perú hasta Estados Unidos, California (Grigg, 1977).

Los ensamblajes de corales gorgonáceos en el POT están dominados por abanicos de mar del género *Pacifigorgia*, un grupo altamente diverso y abundante presente en aguas poco profundas, que tienen la peculiaridad de adherirse a sustratos rocosos soportando fuertes corrientes (Breedy & Guzman, 2002). El género cuenta con 34 especies localizadas en el Océano Pacífico, y solo una especie *Pacifigorgia elegans* (Milne Edwards & Haime, 1857) ubicada en el océano Atlántico (Vargas et al., 2008). Esta particularidad se dio por el cierre del istmo de Panamá que conllevó a que especies de corales gorgonáceos tuvieran una

diversificación reciente a ambos lados de esta barrera(Sánchez, 2016). Específicamente, el POT se convirtió en un ecosistema mesotrófico con aguas más frías conllevando al aumento de biomasa y diversidad del plancton (Fiedler, Philbrick, & Chávez, 1991). Se establecieron cambios en la diversidad marina tropical (Coates et al., 1992) que proporcionaron nuevas oportunidades ecológicas para estos organismos (Barrero-Canosa, Dueñas, & Sánchez, 2013; Hewson et al., 2012). Esta diversidad biológica fue aprovechada por los abanicos de mar de este género (Sánchez, 2016) que optimizaron su forma y tamaño a manera de redes para captar diferentes tipos de partículas de la columna de agua (Esford & Lewis, 1990), prosperando en simpatria en el POT(Ament-Velásquez et al., 2016a). Estas especies de *Pacifigorgia* se establecieron en el POT y sufrieron una radiación adaptativa rápida (Colmenares,2017).



**Figura 1.** Morfología de los octocorales del género *Pacifigorgia*. a) Detalle de los pólipos con ocho tentáculos de *P. cairnsi* de la Isla Malpelo, imagen tomada de (Sánchez, 2013), b) Colonia ramificada de *P. cairnsi* de la Isla Malpelo, imagen tomada de (Quintanilla et al., 2018), c) *P. firma* y *P. rubicunda* formando una comunidad densa en la Isla Gorgona, imagen tomada de (Sánchez, 2016).

En Colombia existen 16 especies reportadas de *Pacifigorgia* en Isla Gorgona y Cabo corrientes, y de tres a cuatro en la Isla Malpelo. Asimismo, se han realizado estudios poblacionales y ecológicos de estas especies en la Isla Gorgona (Sánchez et al., 2014), Isla Malpelo (Quintanilla et al., 2018; Sánchez, Gómez, Escobar, & Dueñas, 2011) y en el departamento de Choco, específicamente en cabo corrientes y Nuquí (Barrero-Canosa et al., 2013; Sánchez et al., 2016), determinando su abundancia y diversidad en el océano Pacífico Colombiano.

Mientras algunos octocorales por su morfología dependen netamente de las corrientes para alimentarse (filtradores), otros mantienen asociaciones mutualistas con simbioses como las zooxantelas (algas dinoflageladas) que proporcionan bioproductos orgánicos de la fotosíntesis al coral (Bourne & Webster, 2013). En el caso de los octocorales del género *Pacifigorgia* que no poseen zooxantelas, se plantea que deben presentar otro tipo de microorganismos simbioses que le ayuden al coral a alcanzar sus demandas metabólicas. Sin embargo, el microbioma asociado a corales del género *Pacifigorgia* no han sido muy estudiado (Sánchez, 2016). En Colombia, existe únicamente un estudio de la especie *Pacifigorgia cairnsi*, en el cual se comparan las comunidades bacterianas asociadas a corales sanos y con la enfermedad de los parches necróticos (Quintanilla et al., 2018). Se identificó que corales enfermos presentan una disminución en los miembros del core microbiano saludable y que ciertos endosimbiontes están estrechamente relacionados con el estado de salud del coral, siendo fundamental el estudio de estos microbiomas para entender la simbiosis entre octocorales y su microbioma. El core microbiano está dominado por el orden Oceanospirillales, donde el género *Endozoicomonas* fue el más representativo (Quintanilla et al., 2018). Este grupo cumple múltiples funciones en el metabolismo, transporte y síntesis de diferentes moléculas en el coral (Bayer, Arif, et al., 2013; Neave et al., 2017; Yang et al., 2010), siendo un grupo simbiote importante de estos octocorales. El microbioma de estos corales podría ser especie-específico y podría ayudar a alcanzar diferentes nichos alimenticios al octocoral.

### **2.2.1. Vacíos de información de *Pacifigorgia* y problemática asociada**

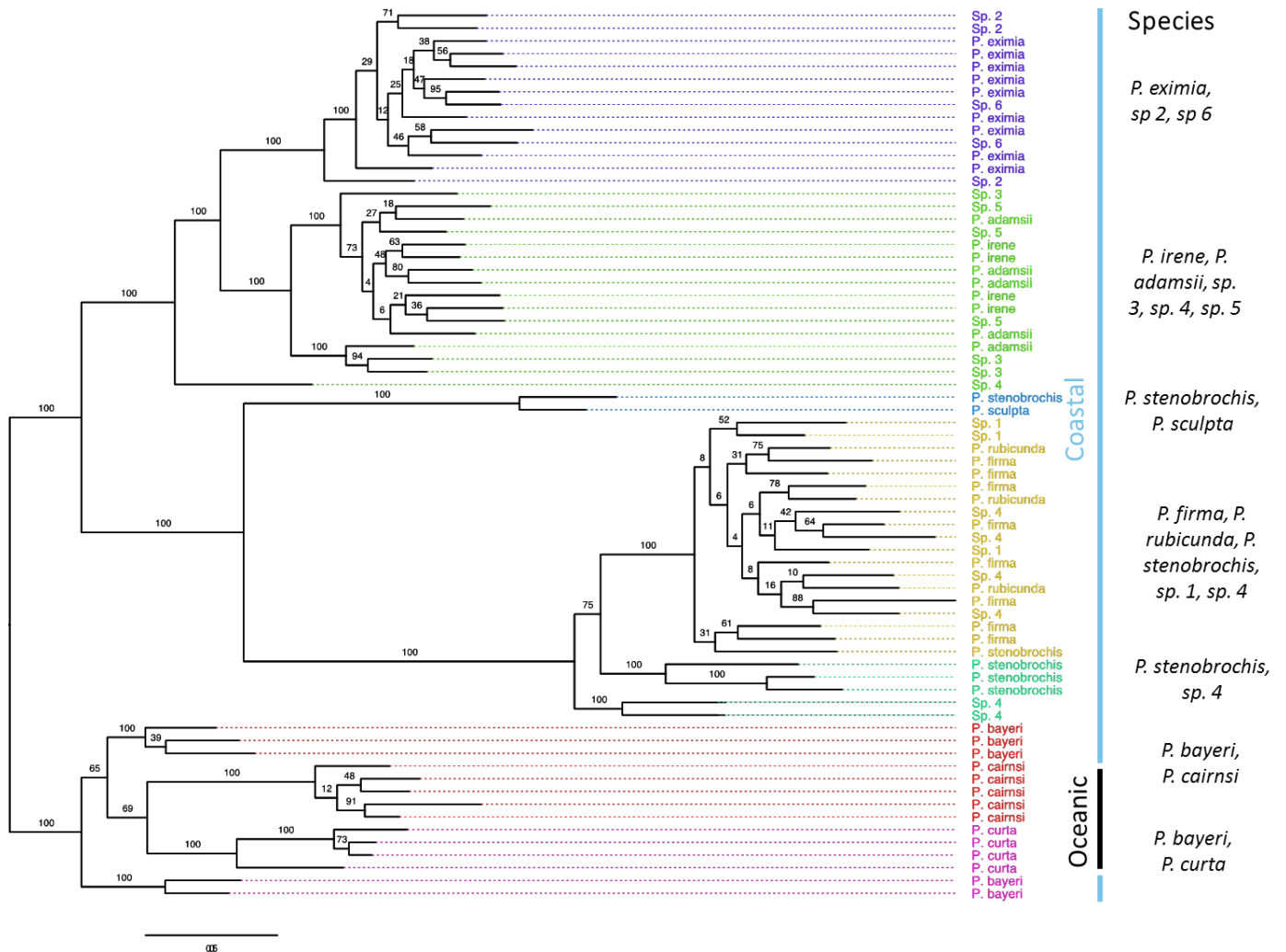
En general, los arrecifes coralinos están enfrentando una problemática global debido a la polución, el cambio climático y la sobrepesca que afectan la salud y función de estos ecosistemas (Bourne & Webster, 2013). Acciones antropogénicas como la construcción cerca a las costas, la agricultura y sus prácticas, conducen a la eutrofización del océano disminuyendo la calidad del agua (Fabricius, 2005). Asimismo, la ocurrencia de enfermedades coralinas ha aumentado en los últimos años (Altizer, Harvell, & Friedle, 2003). Específicamente, los corales del género *Pacifigorgia* han venido presentado un declive de sus poblaciones en el POT colombiano (Polidoro et al., 2012), ya que según varios estudios se han detectado mortalidades masivas y enfermedades infecciosas debido a microorganismos como el hongo *Aspergillus sydowii* que modifican el crecimiento y defensa contra patógenos en *Pacifigorgia* en las localidades de cabo corrientes y en la Isla de Malpelo (Barrero-Canosa et al., 2013; Sánchez et al., 2011). Asimismo, en otro estudio se observó que existen mortalidades de la especie *P.*

*cairnsi* relacionadas con el brote de la enfermedad de los parches necróticos, la cual se caracteriza por presentar un consorcio oportunista.

Además del declive en sus poblaciones, la taxonomía de *Pacifigorgia* es un acertijo el cual ha tratado de ser elucidado en múltiples investigaciones. Se determinó que no existe una coherencia entre la diferenciación morfológica y la diferenciación genética (Ament-Velásquez et al., 2016b), además de no existir marcas en los caracteres morfológicos y sus comparaciones con filogenias moleculares exhiben homoplasia y convergencia. Por lo que es un género con patrones evolutivos complejos, se han realizado otros esfuerzos investigativos para definir especies en *Pacifigorgia*, específicamente en un estudio con especies de Ecuador, se realizaron filogenias utilizando dos marcadores moleculares mitocondriales CoxII y mtMutS, y dos nucleares ITS y 28S, donde se determinó que estas especies muestran patrones contrastantes para estos marcadores moleculares, concluyendo que existe una conspicua diferenciación morfológica entre las especies con una nula a mínima diferenciación genética debido a la rápida radiación adaptativa de estas especies del género (M. M. Soler-Hurtado et al., 2017). Asimismo, dentro del grupo de investigación BIOMMAR, se realizaron varias filogenias de *Pacifigorgia* con varios marcadores moleculares sin obtener resultados (ANEXO A) debido a lo reciente del género. Sin embargo, en el 2017 en el grupo de investigación se elaboró una filogenia del género que incluye 10 especies de *Pacifigorgia*, con la cual se logró determinar la presencia de siete clados (Figura 2) bien definidos por 18000 SNPs secuenciados con nextRAD (Restriction site Associated DNA sequencing), que contiene bootstrap de 100 en la base de la mayoría de sus clados y que están correlacionados con la diversidad morfológica (Colmenares-García S., 2017). En este estudio se concluye que podría existir una sobrestimación de las especies de *Pacifigorgia*, donde la historia de los genes varía respecto a la historia de las especies debido a que existe una alta diversidad fenotípica en el POT colombiano. Asimismo, se establece por medio del análisis molecular que *Pacifigorgia* sufrió una rápida radiación relacionada con la diversidad de morfotipos encontrados en cada clado de la filogenia. Por otro lado, siendo la productividad una fuerza importante en procesos como la diversificación de especies, podría estar correlacionada con factores ambientales como las estrategias de alimentación de cada una de las especies, ya que, al tener una morfología de malla distinta, puede existir una partición de nicho entre estas especies simpátricas. Por este motivo, para definir especies es fundamental tener en cuenta caracteres morfológicos, moleculares, ecológicos y fisiológicos (Eernisse & Kluge, 1993; Prada & Hellberg, 2013) que involucren la comunidad de simbioses en *Pacifigorgia*, en cuanto a su composición, riqueza y función. Este



género al no contar con zooxantelas, debe contar con otro tipo de microorganismos como bacterias para alcanzar sus demandas metabólicas y mantener su funcionamiento.



**Figura 2.** Filogenia del género *Pacifigorgia* elaborada con RaxML, utilizando 13187 SNPs para 70 individuos. El soporte bootstrap se encuentra en cada rama. La línea de escala representa el número de sustituciones por nucleótido. Se observan en color los siete clados determinados para 10 especies del género, además de incluir a seis especies que aún no han sido clasificadas. Tomado de la tesis de Colmenares-García S., 2017.

### 2.3. Comunidades microbianas asociadas a los corales

Recientes investigaciones han resaltado que los corales gorgonáceos poseen alta diversidad de simbiontes (Barrero-Canosa et al., 2013; Hewson et al., 2012), especialmente de comunidades bacterianas (Correa, Haltli, Duque, & Kerr, 2013; Riviére, Garrabou, & Bally, 2015; van de Water et al., 2017) cumpliendo múltiples roles dentro del hospedero coralino (Figura 3). Los corales forman intrincadas y complejas relaciones con una amplia gama de microorganismos simbiontes como bacterias, virus, archaeas, algas y protistas que conforman el holobionte. Este holobionte es importante para el *fitness* del hospedero y para su supervivencia, siendo sensibles a las perturbaciones ambientales y fisiológicas (Bourne et al., 2016) y afectando el comportamiento, la anatomía, la fisiología, reproducción del coral (Bordenstein & Theis, 2015; McFall-Ngai et al., 2013).

Según Rosenberg et al. 2007, existen características específicas de las comunidades microbianas asociadas a los corales. Una de estas es que la diversidad de especies de bacterias en los tejidos del coral es alta, encontrándose cientos de OTUs asociados (Blackall, Wilson, & Oppen, 2015). Además de esta característica, las comunidades microbianas se encuentran en grandes densidades oscilando entre  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^6$  células por centímetro cuadrado de tejido del hospedero (Garren & Azam, 2012). La tercera característica está enfocada en la identidad de las bacterias del holobionte, la cual es diferente de la comunidad microbiana de la columna de agua sugiriendo una asociación específica entre el coral y su microbioma. Finalmente, comunidades bacterianas similares en composición están asociadas con las mismas especies coralinas contrastando con comunidades diferentes las cuales son encontradas en diferentes especies de coral.

Según varios estudios una de las principales funciones de esta comunidad involucra el ciclado de nutrientes (Azam & Malfatti, 2007; Falkowski et al., 2008) interviniendo en el ciclo del carbono, siendo capaces de fijar carbono a través de diversas vías metabólicas como ciclo de Calvin, la vía reductiva del acetyl-CoA, y el ciclo reverso de Krebs, asimismo pueden degradar el carbono y se identificó que pueden translocar estos nutrientes al holobionte (Kimes, Van Nostrand, Weil, Zhou, & Morris, 2010). Por otro lado, bacterias capaces de fijar nitrógeno pueden suplementar al coral con nitrógeno en forma de amonio, además de estar involucradas en procesos de nitrificación y desnitrificación (Ceh et al., 2013). Otra vía metabólica donde el microbioma está implicado es el ciclo del azufre, ya que ciertas bacterias, como las pertenecientes al género *Endozoicomonas*, son capaces de metabolizar el DMSP (dimetilsulfoniopropionato) que produce el coral permitiendo el ciclado de este nutriente en el

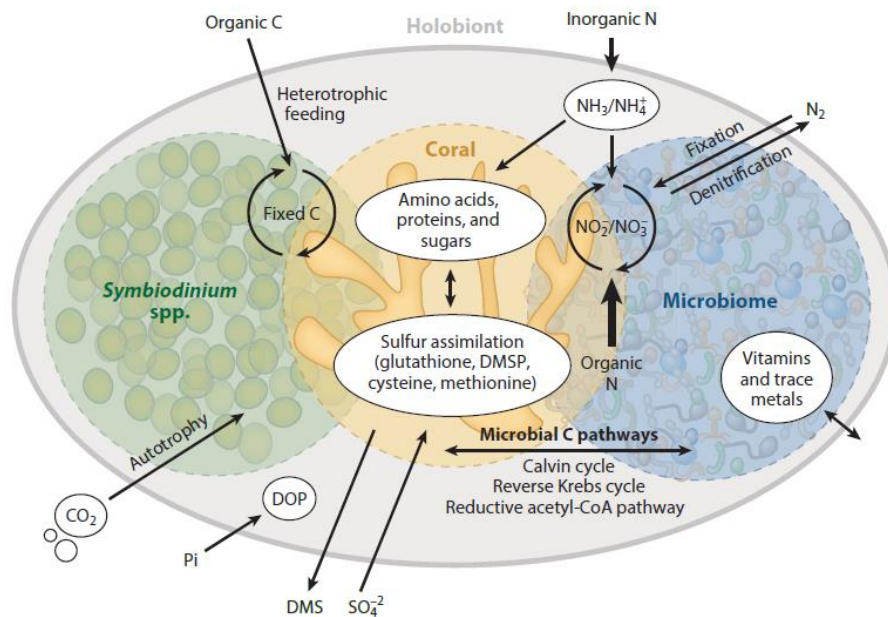
holobionte. Debido a esta creciente evidencia, el microbioma controla la productividad y la función biogeoquímica dentro de los arrecifes coralinos (Tout et al., 2014).

El microbioma provee al coral de bioproductos como proteínas, compuestos nitrogenados y son capaces de sintetizar vitaminas (Croft, Lawrence, Raux-Deery, Warren, & Smith, 2005). Por otro lado, esta comunidad de microorganismos protegen al coral de enfermedades ya sea por la producción de antibióticos (Eugene Rosenberg et al., 2007; Rypien et al., 2010) o por la exclusión de patógenos a través de la ocupación de nichos microbianos disponibles (Rohwer et al., 2002; Rypien et al., 2010). Otra de las funciones de los simbioses bacterianos es que contribuyen en la fisiología, desarrollo e inmunidad de sus hospederos y pueden responder rápidamente a condiciones ambientales cambiantes, proveyendo un mecanismo de aclimatación y adaptación en el holobionte (Webster & Reusch, 2017).

En cuanto a la composición de las comunidades bacterianas asociadas a octocorales se ha establecido por múltiples estudios que en comparación con corales duros o escleractineos, tienen menos diversidad (Correa et al., 2013; Vezzulli, Pezzati, Huete-Stauffer, Pruzzo, & Cerrano, 2013), lo cual es más adecuado para estudiar las funciones y evolución de la simbiosis entre octocorales y bacterias (van de Water, Allemand, et al., 2018). Existen grupos que predominan en el core bacteriano asociado a corales gorgonáceos, frecuentemente bacterias del phylum Proteobacterias, específicamente, las pertenecientes al género *Endozoicomonas* (Bayer, Arif, et al., 2013; Correa et al., 2013; Quintanilla et al., 2018; van de Water et al., 2017; Vezzulli et al., 2013). Este grupo es un simbiote común que desempeña diversas funciones dentro del holobionte coralino como síntesis de diferentes aminoácidos, gluconeogénesis, transporte de varias moléculas, ciclado de nutrientes como carbono y nitrógeno (Neave, Apprill, Ferrier-Pagès, & Voolstra, 2016). Otro género de bacterias que se encuentra comúnmente en corales gorgonáceos es *Mycoplasma*, encontrado en especies de gorgonáceos como *Paragorgia arborea*, *Plumarella superba*, *Cryogorgia koolsae* (Gray, Stone, McLaughlin, & Kellogg, 2011), *Muricea californica*, *Muricea fruticosa* (Holm & Heidelberg, 2016), *Eunicea flexuosa*, *Pseudoplexaura porosa* y *Pacifigorgia cairnsi* (Quintanilla et al., 2018), sin embargo se desconoce su papel en estos corales. Por otro lado, existen grupos predominantes como Aquimarina (Keller-Costa, Silva, Lago-Lestón, & Costa, 2016), Cellvibrionales (van de Water, et al., 2018), *Vibrio* (Franco, Califano, Gonçalves, Cúcio, & Costa, 2016) y Spirochaeta (Holm & Heidelberg, 2016). Otro phylum dominante en estos corales blandos son las Actinobacterias,

en el cual se ha reportado la presencia del género *Propionibacterium* (Kellogg, Ross, & Brooke, 2016).

La estructura y composición del microbioma en gorgonáceos es fundamental para entender la simbiosis y su evolución, sin embargo, es importante comprender las relaciones entre estos microorganismos y entender como están influenciados por factores físicos y factores dentro del holobionte (Ainsworth, Thurber, & Gates, 2010). La naturaleza de estas interacciones puede ser mutualista, comensalista o patológica (Eugene Rosenberg et al., 2007) dependiendo del tipo de asociación, función y de las condiciones ambientales. Es importante entender la diversidad asociada a los corales e identificar interacciones entre la comunidad microbiana, el hospedero, su evolución como holobionte y el efecto de las condiciones ambientales en el mismo.



**Figura 3.** Holobionte coralino. Se observan las principales interacciones entre el coral y sus simbiontes. Específicamente, el microbioma está interactuando con el coral a través de varias vías metabólicas como la del carbono, en la cual fijan y degradan carbono a través de distintas vías metabólicas, la del nitrógeno, en el cual son capaces de fijar y desnitrificar el nitrógeno haciendo disponible su toma por el coral. Además, el microbioma transfiere vitaminas, nutrientes y metales al coral. Tomado de (Bourne et al., 2016).

## **2.4. Papel evolutivo del microbioma en el holobionte**

El microbioma es un componente fundamental en la evolución del hospedero, debido a que afecta el estado de salud de este, su desarrollo y comportamiento. El hecho de que controla todos estos factores podría sugerir que lleva a cabo un rol valioso en la trayectoria evolutiva de las poblaciones, en la extinción o en la diversificación del hospedero (Hird, 2019).

Una investigación realizada por Webster & Reusch, 2017 señala que las bacterias asociadas al coral juegan un papel en la biología evolutiva del hospedero, describen que los corales pueden aclimatarse por cambios en el microbioma, ya que este evoluciona mucho más rápido que el hospedero. Esta aclimatación puede darse por medio de tres fenómenos, el primero son los cambios en la frecuencia de la comunidad microbiana (shuffling), la adquisición de nuevos microorganismos (switching) o la transferencia horizontal de genes. Asimismo, esta aclimatación puede facilitar la adaptación del hospedero a nuevos o cambiantes ambientes (Alberdi, Aizpurua, Bohmann, Zepeda-Mendoza, & Gilbert, 2016).

Existe la teoría del hologenoma, que señala que en su conjunto el microbioma y el hospedero son una compleja unidad biológica que exhibe fenotipos sinérgicos sujetos a diferentes fuerzas evolutivas (Eugene Rosenberg, Sharon, Atad, & Zilber-Rosenberg, 2010). Se concibe que el genoma del microbioma y el del hospedero son un sistema génico del holobionte, que puede aumentar, disminuir o no afectar el *fitness* del sistema, debido a que sobre el hologenoma la ecología y la evolución actúan (Bordenstein & Theis, 2015). Los cambios que puedan existir en el hologenoma pueden deberse a cambios del hospedero o de los microorganismos simbiotes y debido a que estos últimos evolucionan más rápidamente que el hospedero, están aportando más cambios en su material genético que conllevaran a nuevas adaptaciones y especiación en el hospedero (E Rosenberg, Sharon, & Zilber-Rosenberg, 2009).

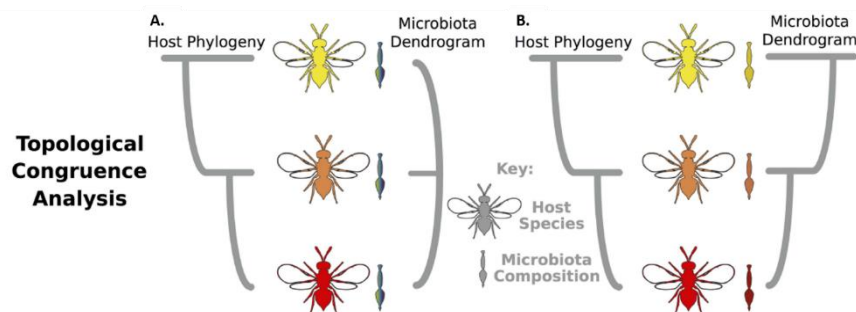
A pesar de estos múltiples esfuerzos investigativos, se necesita más énfasis en el papel que llevan a cabo los microorganismos en el holobionte, y como este puede ser visto como unidad donde opera la evolución. Es importante clarificar de qué manera y que factores están contribuyendo a que el microbioma afecta la evolución del hospedero.

## **2.5. Filosisimbiosis**

Muchos estudios han sugerido que existe una especificidad hospedero-microbioma en distintos corales (Bayer, Neave, et al., 2013; Morrow et al., 2012; Rohwer et al., 2002; Sunagawa et al.,

2010; van de Water et al., 2017), además dentro del microbioma hay grupos de bacterias específicos asociados a los mismos (Bourne & Munn, 2005; Kvennefors, Sampayo, Ridgway, Barnes, & Hoegh-Guldberg, 2010; Rohwer et al., 2002). En un estudio se determinó que la comunidad microbiana del hospedero esta correlacionada con la divergencia de genes hospederos, recalcando la importancia de la relación evolutiva del hospedero en la composición del microbioma (Brucker & Bordenstein, 2012).

Uno de los más intrincados patrones del microbioma asociado al hospedero es si existe una especificidad con el mismo y si especies cercanas de coral están asociadas con microbiomas similares, es decir si la composición del microbioma presenta una señal filogenética. Esto se traduce en el término filosisimbiosis (Bordenstein & Theis, 2015; Brooks et al., 2016; Brucker & Bordenstein, 2013; Theis et al., 2016), el cual postula que clados de hospederos cercanos poseen comunidades microbianas más inmediatamente relacionadas y es descrito como un patrón eco-evolutivo, en el cual cambios en la historia evolutiva del hospedero están asociados o correlacionados con cambios en la estructura ecológica de las comunidades microbianas (Brooks et al., 2016). Asimismo, en la filosisimbiosis existe una congruencia entre la filogenia del hospedero y el dendrograma de las comunidades microbianas (Figura 4) basado en el grado de la taxonomía compartida y/o en la abundancia de miembros de la comunidad (Theis et al., 2016). Cambios en esta comunidad microbiana reflejan la filogenia del hospedero, y las relaciones del microbioma a través de la historia evolutiva de las especies del hospedero, mantienen una señal filogenética ancestral de la evolución del hospedero (Bordenstein & Theis, 2015; Brucker & Bordenstein, 2013).



**Figura 4.** Patrón de filosisimbiosis. Análisis de congruencia topológica entre la filogenia del hospedero y el dendrograma de las comunidades microbianas asociadas. En A. se observa un ensamblaje de las comunidades microbianas estocástico, mientras que en B. se observa un

patrón de filosisimbiosis, o un patrón determinístico del ensamblaje de las comunidades microbianas. Tomado y modificado de (Brooks et al., 2016)

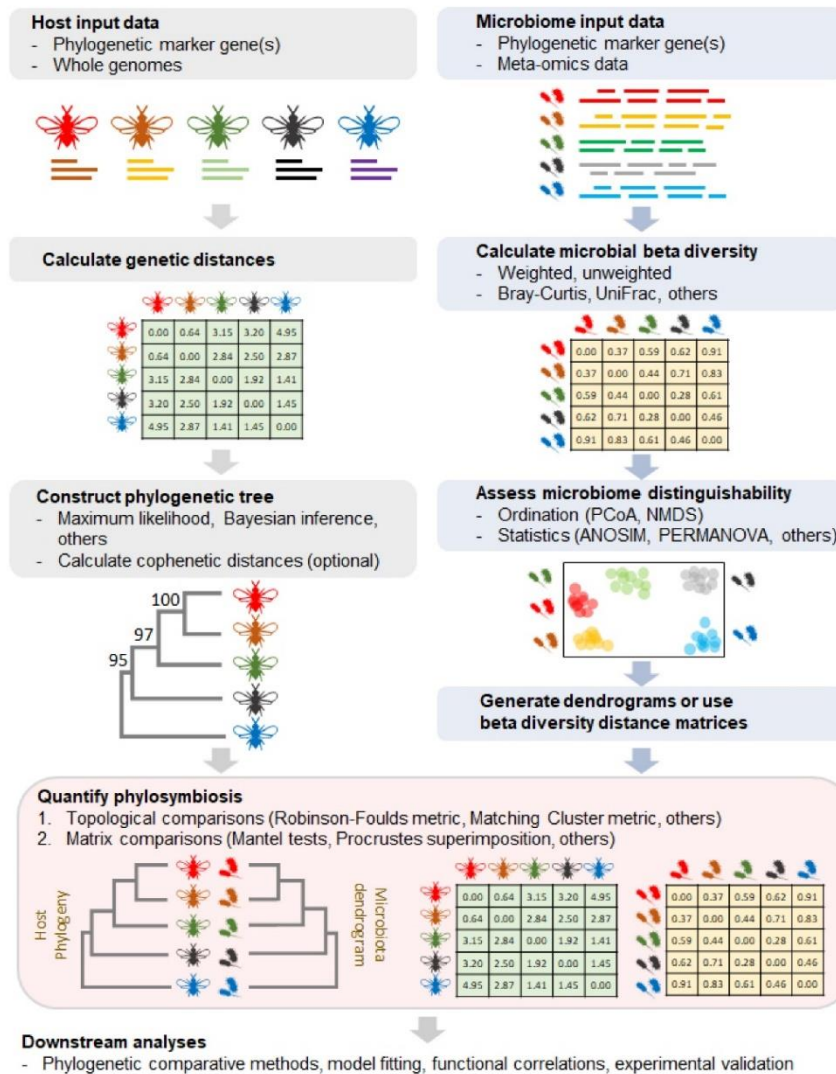
Según la teoría de filosisimbiosis, si el hospedero influye considerablemente en la composición del microbioma, la comunidad microbiana intraespecífica es más similar entre sí que las comunidades microbianas interespecíficas, además hospederos con más divergencia genética tendrán comunidades bacterianas más distinguibles (Bordenstein & Theis, 2015; Brooks et al., 2016). Este término no hace referencia a co-evolución, coespeciación, codiversificación o cocladogénesis (Brooks et al., 2016; de Vienne et al., 2013) es un patrón eco-evolutivo, el cual está afectado por factores bióticos y abióticos, que pueden variar dependiendo del ambiente, estilos de vida o interacciones que cambian los ensamblajes de las comunidades microbianas (Leigh, Bordenstein, Brooks, Mikaelyan, & Bordenstein, 2018).

Existen varios estudios que han probado este concepto. Un estudio determinó que hay diferencias significativas en la comunidad microbiana de dos especies de *Hydra* y esta comunidad se mantuvo específica a través de un largo periodo de tiempo indicando la congruencia entre la filogenia del hospedero y sus simbioses (Fraune & Bosch, 2007). Por otro lado, se han realizado varios estudios en esponjas donde se expone que existe una relación entre la diversidad de la comunidad microbiana y la filogenia de varias especies de esponjas (Easson & Thacker, 2014; Schöttner et al., 2013). Asimismo, (Matcher et al., 2017) determinó que OTUs de *Betaproteobacterias* de diferentes especies de esponjas estaban relacionados y su relación filogenética era congruente con la de sus hospederos, proponiendo que las *Betaproteobacterias* y sus simbioses podrían tener patrones co-evolutivos. El patrón eco-evolutivo se ha encontrado en otros organismos como hormigas (Sanders et al., 2014), avispas (Brucker & Bordenstein, 2012), simios (Brooks et al., 2016; Moeller et al., 2014), mamíferos (Groussin et al., 2017; Kohl, Varner, Wilkening, & Dearing, s. f.), recalcando su incidencia en distintos grupos del árbol de la vida.

### **2.5.1. Métodos para determinar filosisimbiosis y otros patrones eco-evolutivos**

Para establecer el concepto de filosisimbiosis se pueden realizar diferentes análisis de congruencia entre filogenia del hospedero y de la comunidad microbiana para revelar la señal filogenética (Dittmer et al., 2016) y distintos patrones eco-evolutivos, que permitan discernir como el microbioma ha afectado la historia evolutiva del hospedero y viceversa. Existen dos aproximaciones para identificar y cuantificar filosisimbiosis (Figura 5), una de estas es comparar

la filogenia del hospedero con el dendrograma basado en similitudes de la comunidad microbiana (Brucker & Bordenstein, 2012), y determinar si existen congruencias. La segunda estrategia, hace referencia al test de Mantel (Legendre & Legendre, 2012) que mide la correlación entre dos matrices, que en este caso sería la matriz de divergencia filogenética del hospedero y la matriz de similitudes de la comunidad microbiana, que según un estudio que compara ambas aproximaciones afirma que el método de Mantel es más poderosos estadísticamente, ya que al realizar dendrogramas se pierde mucha de la información de las comunidades microbianas (Mazel et al., 2018).



**Figura 5.** Diagrama de flujo para el análisis de filiosimbiosis. Tomado de Lem y Bordenstein, 2019.



En la filosismbiosis, los ensamblajes de las comunidades microbianas en el hospedero son determinísticos (Brooks et al., 2016). Para comprender más la naturaleza de estos ensamblajes y sus patrones eco-evolutivos, es necesario estudiar la estructura filogenética de la comunidad, que permite determinar qué tan relacionados evolutivamente están los miembros de una comunidad, además, de estudiar los procesos evolutivos que determinan el ensamblaje de las comunidades (Cavender- Bares, Kozak, Fine, & Kembel, 2009). Los métodos para estudiar la estructura filogenética y la diversidad de estas comunidades se han utilizado ampliamente en ecología, donde se utiliza la relación filogenética entre taxones como un indicador de similaridad ecológica (Cavender-Bares, Ackerly, Baum, & Bazzaz, 2004). Es posible medir la dispersión y estructura filogenética de una comunidad utilizando el índice de relación neta (NRI, Net Relatednes Index) que cuantifica la estructura general de la muestra desde la raíz a los nodos finales de la filogenia, y el índice de taxón más cercano (NTI, Nearest Taxon Index) a partir del MNTD, capturando únicamente el agrupamiento entre nodos terminales (Pontarp, Canbäck, Tunlid, & Lundberg, 2012; Webb, Ackerly, McPeck, & Donoghue, 2002). Estos se calculan de la siguiente manera:

$$NRI = -1 * \frac{MPDobs - MPDalt}{sd(MPDalt)}$$

$$NTI = -1 * \frac{MNTDobs - MNTDalt}{sd(MNTDalt)}$$

En donde “mpd” es la distancia filogenética media, “mntd” es la distancia media del taxón más cercano, “obs” hace referencia a los valores observados en la muestra, “alt” corresponde a una comunidad aleatoria, mientras que “sd” hace referencia a la desviación estándar. Los valores de estos índices resultan positivos cuando la comunidad tiende a la agrupación, mientras que valores negativos tienden a la dispersión (Pontarp et al., 2012; Velásquez-Puentes & Bacon, 2016; Webb et al., 2002), permitiendo determinar si los ensamblajes de ciertos taxones son determinísticos.

Para entender como el microbioma influye en la filogenia y ecología del hospedero, es necesario entender el microbioma como una comunidad ecológica en la cual conviven muchos individuos, con distintas funciones e interacciones sujetos a diversos factores ambientales y evolutivos. En este orden de ideas, el microbioma puede ser visto como un rasgo del hospedero (Hird, 2017), debido a que patrones en estos rasgos pueden explicar procesos a nivel de hospedero. Se pueden utilizar métodos de ecología clásica, como los métodos filogenéticos comparativos para

entender que procesos evolutivos ha generado un rasgo determinado, que en este caso sería el microbioma y toda su información.

Estos métodos comparativos abarcan la búsqueda de señales filogenéticas a lo largo de la historia evolutiva de un organismo. Esta señal hace referencia a que especies más relacionadas evolutivamente tienen a ensamblarse juntas más que por procesos al azar en las diferentes comunidades (Blomberg & Garland, 2002). Dados los valores de los rasgos y la filogenia, se puede calcular esta señal, utilizando por ejemplo el índice de Blomberg K (Blomberg, Garland, & Ives, 2003), que es ampliamente inferido en la literatura para determinar esta señal. Un ejemplo de su aplicación en organismos marinos y microorganismos, fue evaluando la señal de la diversidad alfa en esponjas (Easson & Thacker, 2014). Este índice de Blomberg está basado en el modelo de evolución Browniana, que dice que la evolución de los rasgos sucede de una manera al azar a lo largo de las ramas del árbol filogenético, donde existe una varianza en la distribución de los valores de estos rasgos que son directamente proporcionales a la distancia de las ramas (Münkemüller et al., 2012). Este modelo puede inferir las diferencias en los nichos por solo un rasgo. Este método permite evaluar si determinados valores de los rasgos presentes en las puntas de la filogenia son proporcionales a su historia evolutiva, por ello se propone como una metodología para evaluar patrones eco-evolutivos entre la diversidad microbiana, la filogenia y morfología del hospedero y factores ambientales

Se hace imperante el estudio de la filosimbiosis, ya que, según los estudios realizados, se podrían construir modelos basados en el microbioma que podrían ayudar a predecir el origen de las especies de hospedero, además, con esta aproximación se señala que la comunidad microbiana sirve como un marcador molecular para elucidar la evolución del hospedero (Brucker & Bordenstein, 2012).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años ha aumentado el esfuerzo investigativo por determinar el microbioma asociado a corales, sin embargo, el conocimiento de la diversidad, las interacciones, dinámicas y funciones de las comunidades asociadas a corales gorgonáceos aún es limitado en nuestro país. Muchos organismos eucariotas dependen de sus simbioses para expandir su nicho ecológico y dependen funcionalmente de su comunidad de endosimbiontes bacterianos. Por ende, es fundamental entender la composición, la estructura, la función y los patrones eco-evolutivos de las comunidades microbianas del holobionte en el estado de salud del coral, ya que existen vacíos de información respecto a la evolución de este sistema (Brooks et al., 2016) y viceversa.

El cierre del istmo de Panamá proporcionó nuevas oportunidades ecológicas para los organismos a cada lado del mismo. Específicamente, las especies del género *Pacifigorgia* simpátricas del POT, desarrollaron múltiples estrategias para optimizar su forma y obtener material suspendido de la columna de agua que es su fuente de alimento. Este género sufrió una radiación adaptativa rápida reciente que generó una explosión de especies estableciéndose 34 en el POT. Estos octocorales (altamente diversos) que viven adheridos al sustrato rocoso soportando fuertes corrientes, deben depender metabólicamente de la comunidad microbiana para procesar la materia orgánica filtrada. Estas comunidades microbianas al metabolizar estos nutrientes podrían ser una fuerza impulsora la cual causó aquella heterogeneidad de morfologías, siendo un factor diferencial en cada especie de *Pacifigorgia* las cuales viven en simpatria. A su vez, estas comunidades podrían estar generando esa partición de nicho y ser una estrategia de los octocorales para alcanzar diferentes demandas energéticas, que le permitieron sobrevivir y adaptarse a diversos nichos en el Pacífico colombiano luego del cierre del istmo, ya que, según varios estudios, los microorganismos influyen en la evolución del hospedero. Identificar patrones eco-evolutivos en entre microbioma-hospedero, permiten entender la biología de la simbiosis, además de entender el microbioma como un rasgo del hospedero, siendo una herramienta importante para entender diferentes procesos en el mismo.

La descripción de los ensamblajes de las comunidades microbianas dentro de cada hospedero coralino, permitiría determinar el efecto de los microorganismos en la historia evolutiva de los corales y aportar información relevante para el género, la cual sería complementada con los

caracteres morfológicos del coral y factores ambientales, para describir esta simbiosis. En el caso del género *Pacifigorgia*, que no cuenta con una coherencia entre sus caracteres morfológicos y sus caracteres genéticos (M. M. Soler-Hurtado et al., 2017), la taxonomía se torna un poco conflictiva a la hora de clasificar estas especies, siendo el microbioma una posible solución que aportaría información en la biología evolutiva de este género.

Por tal motivo, se hace imperante la investigación del microbioma de diferentes especies del género *Pacifigorgia* del océano Pacífico colombiano para determinar si esta es especie-específica mostrando una señal de filosismbiosis, lo cual explicaría un patrón eco-evolutivo entre los abanicos de mar y sus microorganismos. Teniendo claras estas relaciones, sería posible utilizar la estructura y la información de la comunidad microbiana como herramienta para esclarecer la filogenia del género *Pacifigorgia*, la cual es un poco conflictiva, determinando patrones evolutivos en el holobionte y entender el proceso evolutivo de estos corales del océano Pacífico. Al ser organismos dominantes en el océano Pacífico, específicamente en el departamento del Chocó y en la Isla de Malpelo, es importante evaluar por primera vez el microbioma de estas especies del género. Además, se evaluará el efecto de la morfología coralina sobre la comunidad bacteriana para determinar si existe un efecto de esta sobre la estructura y composición de la comunidad bacteriana asociada a los octocorales. Este análisis integrativo permitirá comprender la significancia funcional, ecológica y evolutiva del microbioma en la historia evolutiva y elucidar este sistema biológico de simbiosis. Toda la información que se pretende determinar en este estudio contribuiría al conocimiento del mutualismo dentro del holobionte y de estas especies que coexisten en el mismo ambiente, determinando el grado de asociaciones específicas coral-microbioma y su papel en el estado de salud del coral. La identificación de los componentes estables en el microbioma del coral y su relación con la historia evolutiva del holobionte como su morfología (estrategias de alimentación) brinda información pertinente sobre el papel que el ensamblaje de microorganismos provee al holobionte coralino para aumentar su *fitness* y supervivencia.

Por lo mencionado anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los patrones eco-evolutivos entre la historia evolutiva de los octocorales del género *Pacifigorgia* del Pacífico colombiano y sus comunidades bacterianas asociadas?

## 4. OBJETIVOS

### General

Describir los patrones eco-evolutivos entre la filogenia del hospedero y la estructura de las comunidades bacterianas simbiotes presentes en los octocorales del género *Pacifigorgia* del Pacífico colombiano

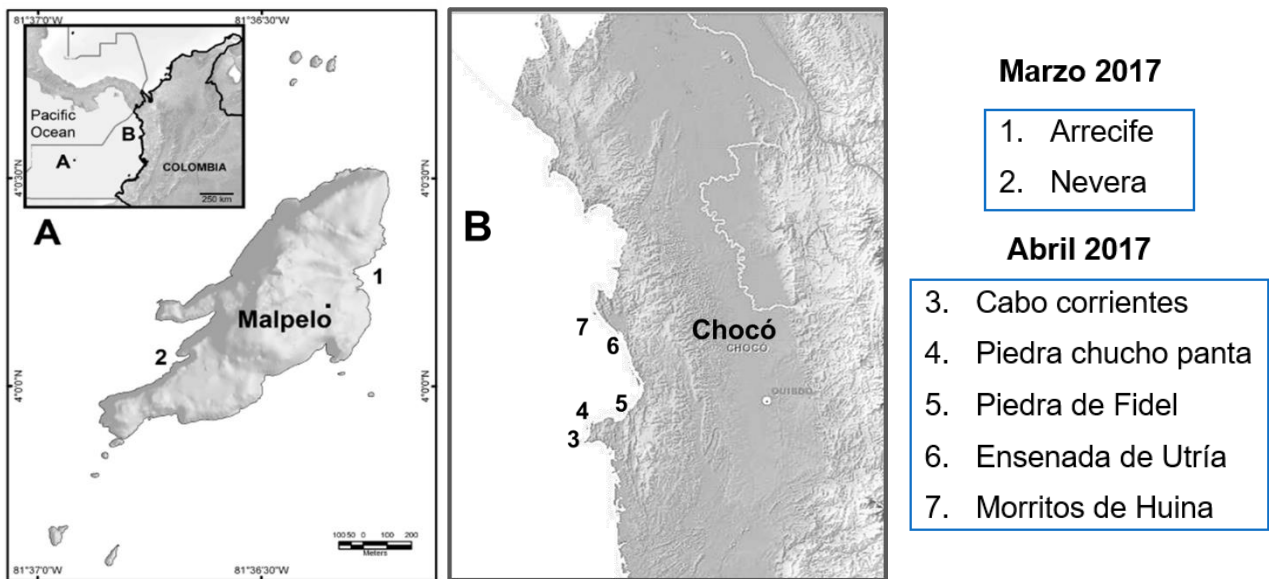
### Específicos

- ❖ Caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana de cada una de las especies de los octocorales del género *Pacifigorgia*
- ❖ Establecer la existencia de filosisimbiosis entre la comunidad bacteriana y el hospedero
- ❖ Evaluar las relaciones entre la morfología de los octocorales y la estructura de la comunidad bacteriana.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Colecta y procesamiento de las muestras

En dos zonas del Pacífico Oriental Tropical (TEP) colombiano se muestrearon octocorales del género *Pacifigorgia* por medio de SCUBA diving entre 4 y 18 m de profundidad. El primer muestreo se realizó en la Isla de Malpelo ( $4^{\circ}0'N$ ,  $81^{\circ}36'20''W$ ). Esta isla está a 500 km de la Costa Pacífica Colombiana, donde se colectaron dos especies para el género: *Pacifigorgia cairnsi* y *Pacifigorgia curta* (Breedy & Guzman, 2002). En este muestreo se tomaron 9 colonias saludables de las dos especies seleccionadas al azar y se muestrearon en dos localidades: Arrecife (1) y Nevera (2). El segundo muestreo se realizó a lo largo de la Costa Pacífica, empezando en Cabo Corrientes ( $5^{\circ} 29' 0.85'' N$ ,  $77^{\circ} 32' 13.52'' W$ ) y terminando en Utría ( $6^{\circ} 0.5' 40'' N$ ,  $77^{\circ} 26' 03.96'' W$ ) para un total de 7 localidades (Figura 6). Se colectaron en total diez especies de *Pacifigorgia* y 6 especies que no se determinaron, para un total de 65 muestras. Cada fragmento colectado tenía dimensiones de aproximadamente 6 x 6 cm, los cuales fueron lavados con agua filtrada, almacenados en tubos de 2 ml con DMSO y guardados en contenedores criogénicos previamente congelados con nitrógeno líquido. Las muestras se depositaron a  $-80^{\circ}C$  en el laboratorio BIOMMAR de la Universidad de los Andes hasta su respectivo procesamiento.



**Figura 6.** Localidades de muestreo. A) Isla de Malpelo, B) Departamento de Chocó, Nuquí, Cabo Corrientes. A) fue tomado y modificado de Sánchez et al., 2011. B) Fue realizado en ArcMap versión 10.3

## **5.2. Extracción de ADN metagenómico, preparación de la librería y secuenciación**

Se realizó la extracción de ADN con el kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (ZYMO, USA). Se tomó un fragmento de aproximadamente 250 mg de la muestra del coral y se lavó con buffer TE (1 M Tris-HCl pH 8,0 y 0,5 M EDTA). Posteriormente, se adicionó nitrógeno líquido y se colocó en un mortero impregnado con nitrógeno líquido, se macero hasta conseguir un polvo. Se siguieron las instrucciones de manufactura del kit. La calidad del ADN extraído se evaluó en un gel de agarosa al 1%, donde las muestras con alto peso molecular se seleccionaron para su cuantificación utilizando el kit del fluorómetro de Qiubit BR (Life Technologies, Carlsbad, USA). Se amplificó la región hipervariable V4 del marcador molecular 16s rRNA, utilizando los primers 515f y 806r (Caporaso et al., 2011), los cuales son específicos para la comunidad bacteriana. Se utilizaron secuencias adaptadoras flowcell, cada una con un barcoding para Illumina según el protocolo the earth microbiome (<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/>). Se utilizó la Taq DNA Takara para las amplificaciones. Los amplicones con barcodes fueron incorporados y secuenciados en la plataforma de Illumina Miseq (Illumina, San Diego, USA), implementando librerías de 2x250 pb paired-end.

## **5.3. Análisis bioinformático de las secuencias**

Los análisis de las secuencias fueron realizados en QIIME 2 versión 2018.4, siguiendo el pipeline del software (<https://qiime2.org>). Se realizó un primer filtro para eliminar todas las secuencias con una calidad inferior a 30. Posteriormente, con los datos ya demultiplexados se implementó el plugin de q2-dada2 para todo el proceso de control de la calidad de las secuencias. Primero, se realizó el proceso de trimming donde se truncaron las lecturas a una longitud de 230 nucleótidos para el forward y 240 para el reverse, luego se removieron las quimeras y se realizó el denoising y dereplication, obteniendo secuencias libres de errores. Para la asignación taxonómica, QIIME2 define secuencias variantes de amplicon (ASV) que poseen mucha más sensibilidad y especificidad que las unidades operacionales transcripcionales (OTUs), ya que los ASV distinguen variantes de secuencias que difieren en tan solo un nucleótido conservando más resolución (Callahan, McMurdie, & Holmes, 2017). Luego del proceso de limpieza con dada2, se realizó la asignación taxonómica implementando el

clasificador entrenado con la base de datos de SILVA 132 específica para los primers 515f y 806r al 99% de similaridad (<https://docs.qiime2.org/2019.4/data-resources/#taxonomy-classifiers-for-use-with-q2-feature-classifier>). Se removieron todas las secuencias mitocondriales y cloroplastos. Asimismo, se realizó una curva de rarefacción con una profundidad de secuenciación de 12000 en QIIME2, y se generó una tabla de ASV para los análisis consecutivos.

#### 5.4. Análisis de la comunidad microbiana

El análisis de la estructura y composición de la comunidad bacteriana se realizó en R versión 3.5.3, utilizando diferentes paquetes estadísticos y graficado con el paquete *ggplot2* (Wickham, 2009). Se normalizaron los datos y se trabajó con la tabla de los datos rarificados con el paquete estadístico *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013). Se calculó el índice de Shannon, Chao1, Piloni y Simpson para estimar la riqueza de cada muestra de la comunidad bacteriana, y se evaluó con una ANOVA diferencias significativas de estos índices entre las diferentes muestras de las especies de *Pacifigorgia*. Para estudiar la diversidad beta, se ejecutaron varios análisis multivariados donde se calculó la distancia Bray-Curtis y la distancia weighted UniFrac, que son métricas que tienen en cuenta la abundancia de cada ASV. El objetivo de este análisis es determinar si existen diferencias en cuanto a la composición de la comunidad bacteriana en las diferentes especies y clados de *Pacifigorgia*, para ello se realizó una PERMANOVA en R con el paquete *vegan* (Dixon, 2003). Para visualizar este análisis y la variación en la composición de la comunidad entre las diferentes muestras se realizó una ordenación escalada multidimensional no métrica (NMDS, 1000 permutaciones) utilizando la distancia Bray-Curtis. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico utilizando las matrices de distancia Bray-Curtis y weighted UniFrac para establecer diferencias significativas entre la composición de bacterias comparadas a nivel de especie y clados de *Pacifigorgia*, implementando el test de similitud ADONIS el cual calcula un valor  $R^2$  que es un porcentaje de variación explicado por una categoría determinada y ANOSIM que calcula diferencias significativas entre las distancias de diferentes grupos y dentro de los grupos.

Se estableció el core bacteriano teniendo en cuenta dos factores: abundancia y prevalencia en las muestras, para esto se determinó que cada ASV debía encontrarse en un 30% de las muestras con una abundancia relativa promedio mayor a 0,0001. Con la información del core microbiano y la filogenia de *Pacifigorgia*, se realizó un mapa de calor para visualizar los patrones



de similitud de la abundancia relativa los ASV del core entre las diferentes especies con el paquete *phytools* (Revell, 2012). Se realizó la filogenia de la comunidad bacteriana completa utilizando FastTreeMP implementado en QIIME2 y se visualizó en la herramienta online iTOL (Letunic & Bork, 2006) para determinar en qué especies de *Pacifigorgia* se encuentra cada ASV bacteriano en la filogenia. Para mirar que ASVs varían de manera significativa respecto a su abundancia relativa entre las diferentes especies, se utilizó el paquete de R *DeSeq2* (Love, Huber, & Anders, 2014) el cual realiza un análisis cuantitativo comparando el conteo de cada ASV en cada muestra, para el mismo fin se utilizó el paquete *edgeR* (M. D. Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010) que permiten comparar la abundancia diferencial. Para visualizar la abundancia de taxones dentro de cada especie coralina nivel de phylum y orden, se utilizó la herramienta online Microbiome Analyst (Dhariwal et al., 2017) para visualizar la composición de los diferentes taxones en diagramas de barras.

Para predecir la posible composición funcional de la comunidad bacteriana, se utilizó el programa PICRUSt (Langille et al., 2013), el cual utiliza un algoritmo para inferir funciones a partir del marcador molecular del gen 16s rRNA. Este método consiste en buscar el ancestro común más cercano que cuente con información de su metagenoma a partir de la secuencia problema y a partir de esta información establece funciones. Para realizar este análisis se utilizó QIIME2 para realizar una agrupación de las secuencias con referencia cerrada con el script `qiime vsearch cluster-features-closed-reference`, implementando como base de referencia la base de datos de Greengenes versión 13\_5 (<https://docs.qiime2.org/2019.4/data-resources/#marker-gene-reference-databases>). Con estos datos, se realizó la predicción en PICRUSt con el script de predicción metagenómica de KEGG y predicción de rutas metabólicas. Para visualizar los resultados se utilizó STAMP (Parks, Tyson, Hugenholtz, & Beiko, 2014), donde se realizó una prueba de Kruskal- Wallis para evaluar diferencias significativas de las diferentes funciones predichas, se efectuó una corrección de Bonferroni para el p valor.

### **5.5. Análisis de filosisimbiosis: Comparación de la filogenia del hospedero y los dendrogramas bacterianos**

Se utilizaron dos estrategias para evaluar filosisimbiosis. La primera está basada en un análisis de congruencia entre el dendrograma bacteriano y la filogenia de *Pacifigorgia*. Para esto, el dendrograma bacteriano se realizaron con el paquete *vegan* en R (implementando la función

'hclust'), utilizando la distancia de Bray-Curtis y la distancia weighted UniFrac, debido a que son métricas que consideran la abundancia de cada ASV en las muestras, además de ser métricas con buen poder estadístico para determinar procesos eco-evolutivos como filosimbiosis (Mazel et al., 2018). Por otro lado, la filogenia de los octocorales del género *Pacifigorgia* se tomó de la tesis de Colmenares 2017 (ver Figura 2). Para evaluar la congruencia de la topología entre la filogenia del hospedero y los dendrogramas bacterianos se utilizó el programa TreeCmp (Bogdanowicz, Giaro, & Wróbel, 2012) calculando el puntaje normalizado de agrupamiento de Robinson- Foulds (D. F. Robinson & Foulds, 1981) para facilitar la comparación. Este resultado vario de 0 a 1, donde 0 es congruencia total y 1 es incongruencia. La segunda estrategia es por medio de un test de Mantel, el cual se desarrolló con el paquete *vegan* (Dixon, 2003) utilizando el árbol filogenético de *Pacifigorgia*. A partir de este, se determinaron las distancias cofenéticas con el paquete *ape* y se comparó tanto con la matriz Bray-Curtis como con la matriz de la distancia weighted UniFrac para evaluar si existe una correlación o no de ambas matrices. Este valor de R oscila entre 0 y 1, donde 0 es correlación nula, 1 es correlación positiva y -1 es correlación negativa.

## **5.6. Patrones eco-evolutivos de la comunidad microbiana y corales de *Pacifigorgia***

Para identificar la estructura, la diversidad filogenética de la comunidad microbiana y determinar si los ensamblajes de la comunidad bacteriana en cada especie de coral son un proceso estocástico o determinístico, se calculó el índice del taxón más cercano (NTI) y el índice de relación neta (NRI), los cuales miden el grado de agrupamiento filogenético de cada taxón a través del árbol filogenético de la comunidad en un conjunto de taxones (Stegen, Lin, Konopka, & Fredrickson, 2012; Webb et al., 2002). Valores positivos de ambos índices indican agrupamiento de la comunidad mientras que valores negativos indican que los taxones en la comunidad se encuentran dispersos en el árbol filogenético. Específicamente, el índice NRI calcula la distancia media filogenética de un taxón en una muestra con respecto a todos los otros que están en todas las muestras, siendo una medida de agrupamiento en general, mientras que NTI cuantifica la distancia media filogenética de un taxón al taxón más cercano en una muestra, y es una medida más sensible en las puntas del árbol indicando agrupamiento terminal. Para esto, se calcularon arboles filogenéticos en QIIME 2 con FastTreeMP de cada uno de los grupos taxonómicos más representativos de la comunidad microbiana por su abundancia o/y su presencia en el core bacteriano, estos fueron dos géneros *Endozoicomonas* y *Mycoplasma*, asimismo, se evaluaron estos índices en diferentes phylum bacterianos

seleccionando Tenericutes, Acidomicrobia, Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria y Proteobacteria. Este último fue el más abundante y por este motivo, se evaluó a nivel de clase teniendo en cuenta Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Deltaproteobacteria para el análisis. Posteriormente, se realizó una matriz de abundancia de ASVs para cada grupo taxonómico y se utilizaron estos dos insumos dentro del paquete *picante* en R con las funciones 'ses.mpd' y 'ses.mntd', los cuales fueron graficados en R.

Como el microbioma puede ser visto como un rasgo del hospedero (Hird, 2019), se realizó una matriz con las muestras de *Pacifigorgia* y sus respectivos rasgos de la comunidad microbiana. Estos rasgos fueron clasificados en tres categorías, rasgos de la riqueza de la comunidad (Índice de Shannon, Simpson, Chao1 y Pilon), rasgos de la abundancia relativa de los principales ASV pertenecientes al core bacteriano (Identidad) y rasgos funcionales de la comunidad bacteriana (predicción metabólica de PICRUSt, únicamente se eligieron funciones significativamente diferentes entre las especies de *Pacifigorgia* para este análisis). Para la segunda categoría se eligieron únicamente los ASV presentes dentro del core bacteriano con su respectiva abundancia por muestra de coral. Posteriormente, para determinar si la comunidad microbiana muestra una señal filogenética a través de la filogenia de *Pacifigorgia* y si existen patrones eco-evolutivos entre la comunidad bacteriana y la historia evolutiva de *Pacifigorgia*, se tomaron los rasgos de las tres categorías mencionadas y se calculó la señal filogenética de Blomberg K (Blomberg et al., 2003) en el paquete estadístico *picante*. Esta señal sirve para cuantificar si taxones relacionados filogenéticamente tienden a ensamblarse unos con otros de acuerdo con sus rasgos. Esta señal K, está basada en el modelo de evolución de rasgos Brownian motion, el cual espera que la covarianza de rasgos continuos de los taxones en las puntas del árbol filogenético, sea proporcional a su historia evolutiva. Bajo un modelo de evolución Browniana  $K=1$ , por ende los valores a este tenderán a tener una fuerte señal filogenética de ese rasgo en la filogenia. La señal filogenética fue graficada en R para ciertos rasgos con valores significativos de K en el paquete *picante* con la función 'Kcal' y 'multiPhylosignal'.

### **5.7. Correlación entre caracteres morfológicos de *Pacifigorgia* y su microbioma**

Para evaluar si existe correlación entre ciertos caracteres morfológicos de *Pacifigorgia* y su microbioma, se cuantificaron diferentes rasgos de las colonias. Primero, para cada muestra se determinó el número de pólipos, el número huecos y el área de la malla por  $\text{cm}^2$ , utilizando un

estereoscopio y tomando fotografías para su posterior análisis. Posteriormente se tomó como insumo los datos del índice área superficie volumen (SV) de cada una de las especies de *Pacifigorgia* de la tesis de Stephanie Colmenares, 2017. Este valor fue determinado escaneando los fragmentos con un escáner 3D de alta resolución. Asimismo, se buscaron en la literatura más caracteres morfológicos y se incluyeron dos variables continuas, el número de mallas por cm<sup>2</sup> y el grosor de la malla provenientes del artículo de Vargas, Breedy, & Guzman, 2010. Por otro lado, se incluyeron siete variables categóricas como color de la malla, forma de la malla, tipo de red, presencia de nervadura, forma del spindle y forma dominante de esclerito, provenientes de Soler-Hurtado, Machordom, Muñoz, & López-González, 2016. Otros factores ambientales como localidad y profundidad fueron incluidos en el análisis, como también la identidad del hospedero coralino.

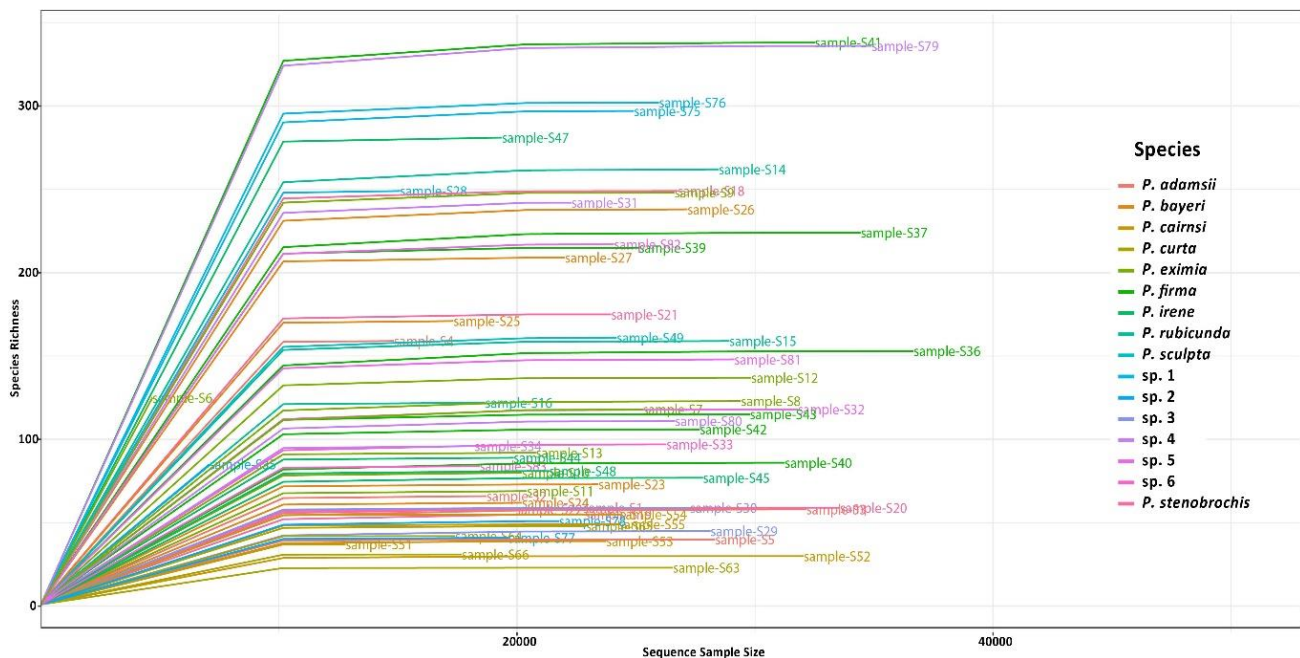
Se evaluó la influencia relativa de cada variable en la composición del microbioma asociado a cada uno de los clados de *Pacifigorgia*. Este análisis se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Pollock et al., 2018. Brevemente, se realizó una tabla de frecuencia de ASV por cada clado (1-7) de *Pacifigorgia*, con estas matrices se calculó la distancia de Bray-Curtis, luego para cada factor morfológico o ambiental se filtraron las muestras con datos eliminando los NA. Seguido de esto, se realizó una prueba ADONIS en *vegan* para cada factor con 999 permutaciones y se determinó el R<sup>2</sup> para cada factor en cada clado, este valor fue normalizando con el Z-score para comparar entre clados. Luego los resultados fueron graficados en un mapa de calor en el paquete *heatmap* y se presentaron los resultados en una gráfica con la filogenia colapsada por clados, construida en iTOL.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana asociada a diferentes especies del género *Pacifigorgia*

Se obtuvieron un total de 2'984.606 lecturas del gen 16s rRNA de la región hipervariable V3-V4, con un promedio de 45578 lecturas por muestra de *Pacifigorgia*. Luego de los filtros de calidad dentro de QIIME2, se obtuvieron un total de 1'682.253 de secuencias de longitud promedio de 250 pb, para un total de 5138 ASV encontrados (99% de similaridad).

Según la curva de rarefacción de la Figura 7, se observa que las muestras presentan diferentes patrones de diversidad, debido a que el número de ASV (Riqueza de especies) por cada muestra es diferente. Asimismo, se observa que las curvas llegan a su saturación a partir de 20000 secuencias por muestra, lo que indica que el muestreo o la secuenciación fue suficiente para estimar la diversidad de la comunidad microbiana.



**Figura 7.** Curva de rarefacción basada en el número de ASV encontrados en cada una de las muestras a diferentes profundidades de secuenciación.

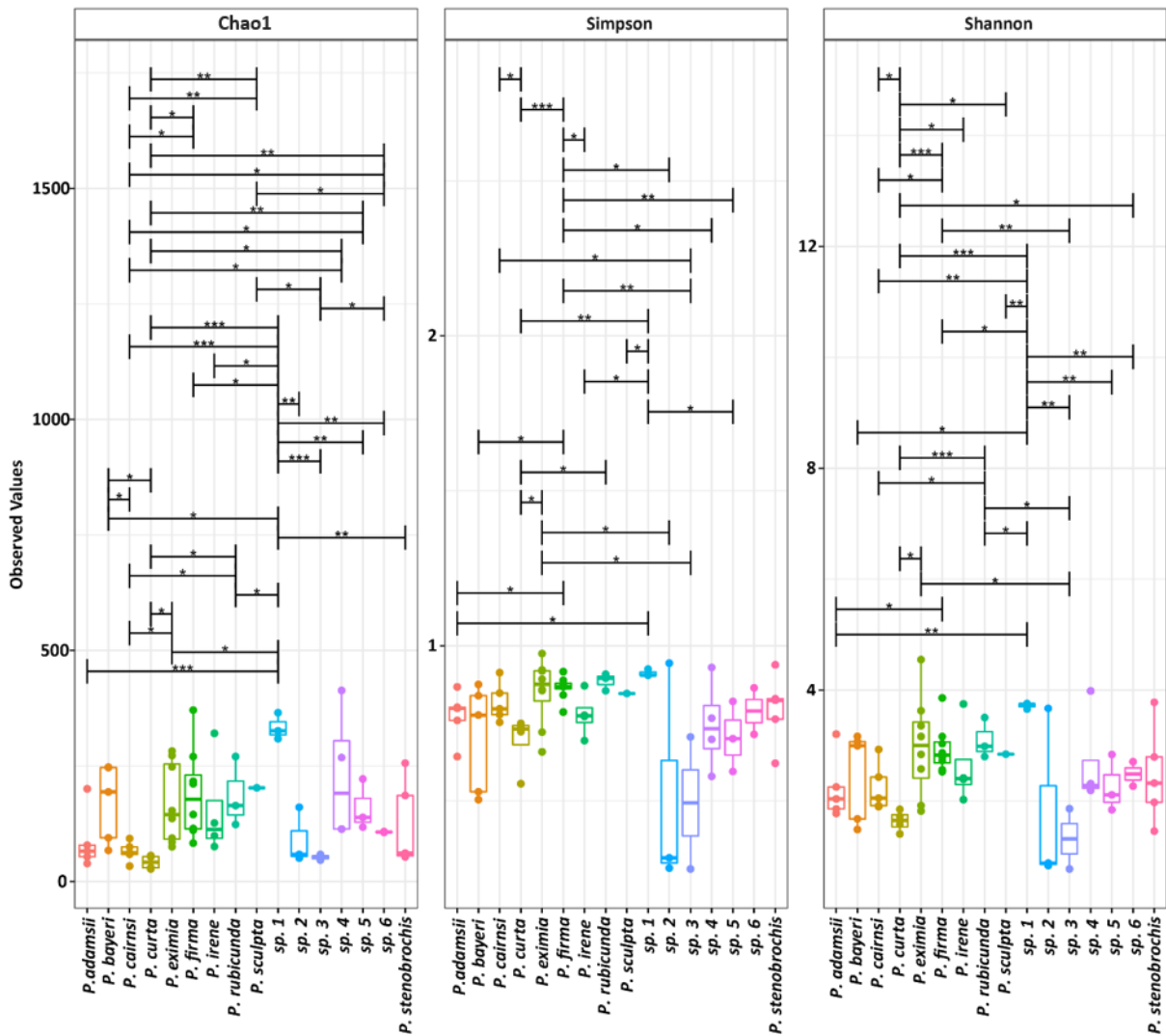
Respecto a la diversidad y riqueza dentro de cada una de las muestras, se graficaron los índices de Chao1, Shannon y Simpson, mostrados en la Figura 8. La variación de la riqueza y diversidad fue diferente significativamente ( $p < 0,001$ ) entre las 16 especies de coral de *Pacifigorgia*, donde el coral con mayor riqueza según el índice de Chao1 fue la sp. 4 (475) seguido de *P. firma* (418) y de la sp. 1 (395), por otro lado, los corales con menores valores de riqueza fueron los corales localizado en la Isla de Malpelo, *P. curta* (Chao1= 29) y *P. cairnsi* (Chao1= 37). Según el índice de diversidad de Shannon, las comunidades bacterianas asociadas a *P. eximia* (4.72), *P. firma* (3.85) y *P. irene* (3.74) presentan alta diversidad de ASVs debido a que sus índices son mayores que 3, índices menores de 2 señalan muestras con baja diversidad como en el caso de la sp. 3 (0.77) y sp.2 (0.83). Este índice es equiparable con el índice de dominancia de Simpson, el cual tiene en cuenta la abundancia de cada ASV en las muestras.

Luego de la clasificación taxonómica de ASVs, el 99.4 % fueron clasificados dentro del dominio bacteria y solamente un 0.54% al dominio Archaea (ANEXO B), además el 0.6% de las secuencias no pudieron ser clasificadas en ninguno de los dos dominios. El estudio se enfocó en el Dominio Bacteria, donde se encontró que el 5.5% de los ASV encontrados fueron clasificados solamente hasta nivel de dominio. Se hallaron un total de 17 phylums, 45 clases, 150 órdenes y 251 familias.

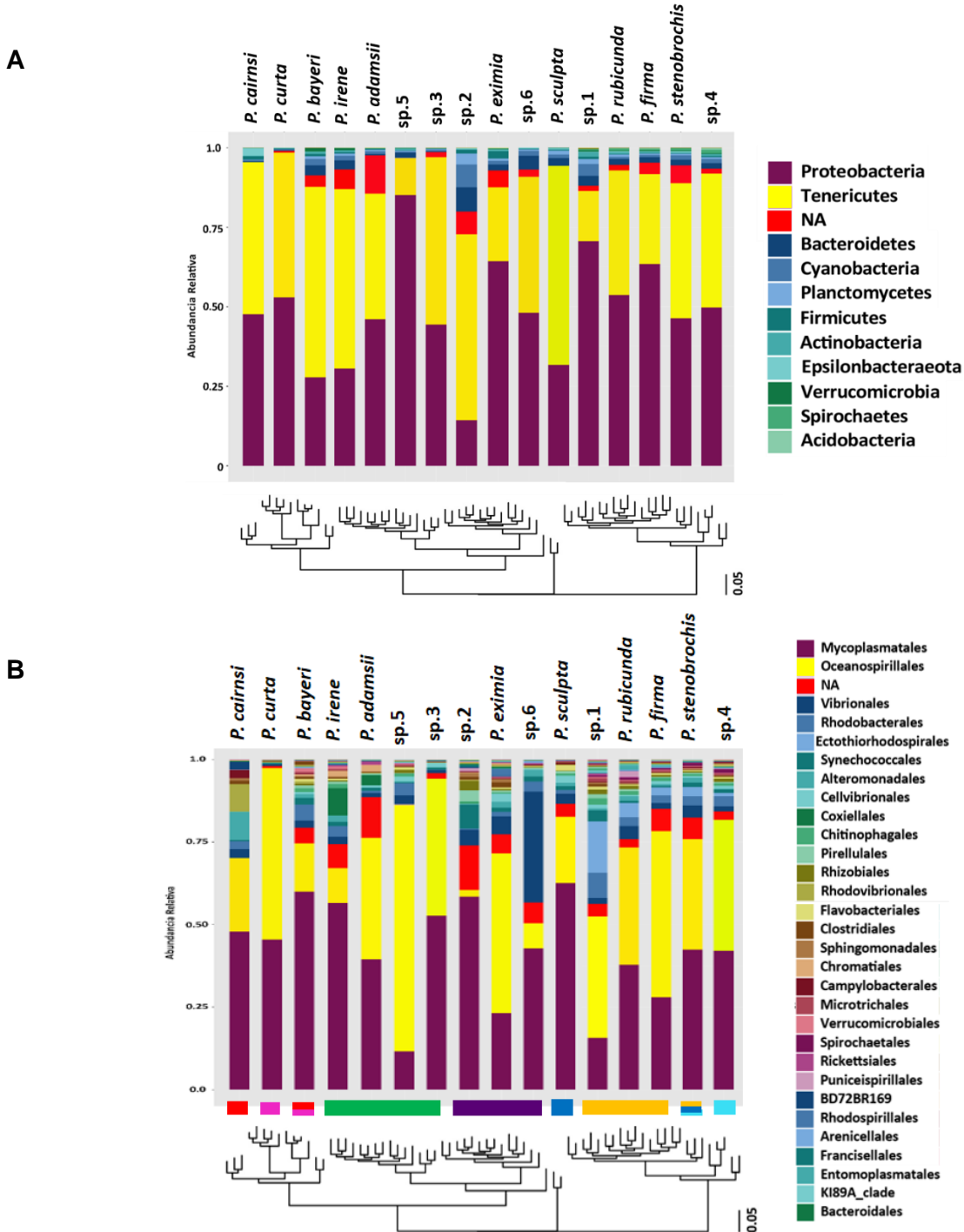
Según la Figura 9a, el phylum más abundante de la comunidad fue Proteobacteria con un total de 1334 ASVs con una abundancia relativa oscilando entre 13 a 83% dentro de cada muestra, asimismo, este phylum fue el más dominante en *P. adamsii*, *P. eximia*, *P. firma*, *P. rubicunda*, sp.1, sp. 4, sp.5 y sp.6. El segundo phylum más predominante fue Tenericutes (42 ASVs), oscilando entre 62% y 11% en cada muestra siendo el phylum más abundante para las especies de isla de Malpelo, *P. cairnsi* y *P. curta*, junto a *P. bayeri*, *P. irene*, *P. sculpta*, sp.3 y sp.2. Después de estos dos phylums, Bacteroidetes (901 ASVs), Cyanobacteria (116 ASVs), Planctomycetes (207 ASVs), Firmicutes (272 ASVs), Actinobacteria (107 ASVs), Epsilonbacteraeota (24 ASVs), Verrucomicrobia (71 ASVs), Spirochaetes (63 ASVs) y Acidobacteria (62 ASVs) fueron, en este orden, los phylums más abundantes de la comunidad microbiana.

Para identificar aquellos grupos taxonómicos diferentes entre las especies de *Pacifigorgia*, se evaluaron los datos a un nivel taxonómico más profundo (orden, Figura 9b) y se observó que el orden Vibrionales tiene un porcentaje alto del 42,8% en la sp.6, patrón que no se observa en

ninguna otra especie. Asimismo, sucede con el orden Coxiellales, el cual tiene una abundancia estadísticamente diferente ( $p=0,03$ ), ya que presenta una abundancia del 3% en *P. adamsii* y del 8% en *P. irene*, siendo inferior a 1% en las demás especies. Por otro lado, la especie *P. cairnsi* presenta una particularidad con la abundancia del orden Rhodovibrionales (8.2%) y Alteromonadales (8.5%), ya que es mayor respecto a la abundancia de estos 2 ordenes en las demás especies de *Pacifigorgia*.



**Figura 8.** Medidas de diversidad alfa del estimador Chao1, el índice de Simpson y el índice de Shannon de las 16 especies de *Pacifigorgia*. Se muestran las diferencias significativas entre los pares de especies de coral calculadas con una ANOVA. Los \* representan una diferencia significativa con un  $p = 0.01$ , \*\* $p = 0.001$  y \*\*\* $p \leq 0.001$



**Figura 9.** Abundancia relativa de cada taxón en las 16 especies de *Pacifigorgia* a nivel de A) Phylum y a nivel de B) Orden. En la parte de debajo de cada imagen se observa la filogenia de *Pacifigorgia* y en colores sus diferentes clados.



El orden Ectothiorhodospirales, mostró una abundancia relativa alta en la sp1 con un 15 %, seguido de *P. rubicunda* con 4%, las demás especies presentaron una abundancia menor de 2%. Cabe resaltar que para todas las especies dominaron dos órdenes Mycoplasmatales y Oceanospirales sumando del 50 al 86% de la abundancia relativa para cada especie excepto para *P. curta*, la cual está casi exclusivamente compuesta por estos órdenes con un porcentaje del 97% de su abundancia relativa.

Para indagar en un nivel taxonómico más profundo los datos, se realizó el análisis de expresión diferencial DeSeq2 y Edge R, para determinar cuáles ASVs son diferentes estadísticamente en cuanto su abundancia relativa, y se determinó un conjunto de ASV con tasas de descubrimiento falso (FDT) menores a 0.005 y con un  $p < 0.001$ , observados en la figura 10. Se determinaron varios patrones respecto a la filogenia y los clados del hospedero. Por ejemplo, el ASV 2080 (*Mycoplasma* sp) está presente con una abundancia alta en los clados 7, 3 y 6 que son evolutivamente cercanos, además, se observa que el ASV 1579 (*Endozoicomonas* sp.) está presente con una abundancia superior al 10% en *P. curta*, patrón que no se cumple para los demás clados donde la abundancia de este no supera el 2,4 %. Asimismo, existen ASVs exclusivos para los clados 2 y 4 como el ASV 3977 (*Mycoplasma* sp) con una abundancia relativa alta oscilando entre 0,14 y 29, 3%, el ASV 692 (*Marinobacter* sp) oscilando entre 0 y 13%, el ASV 2262 (*Mycoplasma* sp.) variando entre 0.5 y 3% y el ASV 79 (*Endozoicomonas* sp) variando entre 0.1 y 13.2%. El ASV 2326 (*Marinobacter* sp.) se encuentra solamente en el clado 3, al igual que el ASV 1756 (*Coxiella* sp.) exclusivo para las especies *P. irene* y *P. adamsii*. El ASV 2885 (*Thiohalophilus*), por su parte, se encuentra únicamente en los clados 2,4, 6 y 7, recalando que presenta una mayor abundancia en el clado 2 y 4 (entre 0.1 y 17,6%).

Para determinar la similitud entre las comunidades bacterianas de las 70 muestras de *Pacifigorgia*, se calculó la distancia Bray-Curtis y la distancia Weighted UniFrac. La distancia Bray-Curtis fue utilizada para graficar un NMDS (Figura 11) y se estableció que únicamente para las especies costeras (*P. curta* y *P. cairnsi*) se diferenciaron agrupamientos de las muestras por especie, con diferencias significativas en la composición de la comunidad (PERMANOVA  $R^2=0.468$ ,  $p < 0.001$ ). Para las demás especies no se distinguen agrupamientos definidos.



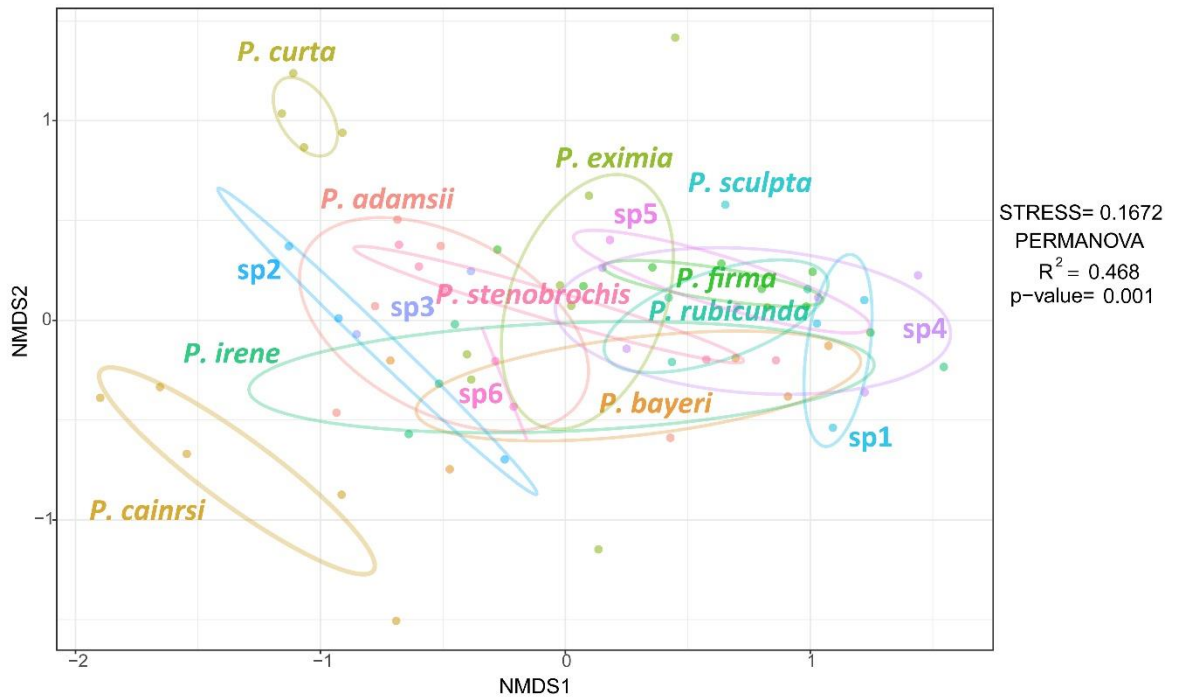
**Figura 10.** Filogenia de *Pacifigorgia* con la abundancia relativa de los ASVs diferencialmente expresados según Deseq2 y edgeR de cada una de las muestras del estudio. La barra de colores sobre la filogenia indica el número del clado de *Pacifigorgia* al cual pertenece cada muestra. ASV 1579 *Endozoicomonas* sp., ASV 1756 *Coxiella* sp., ASV 2080 *Mycoplasma* sp., ASV 2326 *Marinobacter* sp., ASV 2885 *Thiohalophilus* sp., ASV 3977 *Mycoplasma* sp., ASV 79 *Endozoicomonas* sp., ASV2262 *Mycoplasma* sp., ASV 2136 *Spirochaeta* sp., ASV 692 *Marinobacter* sp, ASV 709 *Endozoicomonas* sp.

Respecto a los resultados de la prueba no paramétrica ANOSIM, se obtuvo en la Tabla 1 un valor positivo de R para el factor de Especie (0.502,  $p < 0.001$ ), el cual sugiere que existen más similitudes dentro de la composición de las muestras pertenecientes a una especie utilizando la distancia Bray-Curtis. Por otro lado, con la distancia Weighted UniFrac no existen diferencias dentro de los grupos, debido a que los valores resultantes se aproximan a cero (0.22 a 0.34). Para la prueba de ADONIS se obtuvo un patrón similar, ya que con la distancia Bray-Curtis existen diferencias significativas en la composición entre las especies ( $R = 0.4693$ ,  $p = 0.001$ ), sin embargo, para la distancia Weigthed Unifrac el valor de R se aproxima a cero, indicando que con esta distancia no hay diferenciación de las especies ni los clados. La diferenciación de grupos es más clara para especies que para clados de *Pacifigorgia*.

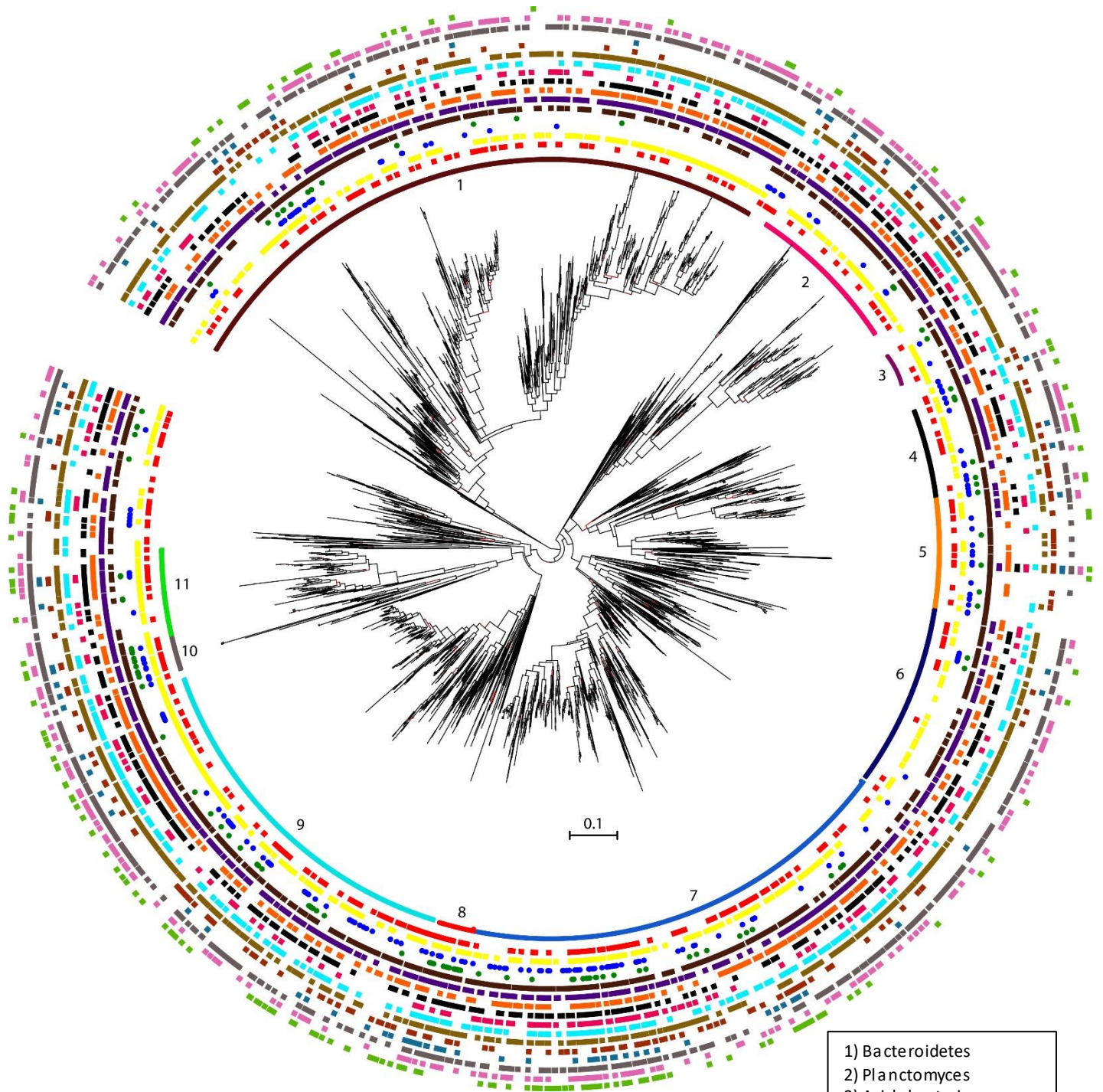
En cuanto a la filogenia de la comunidad bacteriana de *Pacifigorgia* (Figura 12), se encontraron valores altos de soporte para la mayoría de clados formados (color negro = valores sobre el 60% de bootstrap). Muchas de las bacterias se encuentran presentes en todos los corales como es el caso de las pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, especialmente, dentro del género *Endozoicomonas*. Inversamente, se observa que muchas bacterias pertenecientes al clado de Bacteroidetes, por ejemplo, provienen de las especies costeras de Nuquí (*P. adamsii*, *P. bayeri*, *P. eximia*, *P. firma*, *P. Irene*, *P. rubicunda*, *P. sculpta* y *P. stenobrochis*) y se encuentran muy poco en especies oceánicas (*P. cairnsi*, *P. curta*). Examinando por patrones de presencia ausencia de cada especie coralina por cada ASV bacteriano, se identificó que dentro de la clase Deltaproteobacteria no hubo muchos representantes de las especies *P. adamsii*, sp.2, sp.3 y las especies de Malpelo. Dentro del phylum Actinobacteria, no hay muchos representantes de *P. firma*, *P. rubicunda*, *P. scupta* y *P. stenobrochis*. Por otro lado, la sp.2 y sp. 3 no presentan representantes del phylum Acidobacteria.

**Tabla1.** Resultados de las pruebas no paramétricas multivariadas ANOSIM y ADONIS utilizando dos métricas de diversidad beta, Bray-Curtis y Weighted UniFrac, para evaluar la similitud entre las especies y entre los clados de *Pacifigorgia*. Se muestran los valores del estadístico R y R<sup>2</sup> para mirar las diferencias entre las especies y los clados.

Distancia	Grupo	ANOSIM		ADONIS	
		R	p	R2	p
Bray-Curtis	Especies	0.5029	0.001	0.4693	0.001
Bray-Curtis	Clados	0.3457	0.001	0.2571	0.001
Weighted UniFrac	Especies	0.3188	0.001	0.3571	0.008
Weighted UniFrac	Clados	0.222	0.001	0.1787	0.008



**Figura 11.** Gráfica NMDS que muestra la relación dada la composición de las comunidades bacterianas en las 16 especies de *Pacifigorgia*. La composición de las muestras fue comparada utilizando la métrica de similitudes de Bray-Curtis con las abundancias normalizadas con la transformación de raíz cuadrada. Se muestran los resultados de la PERMANOVA realizada para este análisis.



- |                     |                       |                          |         |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|---------|
| ● <i>P. curta</i>   | ■ <i>P. rubicunda</i> | ■ sp. 2                  | ■ sp. 6 |
| ● <i>P. cairnsi</i> | ■ <i>P. irene</i>     | ■ sp. 1                  | ■ sp. 5 |
| ■ <i>P. bayeri</i>  | ■ <i>P. firma</i>     | ■ <i>P. stenobrochis</i> | ■ sp. 4 |
| ■ <i>P. adamsii</i> | ■ <i>P. eximia</i>    | ■ <i>P. sculpta</i>      | ■ sp. 3 |

- |                          |
|--------------------------|
| 1) Bacteroidetes         |
| 2) Planctomyces          |
| 3) Acidobacteria         |
| 4) Firmicutes            |
| 5) Actinobacteria        |
| 6) Deltaproteobacteria   |
| 7) Gammaproteobacteria   |
| 8) <i>Endozoicomonas</i> |
| 9) Alphaproteobacteria   |
| 10) <i>Mycoplasma</i>    |
| 11) Cyanobacteria        |

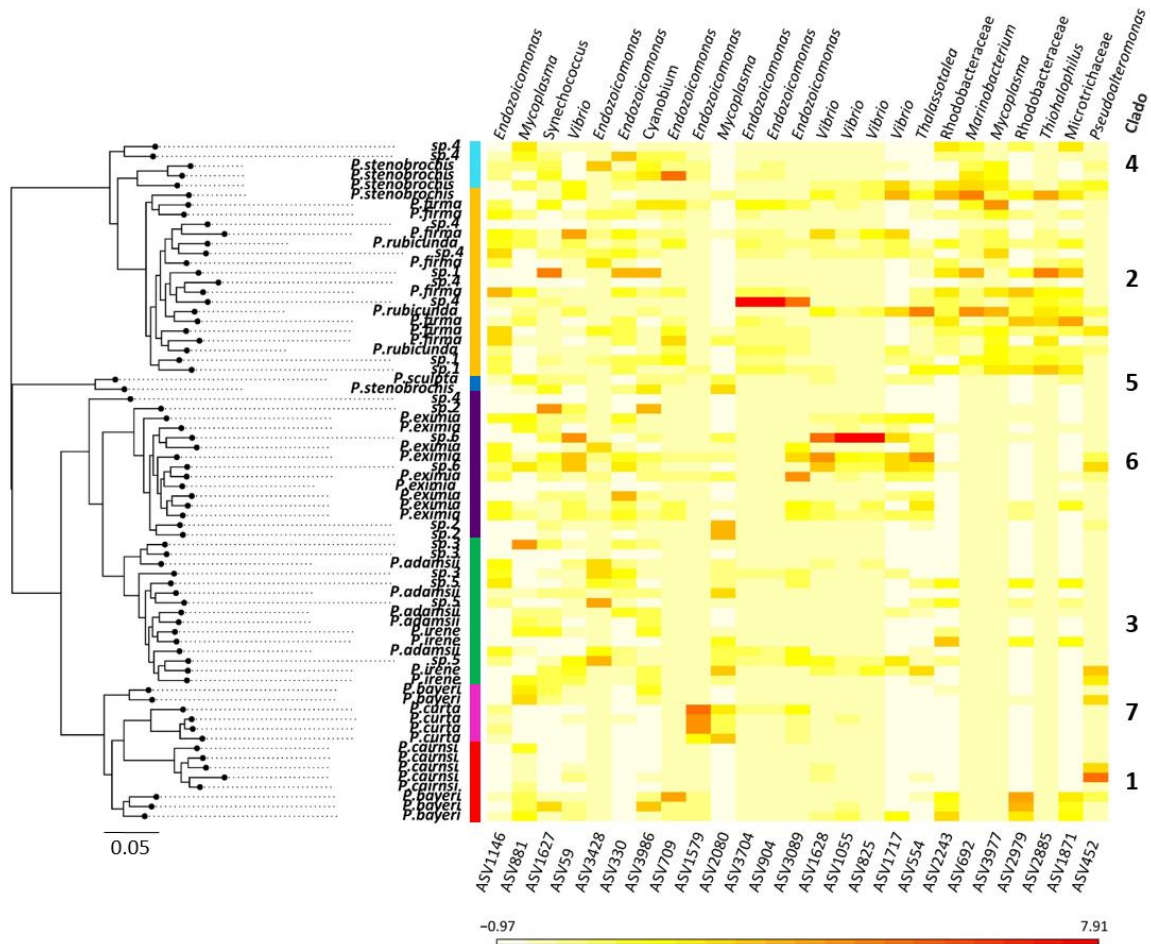
**Figura 12.** Árbol filogenético de la comunidad bacteriana generado con el análisis de FastTreeMP realizando el alineamiento en MAFFT de las secuencias del 16s rRNA proveniente de 16 especies de *Pacifigorgia*. Se observan los valores de soporte de bootstrap en color rojo para aquellos más bajos que 60 y los mayores a 60 en color negro. Alrededor del árbol, se observan demarcados los principales clados de la filogenia representados con colores y números. Las figuras sobre cada ASV representan la especie en la cual fue encontrado, en cuadrado están las especies costeras y en círculos se encuentran las especies oceánicas.

Los ASVs presentes en un 30% de las muestras, con una abundancia promedio mayor a 0,0001 conformaron el core bacteriano (Figura 13). Bacterias de los géneros *Endozoicomonas*, *Mycoplasma*, *Marinobacterium*, *Thiohalophilus*, *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Thalassotalea* y *Vibrio* hacen parte del core, igualmente la familia Rhodobacteraceae y Microtrichaceae. Respecto a la abundancia relativa de este core, se determinó un agrupamiento de ASV con una abundancia alta en el clado 2 del ASV 2243, ASV 692, ASV 3977, ASV 2979, ASV 2885 y ASV 1871, taxones que encuentran en baja abundancia en los demás clados. Asimismo, en el clado 6 se observa que los ASVs pertenecientes al género *Vibrio* (ASV 1628, ASV1055, ASV825 y ASV 1717) también presentan una abundancia alta respecto a los otros clados. Por su parte, el clado 7 presenta una abundancia alta en dos géneros *Mycoplasma* (ASV 2080) y *Endozoicomonas* (ASV 1579), patrón que tampoco es evidenciado en la filogenia de *Pacifigorgia*. Otro patrón interesante es la presencia del género *Endozoicomonas* (ASV 3704, ASV 904, ASV 3089) en el clado 2, especialmente en *P. firma*.

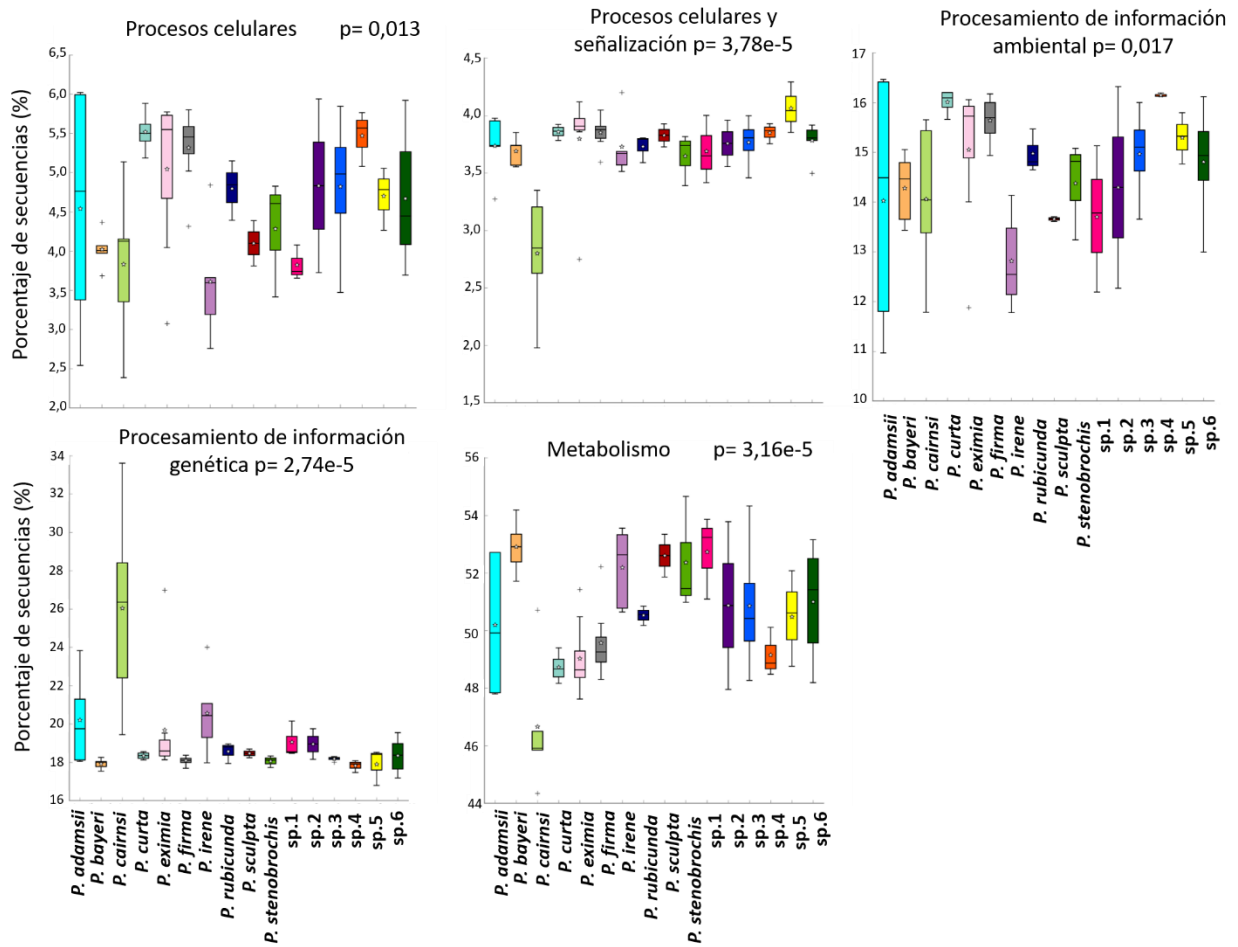
Al realizar el análisis de la inferencia del perfil metabólico de la comunidad microbiana a partir del 16s rRNA por medio de PICRUSt, se estableció que ciertas funciones están expresadas diferencialmente entre las diferentes especies de *Pacifigorgia*. En la figura 14 se observa que existen diferencias significativas en cuanto a las funciones asignadas a procesos celulares ( $p = 0.013$ ), al metabolismo ( $p < 0.001$ ), procesos asociados a señalización, procesamiento de información ambiental y procesamiento de información genética. Interesantemente, se encontró que *P. cairnsi* tiene una abundancia relativa promedio (26,5%) mucho más alta para el procesamiento de información genética, inversamente, presenta el menor número de secuencias asociadas a procesos celulares y de señalización con un 2,7%, al igual que con las funciones de metabolismo (46%). Respecto a aquellas funciones relacionadas con procesamiento de información ambiental, se determinó que *P. curta*, *P. eximia* y *P. firma* presentan la mayor cantidad de secuencias asociadas a estos procesos. Se indagó en STAMP



a un nivel más profundo cada una de las categorías presentadas para evaluar funciones que específicamente variaron significativamente entre las especies y se estableció una lista de funciones (ANEXO C) relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nitrógeno y azufre, quimiotaxis, motilidad, secreción, canales iónicos, funciones relacionadas con fotosíntesis como producción de proteínas asociadas a las antenas de clorofila y producción de clorofila.



**Figura 13.** Mapa de calor de la abundancia relativa de los ASVs pertenecientes al core bacteriano de la comunidad de *Pacifigorgia* a lo largo de su filogenia. En colores al lado de la filogenia se indica el número de clado. La abundancia fue normalizada para todos los ASVs.



**Figura 14.** Abundancia relativa de las secuencias de cinco diferentes funciones metabólicas asignadas en PICRUSt para las 16 especies de *Pacifigorgia*. Se indica el p valor determinado por medio una prueba de Kruskal Wallis y se realizó la corrección de Bonferroni para el p valor para facilitar la comparación entre especies. Las gráficas se realizaron en el software STAMP.

Específicamente, buscando patrones diferenciales entre las especies, se identificó que en las funciones relacionadas al metabolismo del nitrógeno todas las especies presentaron de 0,8 a 0,9 % de secuencias, excepto *P. cairnsi* y *P. irene* con abundancia de secuencias por debajo de 0.8 %. En cuanto al metabolismo de carbohidratos *P. bayeri*, *P. irene* y sp.6 presentaron las más altas abundancias oscilando entre 9 y 9,5%, ya que en las demás especies el porcentaje fue menor. Asimismo, para el metabolismo de toxinas y funciones relacionadas con la adaptación ambiental *P. cairnsi* presentó una elevada abundancia (toxinas= 0,1%, adaptación ambiental= 0,19%) respecto las demás especies (menores a 0,09%). Se evidenció que *P. curta*, *P. eximia* y *P. firma* presentaron mayor abundancia relativa de secuencias respecto a las demás especies para la función quimiotaxis (*P. curta*=1.5%, *P. eximia*=1.35% y *P. firma*=1.30%) y



función sistemas de secreción bacteriano (*P. curta*=1.24%, *P. eximia*=1.22% y *P. firma*=1.23%). Finalmente, se determinó que, para las funciones relacionadas con fotosíntesis, la sp.2 y la sp.3 presentaron los valores más altos oscilando entre 0,9 y 1,5%, siendo inferiores los de otras especies.

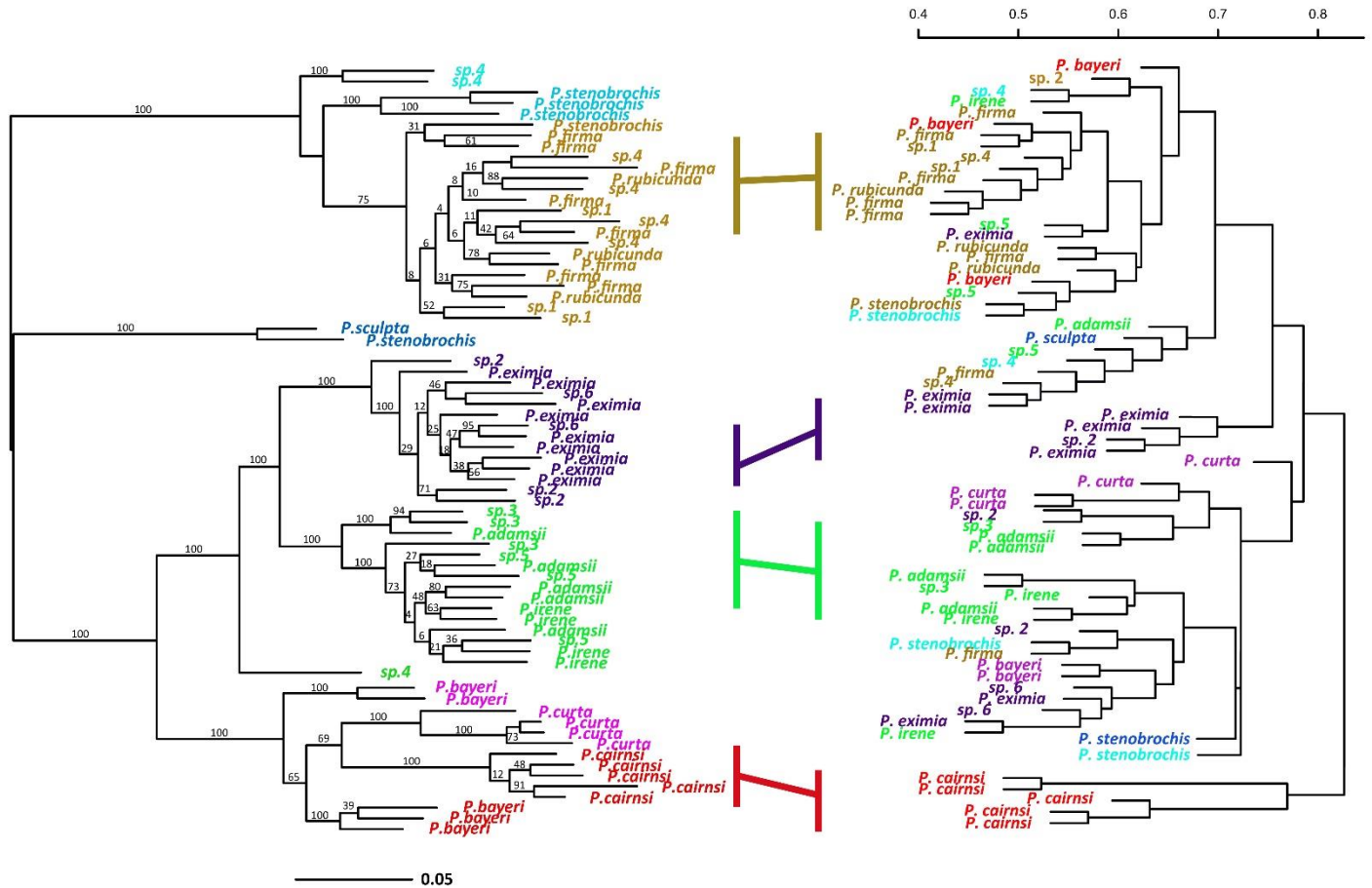
## **6.2. Descripción de filosisimbiosis y patrones eco-evolutivos entre *Pacifigorgia* y sus comunidades bacterianas**

Para determinar filosisimbiosis dentro de la comunidad bacteriana se evaluó que las relaciones filogenéticas en *Pacifigorgia* estuvieran correlacionadas con las relaciones de la diversidad beta de la comunidad microbiana entre especies relacionadas del hospedero. Para esto, se construyó un dendrograma basado en la métrica de weighted UniFrac, que tiene en cuenta tanto la abundancia de cada ASV como las relaciones filogenéticas de la comunidad microbiana, y se realizó el análisis de congruencia topológico utilizando la métrica normalizada de Robinson Foulds. Este análisis arrojó un valor de 0,85 que fue significativo con un valor de  $p=0.001$ , indicando que ambas topologías no son totalmente congruentes, sin embargo, en la Figura 15 se pueden observar que ciertas muestras presentan patrones topológicos similares tanto en el árbol filogenético como en el dendrograma bacteriano. Es el caso de las especies de *P. cairnsi* presentes en el clado 1, las cuales se agrupan tanto en el dendrograma como en la filogenia. Asimismo, ciertas especies de *P. eximia* del clado 6 presentan una agrupación en el dendrograma y en la filogenia evidenciados en la figura con una línea morada oscura. Por otro lado, ciertas muestras pertenecientes al clado 2 (*P. rubicunda*, *P. firma*, sp.1 y la sp.4), recapitulan los patrones de la filogenia en el dendrograma bacteriano. Asimismo, en el dendrograma se observa un agrupamiento de algunas muestras de *P. admasii*, *P. irene* y sp.3, que son congruentes con la filogenia de *Pacifigorgia* en su clado 3.

Otra metodología para establecer filosisimbiosis está basada en el test de Mantel utilizando el coeficiente de Pearson, el cual arrojó un valor de correlación entre la matriz de distancias filogenéticas de *Pacifigorgia* y la matriz de distancia de Bray-Curtis un resultado de  $r=0,314$  con un  $p$  valor significativo de  $0.001$ , mostrando que si existe correlación entre los patrones evolutivos de *Pacifigorgia* y los cambios en las similitudes de la comunidad microbiana.

## Filogenia *Pacifigorgia*

## Disimilitud WU de la comunidad bacteriana



Mantel  $r = 0,314$   $p = 0,001$

RF= 0.85  $p = 0,01$

**Figura 15.** Análisis de congruencia entre la filogenia del hospedero y el dendrograma de relaciones en el microbioma. El dendrograma fue elaborado con la distancia Weighted UniFrac.

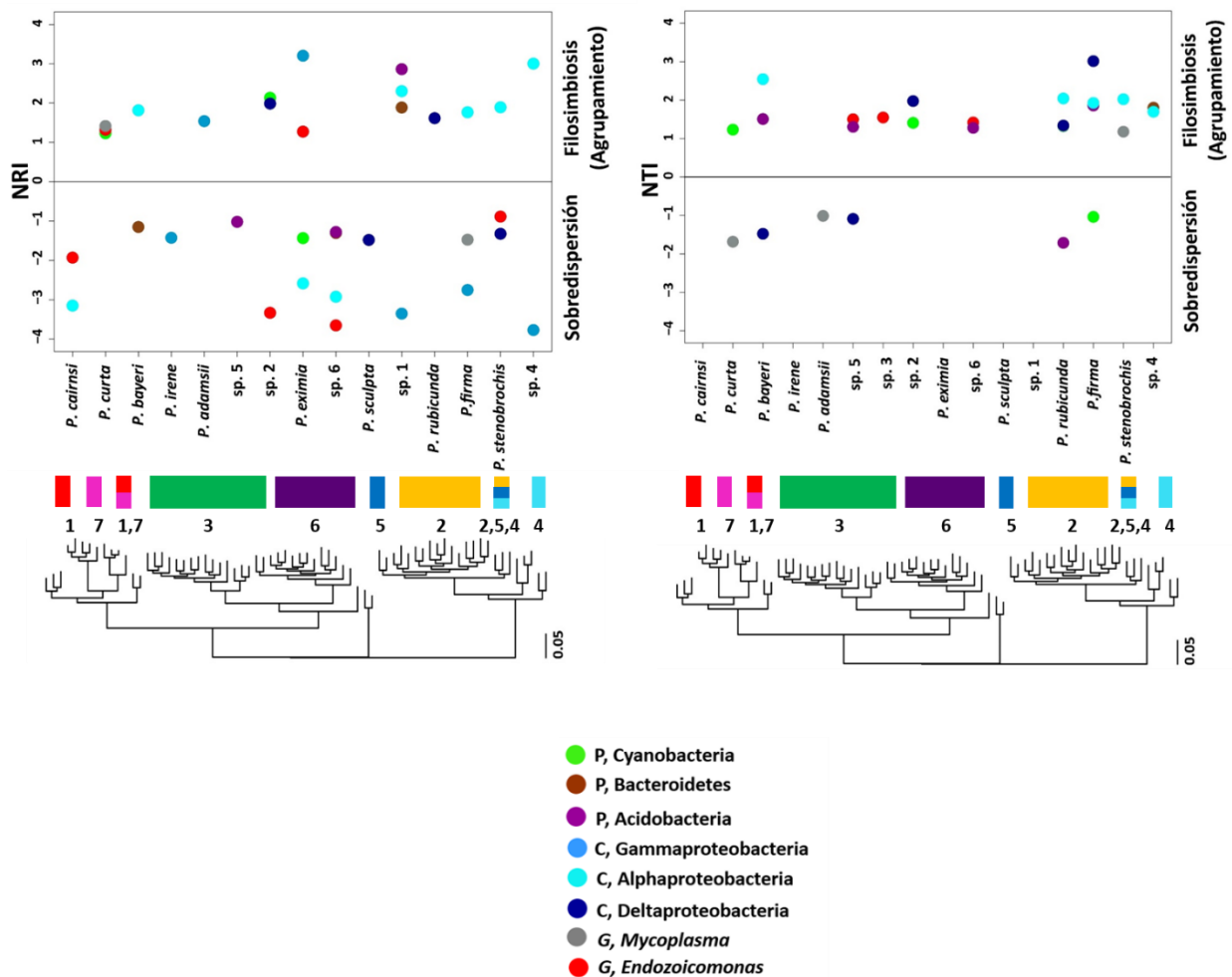
Para identificar si las asociaciones microbioma-hospedero se dan por mecanismos de ensamblaje determinístico (filosimbiosis), y establecer como varían estos patrones a través de las diferentes especies de *Pacifigorgia*, se calculó el índice NRI y el índice NTI para cada especie de *Pacifigorgia* con la finalidad de identificar que taxones microbianos se ensamblan de manera agrupada y cuáles de una manera dispersa o al azar. Estos índices examinan si taxones que co-ocurren están más o menos relacionados que lo que se espera por azar. Si estos índices son positivos indican que la comunidad esta agrupada, si son negativos, señalan

que los miembros de la comunidad están dispersos a lo largo del árbol filogenético, donde NRI es más sensible a los clados y NTI es sensible a las puntas del árbol filogenético (Webb et al., 2002). En la figura 16, se observan los valores estadísticamente significativos para cada una de las especies con sus respectivos taxones microbianos. Se observa que la mayoría de comunidades microbianas presentan una estructura filogenética significativa, es decir, que las bacterias de determinado taxón tienden a co-ocurrir con otras que están más relacionadas evolutivamente, ensamblándose de una manera determinística (filosimbiosis). Los valores de NRI y NTI fueron positivos para muchos taxones bacterianos como en el caso de la clase Alphaproteobacteria, que presenta NRI positivo para *P. bayeri* (1.81), *P. firma* (1.76), *P. stenobrochis* (1.89), sp.1 (2.3) y sp.4 (3.0), además de contar con valores positivos para NTI en *P. bayeri* (2.5), *P. firma* (1.92), *P. rubicunda* (2.0) y *P. stenobrochis* (2.0). Por otro lado, se observa que la clase Gammaproteobacteria muestra un ensamblaje determinístico con valores positivos para NRI en *P. adamsii* (1.54) y *P. eximia* (3.2). Otro patrón importante señala que bacterias pertenecientes a la clase Deltaproteobacteria están agrupadas en *P. rubicunda* para ambos índices NTI (1.3) y NRI (1.61), al igual que en la sp. 2 con un NRI de 1.9 y NTI de 1.9, asimismo, en *P. firma* hay un valor positivo alto para NTI (3.0). Por su parte, el género *Endozoicomonas*, que está ampliamente distribuido en las muestras de la comunidad y es un miembro del core, mostró patrones de agrupamiento en *P. eximia* (NRI=1.2) y *P. curta* (NRI=1.3), y valores positivos en NTI en las especies sp. 3 (1.5), sp.5 (1.5) y sp.6 (1.4). Respecto al phylum Acidobacteria, se observa que únicamente presenta un valor positivo de NTI para *P. bayeri* (1.5), *P. firma* (1.8), sp. 5 (1.3) y sp.6 (1.2), además cuenta con un valor positivo para NRI en sp.1 (2.8). La especie sin determinar sp.3, no presentó valores significativos para ningún taxón al calcular los índices NRI y NTI.

Respecto a los demás patrones en la comunidad microbiana, existen taxones bacterianos que están ensamblados de una manera sobredispersa o al azar dentro de las especies de *Pacifigorgia*, y según la figura 16 el patrón fue más evidente en los clados (NRI) que en las puntas (NTI) de los árboles filogenéticos. Se presentó dispersión más notoria en la clase Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria y el género *Endozoicomonas* para especies sp.2, sp.3 y sp. 5. Asimismo, existe más dispersión en las puntas para la clase Deltaproteobacteria, los phyla Cyanobacteria y Acidobacteria, como también en el género *Mycoplasma*.

Otra metodología para evaluar patrones eco-evolutivos entre el microbioma y el hospedero, es determinando la señal filogenética, la cual permite determinar si existe alguna tendencia de

especies relacionadas a ensamblarse unas con otras más que por procesos al azar. Esta señal filogenética se calculó en 3 tipos de rasgos de la comunidad microbiana y se presentan en la Tabla 2 todos aquellos rasgos con un  $p < 0,05$ . En la tabla se identificaron los valores más altos de señal filogenética en *Synechococcus* (ASV1153,  $K=0.95$ ,  $p=0.001$ ), *Endozoicomonas* (ASV 1579,  $K=0.80$ ,  $p=0.001$ ) y *Mycoplasma* (ASV3977,  $K=0.54$ ,  $p=0.001$ ). Dentro de la categoría de rasgos que describen la riqueza de ASVs por muestra, se encontró que para los 4 índices la señal filogenética K es significativa, donde el índice de Chao1 presente la señal más alta ( $K=0.30$ ,  $p=0.002$ ). Asimismo, respecto a los rangos funcionales se obtuvo que solamente las funciones relacionadas con fotosíntesis, metabolismos de carbohidratos y canales iónicos fueron significativas en la filogenia de *Pacifigorgia*, de este conjunto únicamente la función de canales iónicos y proteínas asociadas a clorofila presentaron señales más altas de 0.39.



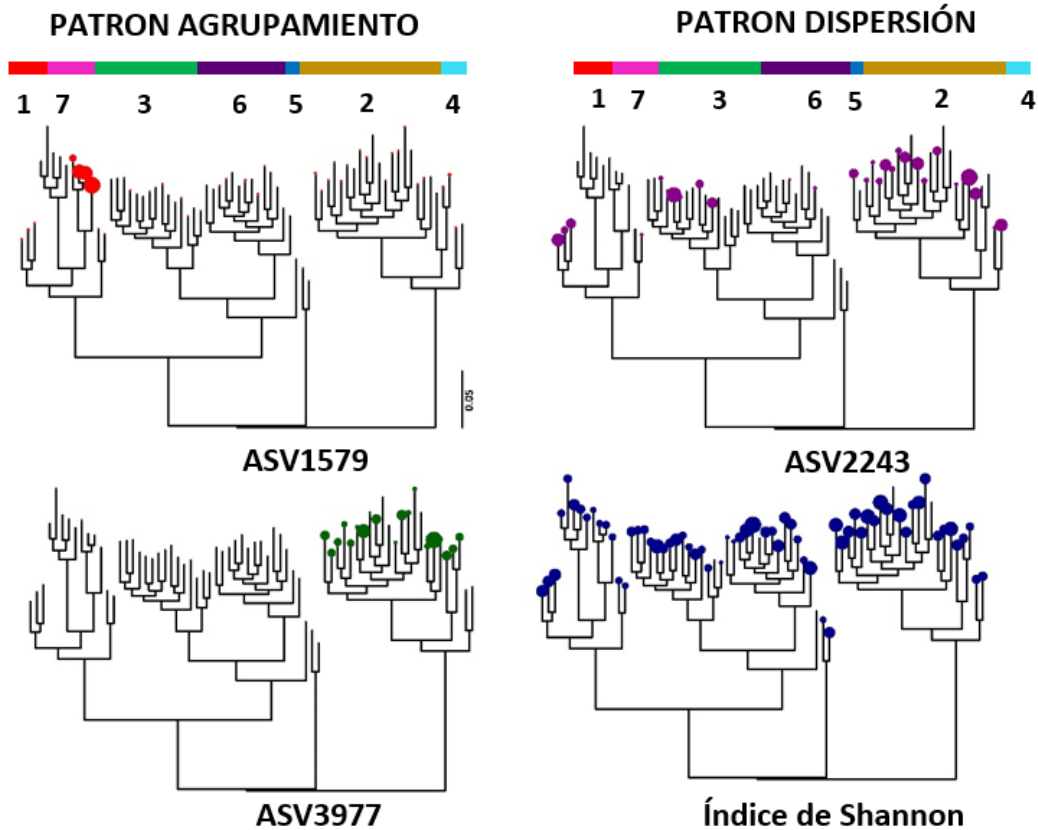
**Figura 16.** Resultados de NTI y NRI para secuencias del 16S rDNA de las comunidades bacterianas asociadas a diferentes especies de *Pacifigorgia*. Si los valores de los índices son positivos indican Agrupamiento, si son negativos indican Sobredispersión. En la figura cada

taxón bacteriano está representado con un color diferente, la letra al lado de cada nombre indica el nivel taxonómico donde P: Phylum, C: Clase y G: Género. En la parte de debajo de cada panel se muestra la filogenia de *Pacifigorgia* con sus clados (1-7) en diferente color.

**Tabla 2.** Señal filogenética K de los diferentes rasgos de la comunidad microbiana a lo largo de la filogenia de *Pacifigorgia*. Se muestra en la tabla el tipo de rasgo de la comunidad (Identidad, funcional o riqueza), con su respectivo nombre, valor K de la señal de Blomberg, el p valor, el tipo de patrón de presento a lo largo de la filogenia coralina y en que clado se presentó tal señal filogenética. Abreviaturas Prot\_ant\_fot: Proteínas asociadas a la antena de clorofila, Foto\_prot: Proteínas asociadas a procesos de fotosíntesis, Met\_carboh: metabolismo de carbohidratos.

TIPO DE RASGO	NOMBRE	K	p valor	PATRON	CLADOS
Función	Prot_ant_fot	0.424654	0.001	DISPERSION	todos
Función	Canal iónico	0.3949501	0.002	DISPERSION	todos
Función	Foto_prot	0.2700039	0.027	DISPERSION	todos
Función	Met_carboh	0.2673954	0.042	DISPERSION	todos
Función	Fotosíntesis	0.2640837	0.045	DISPERSION	todos
Identidad	<i>Synechococcus</i> (ASV1153)	0.9518967	0.001	AGRUPAMIENTO	4, 7
Identidad	<i>Endozoicomonas</i> (ASV1579)	0.8063314	0.001	AGRUPAMIENTO	4
Identidad	<i>Thiohalophilus</i> (ASV2885)	0.5199354	0.001	AGRUPAMIENTO	2
Identidad	Rhodobacteraceae (ASV2979)	0.3927111	0.001	DISPERSION	todos
Identidad	<i>Mycoplasma</i> (ASV3977)	0.5416024	0.001	AGRUPAMIENTO	2
Identidad	Microtrichaceae (ASV1871)	0.3436776	0.002	DISPERSION	todos menos 5 y 7
Identidad	<i>Mycoplasma</i> (ASV2080)	0.3414138	0.003	DISPERSION	todos menos 1 y 4
Identidad	Spirochaetes (ASV2136)	0.3623478	0.003	AGRUPAMIENTO	4 y 2
Identidad	<i>Marinobacterium</i> (ASV692)	0.3643512	0.004	AGRUPAMIENTO	4 y 2
Identidad	Rhodobacteraceae (ASV2243)	0.3196732	0.005	DISPERSION	todos menos 7 y 6
Identidad	<i>Endozoicomonas</i> (ASV709)	0.2850764	0.042	DISPERSION	2,4,1
Identidad	Pirellulaceae (ASV2998)	0.2909145	0.046	DISPERSION	todos
Identidad	<i>Cyanobium</i> (ASV3986)	0.2947538	0.054	DISPERSION	todos
Identidad	Cianobacterias	0.5159672	0.016	DISPERSION	4,2,5
Identidad	Deltaproteobacteria	0.3449041	0.004	DISPERSION	todos
Riqueza	Chao1	0.3362389	0.002	DISPERSION	todos
Riqueza	Shannon	0.3098106	0.007	DISPERSION	todos
Riqueza	Pielou	0.2993034	0.023	DISPERSION	todos
Riqueza	Simpson	0.2916916	0.037	DISPERSION	todos

Al graficar la señal filogenética de cada uno de los rasgos presentados en la tabla 2, se obtuvieron dos tipos de patrones en la filogenia de *Pacifigorgia*, señales agrupadas en algunos de los clados, lo cual fue llamado un patrón de agrupamiento y señales dispersas en todo el árbol filogenético de *Pacifigorgia*, lo cual fue denominado un patrón de dispersión. En la figura 17 se observan dos ejemplos por cada uno de estos patrones donde el ASV 1579 presenta señal filogenética exclusivamente en el clado 7 donde esta *P. curta* y *P. bayeri*. Asimismo, está el ASV3977 que tiene una señal con un patrón agrupado solamente en los clados 2 y 4. Se determinó que el ASV 1153, ASV 1579, ASV 3977, ASV 2136 y ASV 692 presentaron señal filogenética significativa con un patrón de agrupamiento en alguno de los clados de *Pacifigorgia*, exhibiendo un patrón eco-evolutivo determinístico que indica filosisimbiosis. Los demás rasgos presentes en la tabla 2 presentaron un patrón de dispersión en su señal filogenética como el caso del ASV 2243 y el índice de Shannon mostrados en la parte derecha en la figura 17.

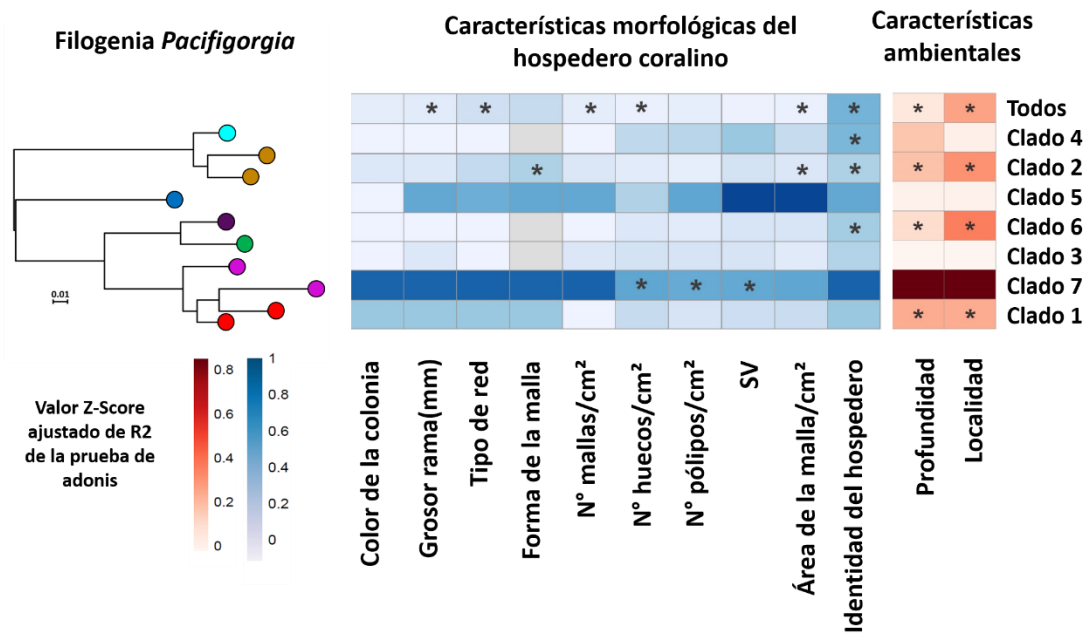


**Figura 17.** Señal filogenética de Blomberg (K) de cuatro rasgos específicos de la comunidad bacteriana a lo largo de la filogenia de *Pacifigorgia*. Los círculos en las puntas de la filogenia indican la proporción de cada rasgo con una señal significativa ( $p < 0.05$ ). Se indica por colores sobre la filogenia de *Pacifigorgia* el número del clado. ASV 1579 (*Endozoicomonas*), ASV 3977 (*Mycoplasma*) y ASV 2243 (Rhodobacteraceae).

### 6.3. Influencia relativa de las variables morfológicas del hospedero y factores ambientales en el microbioma

Se determinaron diferentes características morfológicas de las muestras de *Pacifigorgia* utilizando el estereoscopio y cámara fotográfica. En el Anexo D se encuentran en una tabla los caracteres morfológicos hallados y los compilados en la revisión bibliográfica de las 65 muestras utilizadas para este análisis. Para evaluar si existe correlación entre las variables y la composición de la comunidad microbiana, se realizó una prueba de ADONIS y se normalizaron los resultados de la correlación para obtener un Z-score el cual determinó la influencia relativa de cada variable sobre la comunidad microbiana de cada clado de *Pacifigorgia*. Según la figura 18, se determinó como patrón general que la variable que afecta significativamente ( $p < 0.05$ ) más clados en la filogenia de *Pacifigorgia* es la identidad del hospedero, demostrando una fuerte correlación significativa con los clados 2,4 y 6.

Asimismo, la identidad del hospedero, mostro la más fuerte influencia en el microbioma presente en el clado 7 (*P. curta* y *P. bayeri*) con un  $Z=0.85$ , sin embargo, su p valor no fue significativo ( $p = 0,06$ ). Por otro lado, el microbioma presente en el clado 3 y 5, no está correlacionado significativamente con ninguna variable del estudio, y tampoco se hallaron valores altos en la correlación. El microbioma del clado 2, 6 y 1 esta correlacionado positivamente con factores ambientales como la localidad y la profundidad, donde la localidad esta correlacionada fuertemente con el clado 6 ( $Z=0.354$ ,  $p=0.001$ ), el 2 ( $Z=0.304$ ,  $p=0.001$ ) y el 1 ( $Z=0.24$ ,  $p=0.023$ ). Otro hallazgo es que las variables superficie área volumen (SV), número de pólipos y número de huecos por  $\text{cm}^2$  influenciaron relativamente el microbioma presente en el clado 7 (*P. curta* y *P. bayeri*) con Z-scores de 0.40 ( $p= 0.019$ ), 0.39 ( $p=0.015$ ) y 0.42 ( $p= 0.033$ ) respectivamente. El clado 2 presento una correlación baja pero significativa con las variables área y forma de la malla.



**Figura 18.** Influencia relativa de variables morfológicas del hospedero y de variables ambientales en la composición del microbioma (Bray-Curtis,  $R^2$  ajustado de la prueba Adonis) en cada clado de *Pacifigorgia*. Los recuadros más oscuros muestran que están más fuertemente influenciados por la variable, el valor de cada recuadro es un  $R^2$  ajustado (Z-score) para comparar entre clados. Los asteriscos indican un efecto significativo (Adonis permutacional  $p < 0.05$ ) en el microbioma de cada clado. Se muestra también la filogenia colapsada por clados de *Pacifigorgia*.



## 7. DISCUSIÓN

Este estudio permitió entender y describir patrones eco-evolutivos en la simbiosis entre comunidades bacterianas y octocorales del género de *Pacifigorgia*. Se reporta por primera vez el microbioma asociado de 15 especies de *Pacifigorgia* del Océano Pacífico colombiano, ya que en la literatura solo está reportado el microbioma de *P. cairnsi* para la Isla de Malpelo (Quintanilla et al., 2018), siendo un aporte invaluable a la biología de estos octocorales que son importantes en los arrecifes brindando sustrato para múltiples especies, además de encontrarse en hiperdominancia en estos ecosistemas (Sánchez, 2016).

El estudio demuestra que las especies de *Pacifigorgia* presentan diferencias respecto a la riqueza de sus comunidades bacterianas (ver Figura 8), su estructura (Figura 9), composición y posibles funciones metabólicas (Figura 14). Asimismo, al aplicar herramientas de filogenética comparativa como búsqueda de la estructura filogenética de las comunidades microbianas en los corales, determinación de señales filogenéticas a lo largo del hospedero y estimación de la correlación de los rasgos de la comunidad microbiana con factores ambientales y la morfología del hospedero, es notorio también que existe una diferenciación en la señal y en el tipo de ensamblajes de las comunidades bacterianas a lo largo de la filogenia de *Pacifigorgia*. Se identificó que los corales del género *Pacifigorgia* presentan señales de filosisimbiosis a través de su historia evolutiva, donde ciertos ASVs microbianos son especie-específicos, mientras que otros se ensamblan al azar, de una manera sobredispersa en el hospedero. Este estudio en su conjunto, integra herramientas de biología evolutiva, microbiología, ecología y biología molecular para entender más la naturaleza de la simbiosis de este género con sus comunidades microbianas, asimismo, se recalca que es el primer estudio sobre los ensamblajes de las comunidades bacterianas en el género *Pacifigorgia* que presumiblemente evolucionó en el Pacífico por medio de radiación adaptativa, y pretende elucidar el papel evolutivo de la comunidad microbiana en *Pacifigorgia*.

### **Estructura y composición de la comunidad microbiana en *Pacifigorgia***

En cuanto a la riqueza de la comunidad bacteriana en *Pacifigorgia*, se determinó como patrón general que las especies ubicadas en Nuquí, Chocó mostraron mayor índice de riqueza Chao1 respecto a las especies oceánicas *P. curta* y *P. cairnsi*. El microbioma de estas dos especies oceánicas está casi dominado por unos pocos ASVs como en el caso de *P. curta* dominado por *Endozoicomonas* y *Mycoplasma* siendo un 97%, patrón que se ha observado en otros corales

gorgonaceos donde el ensamblaje de las comunidades bacterianas está dominado por pocos OTUs (McCauley, Haltli, Correa, & Kerr, 2016; van de Water et al., 2017; Wessels, Sprungala, Watson, Miller, & Bourne, 2017). Un ejemplo de esto es el coral *Paramuricea* dominado en un 91% por un OTU perteneciente al género *Endozoicomonas*, donde otros miembros de la comunidad presentan muy baja abundancia (Rivière, Roumagnac, Garrabou, & Bally, 2013). Esto recalca la especificidad del microbioma en las especies oceánicas de *Pacifigorgia*. Por otro lado, el índice de diversidad de Shannon que tiene en cuenta abundancia, arroja que las especies más diversas son *P. eximia*, *P. firma* y *P. irene*, lo que sugiere que estas especies mantienen interacciones con múltiples microorganismos para mantener el holobionte coralino.

El muestreo realizado en este estudio fue significativo debido a que las curvas de rarefacción se saturaron perfectamente a las 20000 lecturas, sin embargo, se requieren más estudios debido a que el 5,5% no llegó a clasificarse más allá del dominio Bacteria, indicando que probablemente sean especies nuevas para la ciencia, mostrando un potencial de diversidad inexplorada en corales del Océano Pacífico colombiano. La riqueza y diversidad mostrada fue equiparable a la reportada por el único estudio del microbioma de *Pacifigorgia* (Quintanilla et al., 2018), sin embargo, se muestra más riqueza para ciertas especies en el presente estudio.

Respecto a la composición taxonómica de la comunidad bacteriana presente en las 16 especies de *Pacifigorgia*, se determinó que está dominada por el phylum Proteobacteria y Tenericutes, y en menor proporción Bacteroidetes, Cyanobacteria y Planctomycetes. El phylum Proteobacteria es reportado como el más dominante en octocorales (van de Water, Allemand, et al., 2018), siendo el caso de octocorales del género *Eunicella* (van de Water, Voolstra, et al., 2018), *Corallium*, *Leptogorgia* (Bayer, Arif, et al., 2013), *Gorgonia*, *Eunicea* (Duque-Alarcón, Santiago-Vásquez, & Kerr, 2012), *Paramuricea* (Kellogg, Ross, & Brooke, 2016; Rivière et al., 2013), y *Plexaura* (Pike, Haltli, & Kerr, 2013), estando involucrado en procesos de adquisición de nutrientes en el ciclo del nitrógeno (Kellogg et al., 2016), del carbono, del azufre y síntesis de aminoácidos (van de Water et al., 2017), siendo un grupo importante en las especies de *Pacifigorgia* por su prevalencia en todas las muestras. Respecto al phylum Tenericutes, que estuvo representado en su totalidad por la clase Mollicutes en este estudio, domino en las especies oceánicas *P. cairnsi* y *P. curta*, así como en *P. bayeri*, *P. irene*, *P. sculpta*, sp.3 y sp.2, y es reportado como simbionte común en corales gorgonaceos presentándose en especies como *Eunicea* (Shirur, Jackson, & Goulet, 2016), *Cryogorgia koolsae*, *Cryogorgia*, *Plumarella superba* (Gray et al., 2011), *Leptogorgia* (Brück, Brück, Santiago-Vásquez, McCarthy, & Kerr, 2007) y *Muricea* (Holm & Heidelberg, 2016).

A un nivel taxonómico más profundo, se evaluaron los órdenes más representativos y se encontró una abundancia relativa alta en el orden Coxiellales en *P. adamsii* y *P. irene*, este orden estuvo dominado por el género *Coxiella* que es un microorganismo reportado como simbiote estable en el octocoral *Corallium rubrum*, *Eunicella* y *Leptogorgia* (van de Water, Voolstra, et al., 2018). Este género encontrado en especies pertenecientes al mismo clado señala una especificidad de este género para ciertas especies de *Pacifigorgia*. Otro patrón interesante fue la abundancia alta del orden Rhodovibrionales, que pertenecen a la clase Alphaproteobacteria en el microbioma de las especies del clado 1 (*P. cairnsi*, *P. bayeri*), siendo diferencial respecto a las demás especies. Este orden estuvo dominado por el género *Pelagibius*, el cual ha sido reportado en corales como *Galaxea* y *Montipora* en un estudio realizado en el mar del sur de China (Cai et al., 2018). Asimismo, el orden Alteromonadales que fue reclasificado recientemente a Cellvibrionales BD1-7, presentó una abundancia alta en este mismo clado uno, indicando su especificidad con estas especies de *Pacifigorgia*. Este orden es señalado como uno de los más abundantes en especies como *Corallium rubrum*, y no se conoce su posible función en el holobionte coralino.

El core microbiano, que corresponde a los miembros más predominantes y abundantes de la comunidad bacteriana de *Pacifigorgia*, estuvo dominado por miembros asignados taxonómicamente a los géneros *Endozoicomonas*, *Mycoplasma*, *Synechococcus*, *Vibrio*, *Thalassotalea*, *Thiohalophilus* y *Marinobacterium*. Ocho ASVs fueron asignados al género *Endozoicomonas*, el cual es un simbiote importante en corales gorgonáceos (Bayer, Arif, et al., 2013; Correa et al., 2013; Pike et al., 2013; Pollock et al., 2018; Quintanilla et al., 2018; Robertson, Haltli, McCauley, Overy, & Kerr, 2016; van de Water et al., 2017; van de Water, Voolstra, et al., 2018; Wessels et al., 2017) ya que está implicado en procesos esenciales para el funcionamiento del holobionte como la adquisición de nutrientes, procesos metabólicos como gluconeogénesis (van de Water, Voolstra, et al., 2018), transporte de moléculas y síntesis de aminoácidos (Neave et al., 2016), así como la capacidad de ayudar al hospedero a sobrellevar el estrés ambiental y translocar glucosa reconociendo, comunicando y modulando esta señal como con su hospedero coralino (Ding, Shiu, Chen, Chiang, & Tang, 2016). Por otro lado, este género es productor de sustancias antimicrobianas controlando la diversidad y abundancia de posibles ataques por parte de oportunistas y/o patógenos en el coral (Rua et al., 2014). La relación con *Endozoicomonas* se mantiene en el linaje de los abanicos de mar de *Pacifigorgia*, ya que podrían estar involucrados en la resiliencia coralina por sus múltiples interacciones con el hospedero y su alta abundancia en todas las especies.

El género *Mycoplasma*, se reporta en este estudio como miembro del core y género dominante en las especies *P. curta*, *P. cairnsi*, *P. bayeri*, *P. irene*, *P. sculpta*, sp.3 y sp.2, siendo un simbiote con alta abundancia. Estudios han determinado que pueden mantener relaciones mutualistas o comensalistas con el hospedero coralino y se han encontrado de forma abundante en el microbioma del coral (Gray et al., 2011; Holm & Heidelberg, 2016; Penn, Wu, Eisen, & Ward, 2006). Pese a que su función no está bien estudiada (Quintanilla et al., 2018), su papel como simbiote en el género de *Pacifigorgia* es relevante, por su prevalencia y señal filogenética.

Otro miembro prevalente en el core de la comunidad microbiana es el género *Vibrio*, el cual anteriormente ha sido descrito en octocorales de la familia Gorgoniidae del mar Mediterráneo como simbiote común encontrado en alta abundancia (Franco et al., 2016). Si bien este género ha sido reportado como patógeno, se han determinado funciones dentro del holobionte coralino como una bacteria degradadora de azufre (Raina, Tapiolas, Willis, & Bourne, 2009), además de ayudar a la digestión de alimento en el hospedero (Le Roux et al., 2005). Particularmente, fue hallado en abundancia alta en el clado 6, donde está la especie *P. eximia*, sp. 2 y sp.3.

Los únicos dos taxones pertenecientes al phylum Cyanobacteria en el core bacteriano fueron *Synechococcus* y *Cyanobium*, presentes en todas las especies de *Pacifigorgia*, con una abundancia menor en las especies de la isla de Malpelo *P. curta* y *P. cairnsi*. Este patrón puede deberse a la ubicación geográfica debido a que las condiciones ambientales son distintas. Estos dos géneros se caracterizan por producir toxinas (Frazão, Martins, & Vasconcelos, 2010), que podrían cumplir un papel en la protección contra patógenos en el holobionte. Asimismo, los dos taxones se han reportado como simbioses de esponjas donde cumplen funciones como síntesis de sideroforos y transporte (Burgsdorf et al., 2015), sin embargo, no se conoce su papel en la simbiosis con corales.

La familia Rhodobacteraceae, miembro del core, ha sido ampliamente reportada en corales (Chen, Tseng, Chen, & Tang, 2011; McDevitt-Irwin, Baum, Garren, & Vega Thurber, 2017; Koty H Sharp, Distel, & Paul, 2012). Un ejemplo es su presencia en el coral *Porites*, donde se evidenció en mayor abundancia en el mucus antiguo del coral regulando el estado de salud y manteniendo interacciones benéficas con el hospedero (Glasl, Herndl, & Frade, 2016; Simon et al., 2017). Asimismo, Quintanilla y colaboradores en el 2018 identifican esta familia relacionada con la enfermedad de los parches necróticos indicando que un desbalance en la abundancia de esta puede conllevar a un estado de enfermedad en *P. cairnsi*. En el presente

trabajo se identificó abundancia alta para este taxón en el clado 2 para las especies *P. firma* y *P. rubicunda*, siendo un simbiote común en corales que podría mantener la homeostasis del mismo.

Por otro lado, en el core microbiano se identificó el género *Thalassotalea*, con una abundancia muy alta en *P. eximia* y *P. rubicunda*. Esta bacteria ha sido reportada en el coral *Montipora capitata* (Summers, Freckelton, Nedved, Rice, & Hadfield, 2018), *Euphylliae glabrescens* (Sheu, Sheu, Xie, Tang, & Chen, 2018) y en sedimentos marinos (Kang et al., 2017). Su papel es desconocido en el microbioma coralino, como sucede con el género *Marinobacterium* presente en el core, si bien se ha encontrado en el coral *Mussismilia hispida* (Chimetto et al., 2011), en la literatura revisada no se encontraron funciones de este microorganismo, siendo un campo incipiente de investigación. Otro género hallado en el core fue *Thiohalophilus*, el cual ha sido únicamente reportado en lagos hipersalinos con la capacidad de oxidar azufre. Sin embargo, no ha sido reportado como simbiote en corales, siendo este su primer registro.

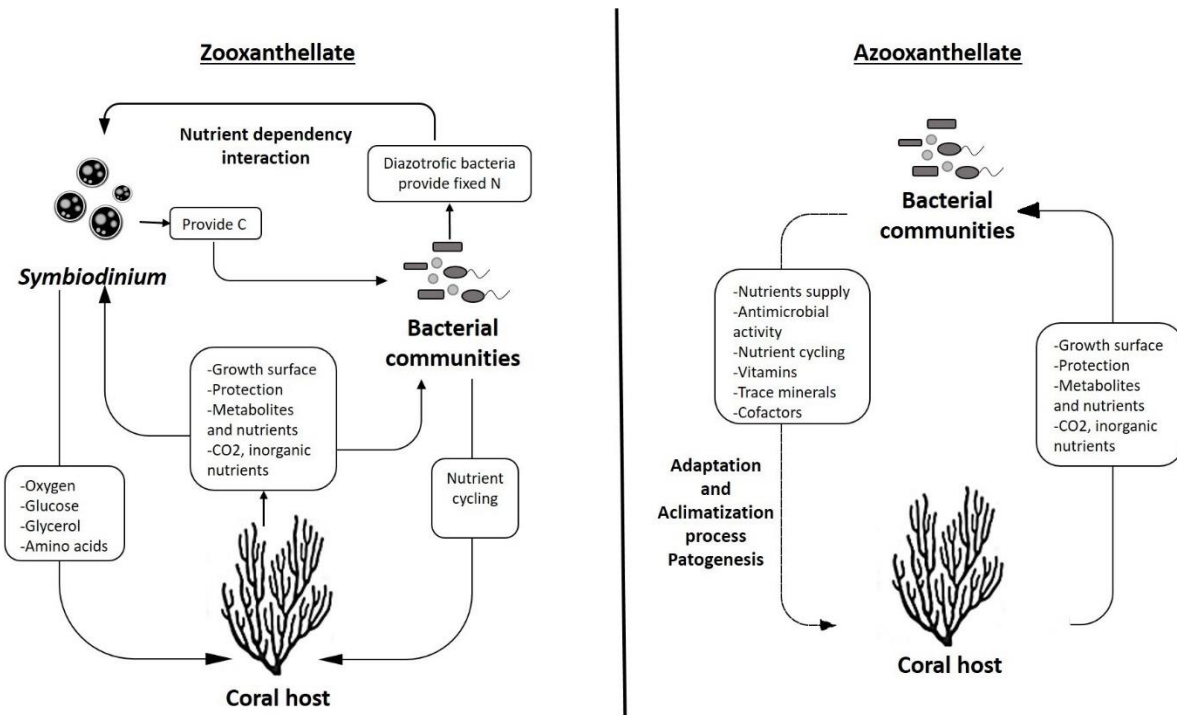
La composición de la comunidad bacteriana es diferente entre las especies de *Pacifigorgia*, lo cual es evidenciado en la PERMANOVA realizada, además de la prueba de ANOSIM y Adonis, ya que todas arrojaron valores significativos mostrando una diferenciación respecto a su diversidad beta de las muestras. Es notorio que las comunidades bacterianas de la Isla de Malpelo están muy bien diferenciadas de las de Choco en la gráfica NMDS (Figura 11, Tabla1), además de presentar diferencias respecto a los índices de riqueza y diversidad. Estos cambios en la composición de la comunidad bacteriana, también se ven reflejados en el posible perfil funcional de la comunidad, ya que existen diferencias marcadas y significativas entre las diferentes especies como se observa en la figura 14, respecto a su metabolismo, funciones celulares, y adaptación al medio ambiente. Por ejemplo, *P. bayeri* y *P. irene*, que son especies que evolutivamente se presentan en clados cercanos, presentan alta producción de carbohidratos y alta riqueza lo cual contrasta con *P. cairnsi*, que presenta baja producción de carbohidratos, pocas secuencias relacionadas con metabolismo y muy altas abundancias para funciones relacionadas con procesamiento de la información genética, producción de toxinas y adaptación al ambiente, mostrando un contraste entre especies que es congruente con esta metodología que pretende entender los posibles perfiles metabólicos de los diferentes microbiomas. En este estudio se identifican por primera vez posibles funciones metabólicas para el microbioma de 16 especies de *Pacifigorgia*.

El papel de las comunidades bacterianas en los octocorales se ha descrito ampliamente en diferentes estudios, recalcando la importancia ecológica y fisiológica en el holobionte coralino, manteniendo la resiliencia del mismo. Cuando existe un desbalance de estas comunidades microbianas, se produce una disbiosis en el coral que conlleva a la enfermedad en *Pacifigorgia* (Quintanilla et al., 2018), siendo claves en el mantenimiento en el estado de salud coralino. En la figura 19, se señalan diferentes funciones e interacciones de las comunidades bacterianas comparando corales con zooxantelas (dinoflagelado del género *Symbiodinium*) y sin zooxantelas. El género de *Pacifigorgia*, al no poseer el alga fotosintética *Symbiodinium* y al encontrarse en un rango estrecho de profundidad (4.5-8.5 m) siendo difícil observar las diferentes oportunidades ecológicas existentes para estos, utilizan los nutrientes disponibles en el medio dependiendo más funcionalmente de otros simbiontes como las comunidades bacterianas para mantener la salud del holobionte coralino. Funciones como la producción de vitamina B6, el ciclado de nutrientes como carbono, nitrógeno, azufre, la producción de antibióticos como ansamicina y estreptomycin y la producción de cofactores de vitaminas, fueron encontradas en la comunidad bacteriana de todas las especies de *Pacifigorgia* utilizando la herramienta bioinformática PICRUST (ANEXO C) y podrían estar involucradas en procesos de aclimatación y adaptación, así como mantenimiento de un estado de salud dentro del coral. No obstante, faltan estudios de metatranscriptómica y metabolómica para determinar exactamente estas funciones. Asimismo, no se ha explorado el papel evolutivo de las comunidades microbianas, y si son facilitadoras de radiación adaptativa en las especies hospederas, sin embargo, en este estudio se reporta evidencia de que la comunidad microbiana de *Pacifigorgia* es más similar en especies cercanas evolutivamente, lo cual sugiere que el hospedero está realizando un filtro (Bletz et al., 2017; Mazel et al., 2018) que podría ser controlado por filosisimbiosis.

### **Filosisimbiosis y patrones eco-evolutivos del microbioma asociado a las especies de *Pacifigorgia***

Se determinó una relación positiva entre la disimilaridad de las comunidades bacterianas y las distancias filogenéticas de las diferentes especies de *Pacifigorgia*, probando que existe filosisimbiosis utilizando el test de Mantel con un valor de correlación de 0.34, el cual es un valor más alto que el reportado en un estudio de filosisimbiosis en corales, 0.19 (Pollock et al., 2018) dándole fuerza a este resultado y mostrando que este método permite identificar que corales más cercanos evolutivamente, presentan patrones ecológicos más similares en su comunidad bacteriana. Pese a que la metodología de congruencia de RF calculó una congruencia baja

entre el dendrograma bacteriano y la filogenia de *Pacifigorgia* (0.85), se pueden evidenciar patrones de agrupamiento y similitud del microbioma en ciertas especies del hospedero como es el caso de *P. cairnsi*, ciertas especies del clado 3 como *P. adamsii* y *P. irene* y especies del clado 2 como *P. firma* y *P. rubicunda* (figura 15), que recapitulan en estos casos, la filogenia del hospedero. Según Mazel y colaboradores en el 2018, se determinó que el test de Mantel presenta más poder estadístico y es más sensible para detectar patrones de filosisimbiosis respecto a la metodología de análisis de congruencia de Robinson Foulds (RF), indicando que para estas especies de *Pacifigorgia* hay patrones de filosisimbiosis.



**Figura 19.** Las comunidades claves son simbiosistas clave en corales gorgonáceos. A la izquierda se observan las interacciones de corales con zooxantelas y al lado derecho se muestran corales sin zooxantelas con sus respectivas interacciones exclusivamente con comunidades bacterianas. Imagen tomada de Sánchez et al., 2019.

Asimismo, gracias a los índices NRI y NTI se determinó que los ensamblajes de ciertos taxones microbianos son determinísticos, indicando filosisimbiosis con las diferentes especies de *Pacifigorgia* (Figura 16), como es el caso de la clase Alphaproteobacteria y Deltaproteobacteria en el clado 2 y el clado 4 con valores positivos observados en la figura 16, indicando que ambos taxones tienden a co-ocurrir con otras bacterias estrechamente relacionadas más que por azar, brindando información respecto a su riqueza y composición, respaldando el patrón de

filosimbiosis mostrado en el dendrograma de la comunidad bacteriana para *P. rubicunda* y *P. firma*. Estos dos taxones microbianos ya han sido reportados como abundantes en octocorales (van de Water et al., 2017; van de Water, Voolstra, et al., 2018) y esto demuestra que son simbioses relacionados con la historia evolutiva de *Pacifigorgia*. Otro patrón eco-evolutivo se estableció en el clado 3 y clado 6, donde las Gammaproteobacteria presentan un índice alto revelando ensamblajes determinísticos en *P. eximia* y *P. adamsii*, que son clados cercanos evolutivamente indicando que estos patrones ecológicos de la comunidad bacteriana son congruentes con la filogenia del hospedero. Específicamente, el género *Endozoicomonas* presenta una señal positiva de agrupamiento en *P. eximia* del clado 6 y *P. curta* para NRI, mostrando el patrón de filosimbiosis a nivel de clado. La sp. 3 y la sp.5 que pertenecen al clado 3, exhiben patrones similares con *Endozoicomonas* pero a nivel de las puntas de la filogenia (NTI), indicando ensamblajes determinísticos más marcados. *Mycoplasma* a su vez presentó agrupamiento en *P. curta*. Ambos géneros, son señalados como simbioses esenciales que presentan múltiples funciones fisiológicas y que se han mantenido a lo largo de la historia evolutiva de *Pacifigorgia*, presentando agrupamientos determinísticos de taxones relacionados.

Estos patrones de agrupamiento de los taxones más representativos de la comunidad bacteriana podrían indicar que existe un filtrado del hábitat (cada especie de *Pacifigorgia*), donde un grupo de especies estrechamente cercanas comparten un rasgo que les permite persistir en esta especie de coral (Webb et al., 2002), así especies bacterianas más cercanas evolutivamente comparten limitaciones fisiológicas similares y muestran un nicho conservado que en este caso sería el coral (Cavender-Bares et al., 2004). Otra posible explicación de este fenómeno podría ser que este agrupamiento determinístico podría deberse a un evento de radiación adaptativa (Horner-Devine & Bohannan, 2006) en la comunidad bacteriana, lo cual también sucedió con el género de *Pacifigorgia* (Colmenares-García S., 2017) ya que fue un proceso de especiación rápida que partió de un ancestro común, donde existe una correlación entre los rasgos morfológicos y el ambiente (Schluter, 2000), siendo probablemente un comportamiento uniforme en el holobionte coralino, que posiblemente hayan co-evolucionado.

Para entender como el microbioma influencia la biología del hospedero y poder comprender los procesos que moldean los microbiomas asociados a *Pacifigorgia*, es necesario entender el microbioma (desde una perspectiva evolutiva) como un rasgo del hospedero (Hird, 2019). Por este motivo, en este estudio se integraron herramientas de filogenética comparativa y se planteó una metodología que tiene en cuenta la filogenia de *Pacifigorgia* para estudiar la distribución de los rasgos microbianos (clasificados en tres categorías, ver tabla 2) a lo largo de la filogenia del



hospedero. Se determinó la señal filogenética K para los rasgos y se halló la existencia de señales significativas y mayores a cero en ciertos ASVs bacterianos (*Synechococcus* ASV 1153, *Endozoicomonas* ASV 1579, *Thiohalophilus* ASV 2885, *Mycoplasma* ASV 3977, *Spirochaetes* ASV 2136 y *Marinobacterium* ASV 692) mostrando un patrón de agrupamiento de la señal, es decir, una señal localizada en un solo clado, o en clados evolutivamente cercanos indicando que estos rasgos han evolucionado dependientemente de la filogenia de *Pacifigorgia* bajo un modelo Browniano de evolución. Este expone que los valores de estos rasgos evolucionan bajo un amplio rango de escenarios, al azar e independientemente a lo largo de las ramas del árbol filogenético, que representan el tiempo de divergencia (Felsenstein, 1985). Además, el modelo establece que la covarianza entre los valores de los rasgos de cada taxón en las puntas de la filogenia es proporcional a su historia evolutiva, donde especies cercanas tienden a ensamblarse unas con otras más que por azar a lo largo de la filogenia (Blomberg et al., 2003). Este resultado determina la existencia de señal filogenética entre *Pacifigorgia* y sus rasgos microbianos, donde las especies más cercanas de *Pacifigorgia* van a presentar covarianzas más pequeñas entre los valores de estos rasgos microbianos comparados con los valores de estos rasgos en especies más alejadas evolutivamente (Revell, Harmon, & Collar, 2008).

Por medio de esta metodología propuesta se pueden identificar y entender procesos evolutivos entre *Pacifigorgia* y su comunidad microbiana entendida como rasgos del hospedero. Igualmente, los resultados de esta metodología nueva son congruentes con el análisis de expresión diferencial (Deseq2 y edgeR) de los ASVs en las diferentes especies de *Pacifigorgia* presentando señal filogenética K, lo que denota estructura filogenética en el holobionte. Por ejemplo, *Mycoplasma* (ASV 3977) que es un simbiote abundante en gorgonáceos está diferencialmente expresado en el clado 2 y a pesar de que no se ha registrado en la literatura un posible rol dentro del holobionte coralino, se propone como una bacteria que mantiene una señal filogenética significativa con el coral mostrando un patrón de especificidad con *P. firma*, *P. rubicunda*, *P. stenobrochis*, sp1. y sp.4, conservando una relación con la historia evolutiva de *Pacifigorgia*. Por otro lado, *Marinobacter* (ASV 692) es específico para el clado 2 y 4. Esta bacteria halófila es un simbiote previamente reportado en varias especies de corales escleractineos como *Porites* (Koty H Sharp et al., 2012), *Acropora* (Littman, Willis, Pfeffer, & Bourne, 2009) y *Fungia echinata* (Badhai, Ghosh, & Das, 2016), llevando a cabo múltiples funciones en el holobionte como la capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono relacionándola con el ciclo del carbono dentro del coral, además, induce el asentamiento de

larvas en *Porites* y es capaz de degradar ciertos contaminantes del medio (K. H. Sharp, Sneed, Ritchie, Mcdaniel, & Paul, 2015). Esto da a entender que existe una consistencia en la relación con la historia evolutiva de *Pacifigorgia*, ya que podría estar contribuyendo de múltiples maneras al hospedero. Otros taxones que mantuvieron este patrón conjunto de señal filogenética significativa y abundancia relativa diferencialmente expresada fueron *Endozoicomonas* (ASV 1579) en *P. curta*, *Spirochaetes* (ASV 2136) en el clado 4 y *Thiohalophilus* (ASV 2885) en el clado 2 y 4, ensamblándose de una manera determinística (filosimbiosis) en estas especies de coral. Estos tres casos enfatizan un patrón eco-evolutivo debido al aporte mencionado en la sesión anterior de *Endozoicomonas* al holobionte y proponiendo una función en la evolución del hospedero para el género *Thiohalophilus*. El género *Spirochaetes* ha sido reportado como simbiote en corales gorgonaceos como *Muricea californica* (Holm & Heidelberg, 2016), *Leptospira* y *Corallium rubrum* (van de Water, Voolstra, et al., 2018) donde se reportó con funciones como la degradación de alimento del hospedero y fijación de nitrógeno, siendo un simbiote fundamental en *Pacifigorgia*.

Otros patrones eco-evolutivos encontrados respecto a la abundancia diferencial de ciertos ASVs en las especies de *Pacifigorgia* (ver figura 10) recalcan la particularidad de las relaciones microbioma-hospedero, siendo el caso de *Mycoplasma* (ASV 2080) encontrado en los clados 6, 3 y 7, que son clados monofiléticos de *Pacifigorgia* con especies evolutivamente cercanas lo cual es recapitulado por la composición de su contraparte bacteriana. Asimismo, sucede con *Marinobacter* (ASV 2326) el cual es específico para el clado 3, donde están las especies *P. adamsii*, *P. irene*, sp. 5 y sp.3, y en este mismo clado se encuentra un ASV presente únicamente en *P. adamsii* y *P. irene* que fue asignado taxonómicamente al género *Coxiella* (ASV 1576), que ya se ha reportado como simbiote en otros octocorales. Estos patrones microbioma-específicos presentes en cada especie de *Pacifigorgia* recalcan que probablemente estas bacterias evolucionaron y se adaptaron a estas especies, realizando una partición de nicho, debido a que todas las especies de *Pacifigorgia* conviven en simpatria en el océano Pacífico.

En las especies sin determinar (sp. 1- sp.6) se halló congruencia entre su respectiva filogenia y la composición de sus comunidades bacterianas, sin embargo, según Colmenares 2017, probablemente el género de *Pacifigorgia* presente una sobrestimación de especies debido a su alta plasticidad fenotípica ya que genéticamente son muy similares a otras, sumándose a esto la evidencia presentada en este estudio, la cual demuestra su similitud con otras especies dentro de los clados establecidos donde se comparten patrones eco-evolutivos con el microbioma, haciéndolas ecológicamente más similares a especies ya clasificadas de

*Pacifigorgia*. Sin embargo, se recomienda realizar estudios más detallados de su morfología y aplicar diferentes tipos de herramientas de biología molecular para elucidar taxonómicamente estas especies.

### **Influencia relativa de las variables morfológicas del hospedero y algunas variables ambientales sobre la comunidad bacteriana asociada a *Pacifigorgia***

Respecto a la relación entre las características morfológicas del hospedero coralino y la composición de las comunidades bacterianas de *Pacifigorgia*, es notorio que la variable que más clados influencia significativamente es la identidad del hospedero (clado 2, 4 y 6), lo cual es respaldado por el análisis de filosisimbiosis, por la señal filogenética de varios ASVs encontrados que también están diferencialmente expresados respecto a su abundancia relativa en el clado 2 y 4. Asimismo, *P. eximia* del clado 6 exhibe patrones de filosisimbiosis en el dendrograma bacteriano, presenta ensamblajes determinísticos de Gammaproteobacteria y *Endozoicomonas* (ver Figura 16), además de presentar ASVs con abundancias altas respecto a las demás especies (*Mycoplasma* ASV 2080 y *Endozoicomonas* ASV 709, ver figura 10), mostrando que es una variable que afecta significativamente la composición del microbioma.

Por otro lado, se encontró que la composición del microbioma asociado a las especies de *Pacifigorgia* pertenecientes al clado 7 (*P. curta* y *P. bayeri*) están influenciadas significativamente por el número de pólipos, los cuales podrían estar demarcando microhábitats dentro del coral con diferentes condiciones fisiológicas, regulando la composición de las comunidades microbianas. En muchos estudios se ha determinado que dentro del mismo coral existen microhábitats con diferente composición bacteriana, diferente metabolismo (Hernandez-Agreda, Gates, & Ainsworth, 2016) e incluso diferentes señales de filosisimbiosis por ejemplo en el mucus, en el tejido superficial del coral y en el esqueleto coralino (Pollock et al., 2018), determinando que la morfología coralina afecta las dinámicas microbianas. Otras características que están correlacionadas con la comunidad microbiana del clado 7 es el número de huecos y el área superficie volumen (SV). Esta última característica según Colmenares 2017, probablemente está moldeada por el fraccionamiento y competencia de recursos de *Pacifigorgia* sumando la actividad de las comunidades bacterianas, que, según este estudio, podrían favorecer el establecimiento de diferentes nichos nutricionales en espacios adyacentes para su hospedero. Como estas características son diferentes entre los clados, afectan significativamente la composición de la comunidad microbiana que a su vez podría estar conllevando a procesos de optimización de la productividad de los recursos en el holobionte en

este clado. El número de huecos que es menor respecto a otras especies de *Pacifigorgia*, esta correlacionado con la composición del microbioma, probablemente porque al pasar más flujo de agua por estas mallas con menor área y con huecos más grandes, microdinámicas del flujo de nutrientes podrían afectar la comunidad microbiana allí presente.

Por otra parte, las especies del clado 2, *P. firma*, *P. stenobrochis*, *P. rubicunda* y sp. 1 por su parte, están correlacionadas significativamente con dos características macroscópicas del coral, el área y la forma de la malla de la colonia. El área de la malla fue menor para este clado respecto a las demás especies de *Pacifigorgia*, lo que sugiere que la proporción de malla esta correlacionada con la composición microbiana, ya que dependiendo de esta área más o menos bacterias van a establecerse en cierta parte del tejido coralino.

## 8. CONCLUSIONES

Las comunidades microbianas asociadas a las diferentes especies de *Pacifigorgia* presentaron diferencias en cuanto a su riqueza y diversidad, así como en la composición taxonómica de cada especie hospedera.

Los simbioses en la comunidad bacteriana más abundantes y prevalentes en todas las especies de *Pacifigorgia* pertenecen al phylum Proteobacteria y Tenericutes, donde los géneros *Endozoicomonas* y *Mycoplasma* fueron los géneros más prevalentes del microbioma con más de un 60% de la abundancia relativa.

Existe una congruencia entre la historia evolutiva de *Pacifigorgia* y la disimilaridad que existe entre sus comunidades bacterianas. Si bien el método de congruencia RF arroja que tanto el dendrograma bacteriano como la filogenia de *Pacifigorgia* no son exactamente congruentes, el patrón eco-evolutivo de filosisimbiosis pudo ser evidenciado por tres metodologías, el test de Mantel, la señal filogenética encontrada en algunas bacterias con ciertas especies de *Pacifigorgia*, y los índices NRI y NTI, los cuales permitieron discernir que las comunidades microbianas se ensamblan determinísticamente en las diferentes especies de *Pacifigorgia*.

La metodología para buscar ASVs bacterianos con abundancias relativas estadísticamente diferentes entre las especies de *Pacifigorgia*, permitió establecer a un nivel taxonómico más profundo patrones de filosisimbiosis, además de arrojar los mismos resultados en la búsqueda de señales filogenéticas significativas de ciertos ASVs bacterianos.

Se propone una nueva metodología que tiene en cuenta la comunidad bacteriana como rasgos del hospedero, para evaluar acertadamente la señal filogenética de estos rasgos en la evolución del hospedero. Se concluye que ciertos ASVs, evolucionaron dependientemente de la filogenia de *Pacifigorgia*, encontrándose que la comunidad bacteriana está implicada en procesos evolutivos del holobionte.

Al utilizar métodos de filogenética comparativa es posible evaluar que procesos evolutivos generaron el microbioma y permiten tener un mejor entendimiento del papel del microbioma en la evolución del hospedero.

La profundidad es un factor ambiental que está correlacionado con la riqueza y composición de la comunidad microbiana, sugiriendo que las especies de *Pacifigorgia* son generalistas respecto a sus rangos de profundidad.

El número de huecos, pólipos y el índice superficie área volumen (SV), afectan significativamente el microbioma del clado 7, debido a que estas características pueden crear microhábitats donde varía la composición de las comunidades bacterianas, además, estas características al ser moldeadas por el fraccionamiento y competencia de recursos en los corales y más la actividad microbiana, favorecen el establecimiento de diferentes nichos nutricionales en cada hospedero.

La forma y el área de la malla afectan la comunidad microbiana del clado 2, debido a que estas características macroscópicas del coral, son afectadas por diversos factores bióticos, que a su vez afectan el establecimiento de las comunidades microbianas en el coral.

## 9. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis de metagenómica para analizar todo el genoma de los microorganismos asociados, y un análisis metatranscriptómico para elucidar funciones de la comunidad microbiana.
- Complementar con un análisis metabolómico de la comunidad microbiana para saber que metabolitos están implicados en la interacción hospedero-microbioma
- Utilizar diferentes marcadores moleculares para establecer una filogenia bacteriana más robusta y establecer coevolución entre *Pacifigorgia* y su comunidad microbiana.
- Tener información de las comunidades microbianas asociadas a *Pacifigorgia elegans* del océano atlántico para complementar la información de este estudio.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, T. D., Thurber, R. V., & Gates, R. D. (2010). The future of coral reefs: A microbial perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(4), 233-240.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.001>
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Bohmann, K., Zepeda-Mendoza, M. L., & Gilbert, M. T. P. (2016). Do Vertebrate Gut Metagenomes Confer Rapid Ecological Adaptation? *Trends in Ecology & Evolution*, 31(9), 689-699. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.06.008>
- Altizer, S., Harvell, D., & Friedle, E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(11), 589-596.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.08.013>
- Ament-Velásquez, S. L., Breedy, O., Cortés, J., Guzman, H. M., Wörheide, G., & Vargas, S. (2016a). Homoplasious colony morphology and mito-nuclear phylogenetic discordance among Eastern Pacific octocorals. *Molecular phylogenetics and evolution*, 98, 373-381.
- Ament-Velásquez, S. L., Breedy, O., Cortés, J., Guzman, H. M., Wörheide, G., & Vargas, S. (2016b). Homoplasious colony morphology and mito-nuclear phylogenetic discordance among Eastern Pacific octocorals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 98(March), 373-381. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.023>
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Badhai, J., Ghosh, T. S., & Das, S. K. (2016). Composition and functional characterization of microbiome associated with mucus of the coral *Fungia echinata* collected from Andaman Sea. *Frontiers in microbiology*, 7, 936.
- Barrero-Canosa, J., Dueñas, L. F., & Sánchez, J. A. (2013). Isolation of potential fungal pathogens in gorgonian corals at the Tropical Eastern Pacific. *Coral Reefs*, 32(1), 35-41.



- Bayer, T., Arif, C., Ferrier-Pagès, C., Zoccola, D., Aranda, M., & Voolstra, C. R. (2013). Bacteria of the genus *Endozoicomonas* dominate the microbiome of the Mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Marine Ecology Progress Series*, *479*, 75-84.
- Bayer, T., Neave, M. J., Alsheikh-Hussain, A., Aranda, M., Yum, L. K., Mincer, T., ... Voolstra, C. R. (2013). The microbiome of the Red Sea coral *Stylophora pistillata* is dominated by tissue-associated *Endozoicomonas* bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *79*(15), 4759-4762.
- Blackall, L. L., Wilson, B., & Oppen, M. J. (2015). Coral—The world's most diverse symbiotic ecosystem. *Molecular ecology*, *24*(21), 5330-5347.
- Bletz, M. C., Archer, H., Harris, R. N., McKenzie, V. J., Rabemananjara, F. C. E., Rakotoarison, A., & Vences, M. (2017). Host Ecology Rather Than Host Phylogeny Drives Amphibian Skin Microbial Community Structure in the Biodiversity Hotspot of Madagascar. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01530>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution*, *57*(4), 717-745.
- Bogdanowicz, D., Giaro, K., & Wróbel, B. (2012). TreeCmp: Comparison of Trees in Polynomial Time. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *8*, 475-487. <https://doi.org/10.4137/EBO.S9657>
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biology*, *13*(8), e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Bosch, T. C. G. (2013). Cnidarian-Microbe Interactions and the Origin of Innate Immunity in Metazoans. *Annual Review of Microbiology*, *67*(1), 499-518. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155626>

- Bosch, T. C. G., & McFall-Ngai, M. J. (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology (Jena, Germany)*, 114(4), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2011.04.001>
- Bourne, D. G., Garren, M., Work, T. M., Rosenberg, E., Smith, G. W., & Harvell, C. D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in microbiology*, 17(12), 554-562.
- Bourne, D. G., Morrow, K. M., & Webster, N. S. (2016). Insights into the coral microbiome: Underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annual review of microbiology*, 70, 317-340.
- Bourne, D. G., & Munn, C. B. (2005). Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1162-1174. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00793.x>
- Bourne, D. G., & Webster, N. S. (2013). Coral Reef Bacterial Communities. En Eugene Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 163-187). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0\\_48](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0_48)
- Breedy, O., & Guzman, H. M. (2002). A revision of the genus *Pacifigorgia* (Coelenterata: Octocorallia: Gorgoniidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115(4), 782-839.
- Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., van Opstal, E. J., & Bordenstein, S. R. (2016). Phylosymbiosis: Relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS biology*, 14(11), e2000225.
- Brück, T. B., Brück, W. M., Santiago-Vázquez, L. Z., McCarthy, P. J., & Kerr, R. G. (2007). Diversity of the Bacterial Communities Associated with the Azooxanthellate Deep Water Octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. *Marine Biotechnology*, 9(5), 561-576. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9009-1>

- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2012). The Roles of Host Evolutionary Relationships (genus: *Nasonia*) and Development in Structuring Microbial Communities. *Evolution*, 66(2), 349-362. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2013). The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6146), 667-669. <https://doi.org/10.1126/science.1240659>
- Burgsdorf, I., Slaby, B. M., Handley, K. M., Haber, M., Blom, J., Marshall, C. W., ... Steindler, L. (2015). Lifestyle Evolution in Cyanobacterial Symbionts of Sponges. *mBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00391-15>
- Cai, L., Tian, R.-M., Zhou, G., Tong, H., Wong, Y. H., Zhang, W., ... Qian, P.-Y. (2018). Exploring coral microbiome assemblages in the South China Sea. *Scientific Reports*, 8(1), 2428. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20515-w>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cavender-Bares, J., Ackerly, D. D., Baum, D. A., & Bazzaz, F. A. (2004). Phylogenetic overdispersion in Floridian oak communities. *The American Naturalist*, 163(6), 823-843. <https://doi.org/10.1086/386375>
- Cavender-Bares, J., Kozak, K. H., Fine, P. V. A., & Kembel, S. W. (2009). The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters*, 12(7), 693-715. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01314.x>

- Ceh, J., Kilburn, M. R., Cliff, J. B., Raina, J.-B., Keulen, M. van, & Bourne, D. G. (2013). Nutrient cycling in early coral life stages: Pocillopora damicornis larvae provide their algal symbiont (Symbiodinium) with nitrogen acquired from bacterial associates. *Ecology and Evolution*, 3(8), 2393-2400. <https://doi.org/10.1002/ece3.642>
- Cesar, H., Burke, L., & Pet-Soede, L. (2003). *The economics of worldwide coral reef degradation*. Cesar environmental economics consulting (CEEC).
- Chen, C.-P., Tseng, C.-H., Chen, C. A., & Tang, S.-L. (2011). The dynamics of microbial partnerships in the coral *Isopora palifera*. *The ISME Journal*, 5(4), 728-740. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.151>
- Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P., & Thompson, F. L. (2011). *Marinobacterium coralli* sp. Nov., isolated from mucus of coral (*Mussismilia hispida*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 1), 60-64. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021105-0>
- Coates, A. G., Jackson, J. B. C., Collins, L. S., Cronin, T. M., Dowsett, H. J., Bybell, L. M., ... Obando, J. A. (1992). Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *GSA Bulletin*, 104(7), 814-828. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1992\)104<0814:COTIOP>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1992)104<0814:COTIOP>2.3.CO;2)
- Colmenares-García S. (2017). *Pairing phylogenetic and metabolic proxy in a rapid radiation: The sea fans *Pacifigorgia* (Gorgoniidae: Octocorallia)* (Tesis de Maestría). Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.
- Connell, J. H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science (New York, N.Y.)*, 199(4335), 1302-1310. <https://doi.org/10.1126/science.199.4335.1302>
- Correa, H., Haltli, B., Duque, C., & Kerr, R. (2013). Bacterial communities of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Microbial Ecology*, 66(4), 972-985. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0267-3>

- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064), 90-93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>
- Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., ... Rodriguez, E. (2007). *The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus*.
- Daly, M., Fautin, D. G., & Cappola, V. A. (2003). Systematics of the Hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139(3), 419-437. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00084.x>
- de Vienne, D. M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E., & Giraud, T. (2013). Cospeciation vs host-shift speciation: Methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *The New Phytologist*, 198(2), 347-385. <https://doi.org/10.1111/nph.12150>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W180-W188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Ding, J.-Y., Shiu, J.-H., Chen, W.-M., Chiang, Y.-R., & Tang, S.-L. (2016). Genomic Insight into the Host–Endosymbiont Relationship of *Endozoicomonas montiporae* CL-33T with its Coral Host. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00251>
- Dittmer, J., van Opstal, E. J., Shropshire, J. D., Bordenstein, S. R., Hurst, G. D. D., & Brucker, R. M. (2016). Disentangling a Holobiont – Recent Advances and Perspectives in *Nasonia* Wasps. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01478>

- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 927-930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>
- Duque-Alarcón, A., Santiago-Vásquez, L. Z., & Kerr, R. G. (2012). A microbial community analysis of the octocoral *Eunicea fusca*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(5). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-11>
- Easson, C. G., & Thacker, R. W. (2014). Phylogenetic signal in the community structure of host-specific microbiomes of tropical marine sponges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00532>
- Eernisse, D. J., & Kluge, A. G. (1993). Taxonomic congruence versus total evidence, and amniote phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology. *Molecular Biology and Evolution*, 10(6), 1170-1195. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040071>
- Esford, L. E., & Lewis, J. C. (1990). Stiffness of Caribbean gorgonians (Coelenterata, Octocorallia) and Ca/Mg content of their axes. *Marine Ecology Progress Series*, 67(2), 189-200.
- Fabricius, K. E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: Review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 50(2), 125-146. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.028>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125(1), 1-15.

- Fiedler, P. C., Philbrick, V., & Chavez, F. P. (1991). Oceanic upwelling and productivity in the eastern tropical Pacific. *Limnology and Oceanography*, 36(8), 1834-1850.  
<https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.8.1834>
- Franco, T., Califano, G., Gonçalves, A. C. S., Cúcio, C., & Costa, R. (2016). Draft Genome Sequence of *Vibrio* sp. Strain Evh12, a Bacterium Retrieved from the Gorgonian Coral *Eunicella verrucosa*. *Genome Announcements*, 4(1), e01729-15.  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01729-15>
- Fraune, S., & Bosch, T. C. G. (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), 13146-13151.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703375104>
- Frazão, B., Martins, R., & Vasconcelos, V. (2010). Are Known Cyanotoxins Involved in the Toxicity of Picoplanktonic and Filamentous North Atlantic Marine Cyanobacteria? *Marine Drugs*, 8(6), 1908-1919. <https://doi.org/10.3390/md8061908>
- Garren, M., & Azam, F. (2012). Corals shed bacteria as a potential mechanism of resilience to organic matter enrichment. *The ISME journal*, 6(6), 1159.
- Gili, J.-M., & Coma, R. (1998). Benthic suspension feeders: Their paramount role in littoral marine food webs. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(8), 316-321.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01365-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01365-2)
- Glasl, B., Herndl, G. J., & Frade, P. R. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *The ISME Journal*, 10(9), 2280-2292. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.9>
- Gray, M. A., Stone, R. P., McLaughlin, M. R., & Kellogg, C. A. (2011). Microbial consortia of gorgonian corals from the Aleutian islands. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 109-120. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01033.x>

- Grigg, R. W. (1977). Population dynamics of two gorgonian corals. *Ecology*, 58(2), 278-290.
- Groussin, M., Mazel, F., Sanders, J. G., Smillie, C. S., Lavergne, S., Thuiller, W., & Alm, E. J. (2017). Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nature Communications*, 8, ncomms14319.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms14319>
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R. D., & Ainsworth, T. D. (2016). Defining the core microbiome in corals' microbial soup. *Trends in microbiology*.
- Hewson, I., Brown, J. M., Burge, C. A., Couch, C. S., LaBarre, B. A., Mouchka, M. E., ... Harvell, C. D. (2012). Description of viral assemblages associated with the *Gorgonia ventalina* holobiont. *Coral Reefs*, 31(2), 487-491.
- Hird, S. M. (2017). Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00725>
- Hird, S. M. (2019). Microbiomes, Community Ecology, and the Comparative Method. *mSystems*, 4(3), e00112-19.
- Holm, J. B., & Heidelberg, K. B. (2016). Microbiomes of *Muricea californica* and *M. fruticosa*: Comparative Analyses of Two Co-occurring Eastern Pacific Octocorals. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00917>
- Horner-Devine, M. C., & Bohannan, B. J. M. (2006). Phylogenetic Clustering and Overdispersion in Bacterial Communities. *Ecology*, 87(sp7), S100-S108.  
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[100:PCAOIB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[100:PCAOIB]2.0.CO;2)
- Hughes, T. P., Bellwood, D. R., & Connolly, S. R. (2002). Biodiversity hotspots, centres of endemism, and the conservation of coral reefs. *Ecology Letters*, 5(6), 775-784.
- Jackson, J. B. C. (1977). Competition on Marine Hard Substrata: The Adaptive Significance of Solitary and Colonial Strategies. *The American Naturalist*, 111(980), 743-767.



- Kang, H., Kim, H., Nam, I.-Y., Joung, Y., Jang, T. Y., & Joh, K. (2017). *Thalassotalea litorea* sp. Nov., isolated from seashore sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2268-2273. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001938>
- Keller-Costa, T., Silva, R., Lago-Lestón, A., & Costa, R. (2016). Genomic Insights into *Aquimarina* sp. Strain EL33, a Bacterial Symbiont of the Gorgonian Coral *Eunicella labiata*. *Genome Announcements*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00855-16>
- Kellogg, C. A., Ross, S. W., & Brooke, S. D. (2016). Bacterial community diversity of the deep-sea octocoral *Paramuricea placomus*. *PeerJ*, 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2529>
- Kimes, N. E., Van Nostrand, J. D., Weil, E., Zhou, J., & Morris, P. J. (2010). Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. *Environmental Microbiology*, 12(2), 541-556. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02113.x>
- Knowlton, N., & Rohwer, F. (2003). Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: The host as a habitat. *The American Naturalist*, 162(4 Suppl), S51-62. <https://doi.org/10.1086/378684>
- Kohl, K. D., Varner, J., Wilkening, J. L., & Dearing, M. D. (s. f.). Gut microbial communities of American pikas (*Ochotona princeps*): Evidence for phyllosymbiosis and adaptations to novel diets. *Journal of Animal Ecology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12692>
- Kvennefors, E. C. E., Sampayo, E., Ridgway, T., Barnes, A. C., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Bacterial Communities of Two Ubiquitous Great Barrier Reef Corals Reveals Both Site- and Species-Specificity of Common Bacterial Associates. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010401>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using

16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814-821.

<https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F. L., Faury, N., Gay, M., Swings, J., & Saulnier, D.

(2005). *Vibrio gigantis* sp. Nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters

(*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

55(Pt 6), 2251-2255. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63666-0>

Legendre, P., & Legendre, L. F. J. (2012). *Numerical Ecology*. Elsevier.

Leigh, B. A., Bordenstein, S. R., Brooks, A. W., Mikaelyan, A., & Bordenstein, S. R. (2018).

Finer-Scale Phylosymbiosis: Insights from Insect Viromes. *MSystems*, 3(6), e00131-18.

<https://doi.org/10.1128/mSystems.00131-18>

Littman, R. A., Willis, B. L., Pfeffer, C., & Bourne, D. G. (2009). Diversities of coral-associated

bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great

Barrier Reef. *FEMS microbiology ecology*, 68(2), 152-163.

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and

dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.

<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Matcher, G. F., Waterworth, S. C., Walmsley, T. A., Matsatsa, T., Parker-Nance, S., Davies-

Coleman, M. T., & Dorrington, R. A. (2017). Keeping it in the family: Coevolution of

latrunculid sponges and their dominant bacterial symbionts. *MicrobiologyOpen*, 6(2),

n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mbo3.417>

Mazel, F., Davis, K. M., Loudon, A., Kwong, W. K., Groussin, M., & Parfrey, L. W. (2018). Is

Host Filtering the Main Driver of Phylosymbiosis across the Tree of Life? *MSystems*,

3(5), e00097-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00097-18>

- McCauley, E. P., Haltli, B., Correa, H., & Kerr, R. G. (2016). Spatial and temporal investigation of the microbiome of the Caribbean octocoral *Erythropodium caribaeorum*. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw147>
- McDevitt-Irwin, J. M., Baum, J. K., Garren, M., & Vega Thurber, R. L. (2017). Responses of Coral-Associated Bacterial Communities to Local and Global Stressors. *Frontiers in Marine Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00262>
- McFadden, C. S., Sánchez, J. A., & France, S. C. (2010). *Molecular phylogenetic insights into the evolution of Octocorallia: A review*. Oxford University Press.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., ... Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(9), 3229-3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Moberg, F., & Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological economics*, *29*(2), 215-233.
- Moeller, A. H., Li, Y., Ngole, E. M., Ahuka-Mundeke, S., Lonsdorf, E. V., Pusey, A. E., ... Ochman, H. (2014). Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(46), 16431-16435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419136111>
- Montes, C., Cardona, A., McFadden, R., Morón, S. E., Silva, C. A., Restrepo-Moreno, S., ... Flores, J. A. (2012). Evidence for middle Eocene and younger land emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure. *GSA Bulletin*, *124*(5-6), 780-799. <https://doi.org/10.1130/B30528.1>

- Morrow, K. M., Moss, A. G., Chadwick, N. E., & Liles, M. R. (2012). Bacterial Associates of Two Caribbean Coral Species Reveal Species-Specific Distribution and Geographic Variability. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(18), 6438-6449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01162-12>
- Mulhall, M. (2008). Saving the Rainforest of the Sea: An Analysis of International Efforts to Conserve Coral Reefs. *Duke Envtl. L. & Pol'y F.*, *19*, 321.
- Münkemüller, T., Lavergne, S., Bzeznik, B., Dray, S., Jombart, T., Schiffrers, K., & Thuiller, W. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution*, *3*(4), 743-756. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00196.x>
- Neave, M. J., Apprill, A., Ferrier-Pagès, C., & Voolstra, C. R. (2016). Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(19), 8315-8324. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7777-0>
- Neave, M. J., Rachmawati, R., Xun, L., Michell, C. T., Bourne, D. G., Apprill, A., & Voolstra, C. R. (2017). Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas* endosymbionts across global scales. *The ISME Journal*, *11*(1), 186-200. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.95>
- Odum, H. T., & Odum, E. P. (1955). Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Eniwetok Atoll. *Ecological Monographs*, *25*(3), 291-320.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, *30*(21), 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Penn, K., Wu, D., Eisen, J. A., & Ward, N. (2006). Characterization of Bacterial Communities Associated with Deep-Sea Corals on Gulf of Alaska Seamounts. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 72(2), 1680-1683. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1680-1683.2006>

- Pike, R. E., Haltli, B., & Kerr, R. G. (2013). Description of *Endozoicomonas euniceicola* sp. Nov. And *Endozoicomonas gorgoniicola* sp. Nov., bacteria isolated from the octocorals *Eunicea fusca* and *Plexaura* sp., and an emended description of the genus *Endozoicomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 11), 4294-4302. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051490-0>
- Polidoro, B. A., Brooks, T., Carpenter, K. E., Edgar, G. J., Henderson, S., Sanciangco, J., & Robertson, D. R. (2012). Patterns of extinction risk and threat for marine vertebrates and habitat-forming species in the Tropical Eastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 448, 93-104.
- Pollock, F. J., McMinds, R., Smith, S., Bourne, D. G., Willis, B. L., Medina, M., ... Zaneveld, J. R. (2018). Coral-associated bacteria demonstrate phyllosymbiosis and cophylogeny. *Nature Communications*, 9(1), 4921. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07275-x>
- Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A., & Lundberg, P. (2012). Phylogenetic analysis suggests that habitat filtering is structuring marine bacterial communities across the globe. *Microbial Ecology*, 64(1), 8-17. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-0005-7>
- Prada, C., & Hellberg, M. E. (2013). Long prereproductive selection and divergence by depth in a Caribbean candelabrum coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 3961-3966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208931110>
- Quintanilla, E., Ramírez-Portilla, C., Adu-Oppong, B., Walljasper, G., Glaeser, S. P., Wilke, T., ... Sánchez, J. A. (2018). Local confinement of disease-related microbiome facilitates recovery of gorgonian sea fans from necrotic-patch disease. *Scientific Reports*, 8(1), 14636. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33007-8>

- Revell, L. J. (2012). phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 217-223.  
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- Rivière, M. L., Garrabou, J., & Bally, M. (2015). Evidence for host specificity among dominant bacterial symbionts in temperate gorgonian corals. *Coral Reefs*, 34(4), 1087-1098.  
<https://doi.org/10.1007/s00338-015-1334-7>
- Rivière, M. L., Roumagnac, M., Garrabou, J., & Bally, M. (2013). Transient Shifts in Bacterial Communities Associated with the Temperate Gorgonian *Paramuricea clavata* in the Northwestern Mediterranean Sea. *PLOS ONE*, 8(2), e57385.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057385>
- Roberts, C. M., McClean, C. J., Veron, J. E., Hawkins, J. P., Allen, G. R., McAllister, D. E., ... Wells, F. (2002). Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science*, 295(5558), 1280-1284.
- Robertson, V., Haltli, B., McCauley, E. P., Overy, D. P., & Kerr, R. G. (2016). Highly Variable Bacterial Communities Associated with the Octocoral *Antilloporia elisabethae*. *Microorganisms*, 4(3), 23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030023>
- Robinson, D. F., & Foulds, L. R. (1981). Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences*, 53(1), 131-147. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(81\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90043-2)
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F., & Knowlton, N. (2002). Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243, 1-10.

- Rosenberg, E, Sharon, G., & Zilber-Rosenberg, I. (2009). The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental Microbiology*, 11(12), 2959–62. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01995.x>
- Rosenberg, Eugene, Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(5), 355-362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rosenberg, Eugene, Sharon, G., Atad, I., & Zilber-Rosenberg, I. (2010). The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2(4), 500-506. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00177.x>
- Rua, C. P. J., Trindade-Silva, A. E., Appolinario, L. R., Venas, T. M., Garcia, G. D., Carvalho, L. S., ... Thompson, F. (2014). Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *PeerJ*, 2, e419. <https://doi.org/10.7717/peerj.419>
- Rypien, K. L., Ward, J. R., & Azam, F. (2010). Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 12(1), 28-39. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02027.x>
- Sachs, J. L., Skophammer, R. G., & Regus, J. U. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 2), 10800-10807. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100304108>
- Sánchez. (2016). Diversity and Evolution of Octocoral Animal Forests at Both Sides of Tropical America. En S. Rossi, L. Bramanti, A. Gori, & C. Orejas Saco del Valle (Eds.), *Marine Animal Forests: The Ecology of Benthic Biodiversity Hotspots* (pp. 1-33). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5\\_39-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5_39-1)

- Sanchez, J. A. (2004). Evolution and dynamics of branching colonial form in marine modular cnidarians: Gorgonian octocorals. En *Coelenterate Biology 2003* (pp. 283-290). Springer.
- Sánchez, J. A. (2013). Remarkable specialization in Eastern Pacific sea fan ectoparasites (Neosimnia). *Coral Reefs*, 32(3), 891-891. <https://doi.org/10.1007/s00338-013-1049-6>
- Sánchez, J. A., Dueñas, L. F., Rowley, S. J., Gonzalez-Zapata, F. L., Vergara, D. C., Montaña-Salazar, S. M., ... Pérez, C. D. (2019). Gorgonian Corals. En Y. Loya, K. A. Puglise, & T. C. L. Bridge (Eds.), *Mesophotic Coral Ecosystems* (pp. 729-747). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0\\_39](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_39)
- Sánchez, J. A., Fuentes-Pardo, A. P., Almhain, Í. N., Ardila-Espitia, N. E., Cantera-Kintz, J., & Forero-Shelton, M. (2016). The masquerade game: Marine mimicry adaptation between egg-cowries and octocorals. *PeerJ*, 4, e2051. <https://doi.org/10.7717/peerj.2051>
- Sánchez, J. A., Gómez, C. E., Escobar, D., & Dueñas, L. F. (2011). *Diversidad, abundancia y amenazas de los octocorales de la isla Malpelo, Pacífico Oriental Tropical, Colombia*.
- Sanders, J. G., Powell, S., Kronauer, D. J. C., Vasconcelos, H. L., Frederickson, M. E., & Pierce, N. E. (2014). Stability and phylogenetic correlation in gut microbiota: Lessons from ants and apes. *Molecular Ecology*, 23(6), 1268-1283. <https://doi.org/10.1111/mec.12611>
- Schluter, D. (2000). *The ecology of adaptive radiation*. OUP Oxford.
- Schöttner, S., Hoffmann, F., Cárdenas, P., Rapp, H. T., Boetius, A., & Ramette, A. (2013). Relationships between Host Phylogeny, Host Type and Bacterial Community Diversity in Cold-Water Coral Reef Sponges. *PLOS ONE*, 8(2), e55505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055505>



- Sebens, K. P. (1994). Biodiversity of coral reefs: What are we losing and why? *American zoologist*, 34(1), 115-133.
- Sharp, K. H., Sneed, J. M., Ritchie, K. B., Mcdaniel, L., & Paul, V. J. (2015). Induction of larval settlement in the reef coral *Porites astreoides* by a cultivated marine *Roseobacter* strain. *The Biological Bulletin*, 228(2), 98-107.
- Sharp, Koty H, Distel, D., & Paul, V. J. (2012). Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *The ISME Journal*, 6(4), 790-801. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.144>
- Sheppard, C., Davy, S. K., & Pilling, G. M. (2009). *The biology of coral reefs*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Sheu, D.-S., Sheu, S.-Y., Xie, P.-B., Tang, S.-L., & Chen, W.-M. (2018). *Thalassotalea coralli* sp. Nov., isolated from the torch coral *Euphyllia glabrescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 185-191. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002478>
- Shirur, K. P., Jackson, C. R., & Goulet, T. L. (2016). Lesion recovery and the bacterial microbiome in two Caribbean gorgonian corals. *Marine Biology*, 163(12), 238. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-3008-6>
- Silveira, C. B., Cavalcanti, G. S., Walter, J. M., Silva-Lima, A. W., Dinsdale, E. A., Bourne, D. G., ... Thompson, F. L. (2017). Microbial processes driving coral reef organic carbon flow. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(4), 575-595. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux018>
- Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J. P., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., ... Göker, M. (2017). Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *The ISME Journal*, 11(6), 1483-1499. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.198>

- Soler-Hurtado, M. del M., Machordom, A., Muñoz, J., & López-González, P. J. (2016). New records of the genera *Leptogorgia*, *Pacifigorgia* and *Eugorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae) from Ecuador, with a description of a new species. *Scientia Marina*, *80*(3), 369-394. <https://doi.org/10.3989/scimar.04392.14A>
- Soler-Hurtado, M. M., López-González, P. J., & Machordom, A. (2017). Molecular phylogenetic relationships reveal contrasting evolutionary patterns in Gorgoniidae (Octocorallia) in the Eastern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *111*, 219-230. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.019>
- Stegen, J. C., Lin, X., Konopka, A. E., & Fredrickson, J. K. (2012). Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *The ISME Journal*, *6*(9), 1653-1664. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.22>
- Steinert, G., Rohde, S., Janussen, D., Blaurock, C., & Schupp, P. J. (2017). Host-specific assembly of sponge-associated prokaryotes at high taxonomic ranks. *Scientific Reports*, *7*(1), 2542. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02656-6>
- Summers, S., Freckelton, M. L., Nedved, B. T., Rice, S. A., & Hadfield, M. G. (2018). Full-Genome Sequence of *Thalassotalea euphylliae* H1, Isolated from a *Montipora capitata* Coral Located in Hawai'i. *Microbiology Resource Announcements*, *7*(20), e01244-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01244-18>
- Sunagawa, S., Woodley, C. M., & Medina, M. (2010). Threatened Corals Provide Underexplored Microbial Habitats. *PLOS ONE*, *5*(3), e9554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009554>
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., ... Bordenstein, S. R. (2016). Getting the Hologenome Concept Right: An Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *MSystems*, *1*(2), e00028-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16>

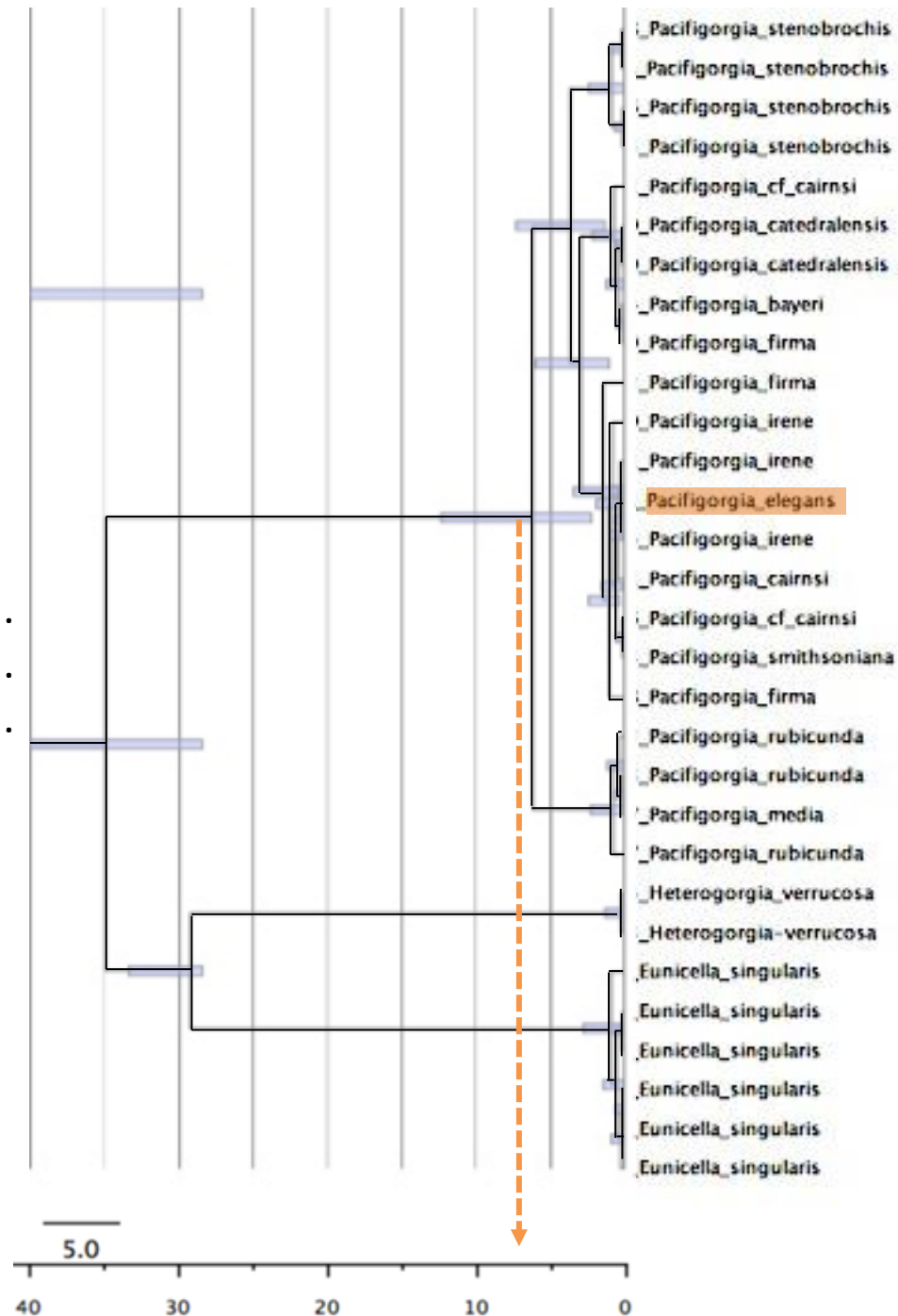
- Tout, J., Jeffries, T. C., Webster, N. S., Stocker, R., Ralph, P. J., & Seymour, J. R. (2014). Variability in Microbial Community Composition and Function Between Different Niches Within a Coral Reef. *Microbial Ecology*, 67(3), 540-552. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0362-5>
- van de Water, J. A. J. M., Allemand, D., & Ferrier-Pagès, C. (2018). Host-microbe interactions in octocoral holobionts—Recent advances and perspectives. *Microbiome*, 6, 64. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0431-6>
- van de Water, J. A. J. M., Melkonian, R., Voolstra, C. R., Junca, H., Beraud, E., Allemand, D., & Ferrier-Pagès, C. (2017). Comparative Assessment of Mediterranean Gorgonian-Associated Microbial Communities Reveals Conserved Core and Locally Variant Bacteria. *Microbial Ecology*, 73(2), 466-478. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0858-x>
- van de Water, J. A. J. M., Voolstra, C. R., Rottier, C., Cocito, S., Peirano, A., Allemand, D., & Ferrier-Pagès, C. (2018). Seasonal Stability in the Microbiomes of Temperate Gorgonians and the Red Coral *Corallium rubrum* Across the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 75(1), 274-288. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1006-y>
- Vargas, S., Breedy, O., & Guzman, H. M. (2010). The phylogeny of *Pacifigorgia* (Coelenterata, Octocorallia, Gorgoniidae): A case study of the use of continuous characters in the systematics of the Octocorallia. *Zoosystema*, 32(1), 5-18. <https://doi.org/10.5252/z2010n1a1>
- Vargas, S., Guzman, H. M., & Breedy, O. (2008). Distribution patterns of the genus *Pacifigorgia* (Octocorallia: Gorgoniidae): track compatibility analysis and parsimony analysis of endemism. *Journal of Biogeography*, 35(2), 241-247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01810.x>

- Velásquez-Puentes, F. J., & Bacon, C. D. (2016). Una introducción a la estructura filogenética de comunidades: Un caso de estudio en palmas de Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 51(2), 126-140.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Huete-Stauffer, C., Pruzzo, C., & Cerrano, C. (2013). 16SrDNA Pyrosequencing of the Mediterranean Gorgonian *Paramuricea clavata* Reveals a Link among Alterations in Bacterial Holobiont Members, Anthropogenic Influence and Disease Outbreaks. *PLOS ONE*, 8(6), e67745.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067745>
- Webb, C. O., Ackerly, D. D., McPeck, M. A., & Donoghue, M. J. (2002). Phylogenies and Community Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 475-505.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150448>
- Webster, N. S., & Reusch, T. B. H. (2017). Microbial contributions to the persistence of coral reefs. *The ISME Journal*, 11(10), 2167-2174. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.66>
- Wessels, W., Sprungala, S., Watson, S.-A., Miller, D. J., & Bourne, D. G. (2017). The microbiome of the octocoral *Lobophytum pauciflorum*: Minor differences between sexes and resilience to short-term stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5).  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix013>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Recuperado de <https://www.springer.com/gp/book/9780387981413>
- Yang, C.-S., Chen, M.-H., Arun, A. B., Chen, C. A., Wang, J.-T., & Chen, W.-M. (2010). *Endozoicomonas montiporae* sp. Nov., isolated from the encrusting pore coral *Montipora aequituberculata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1158-1162. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014357-0>

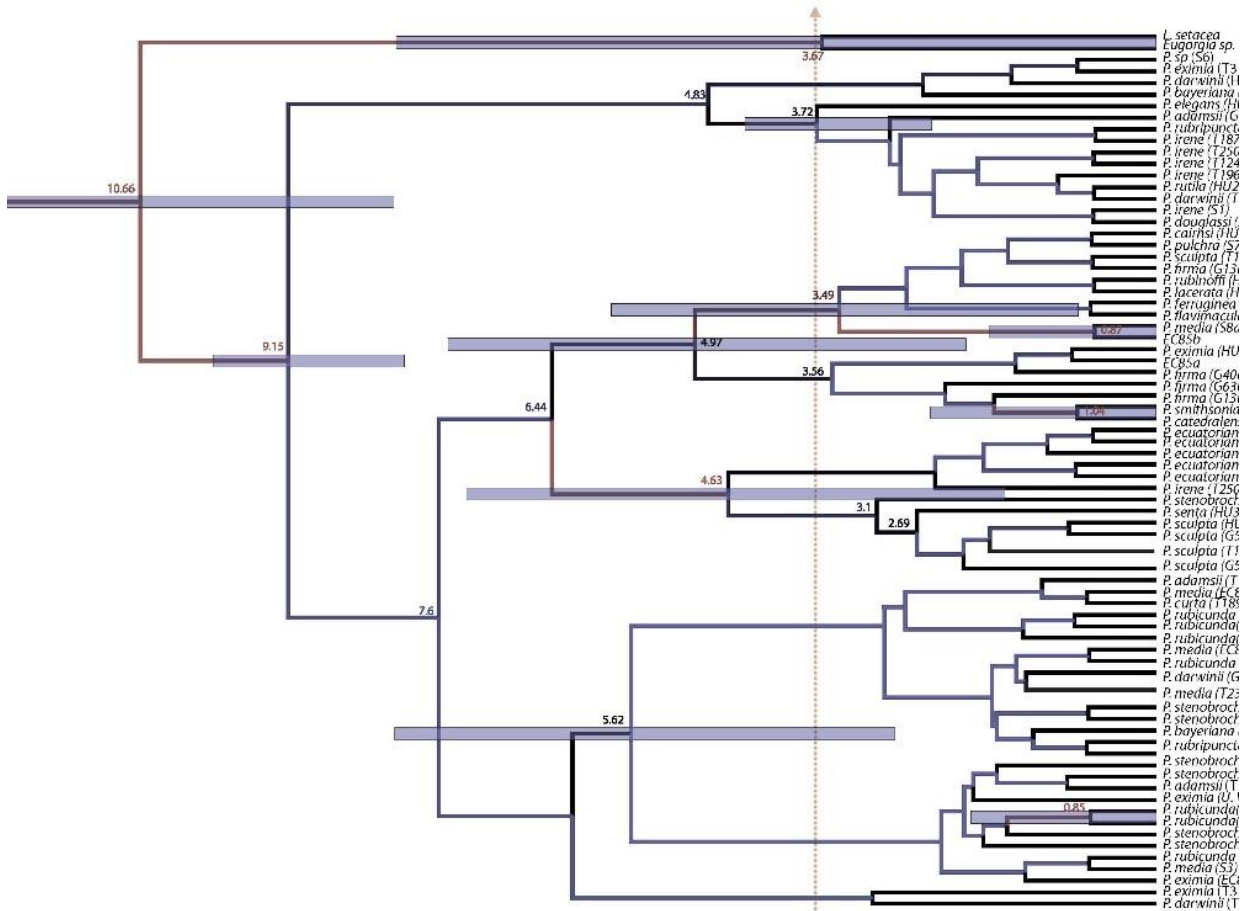
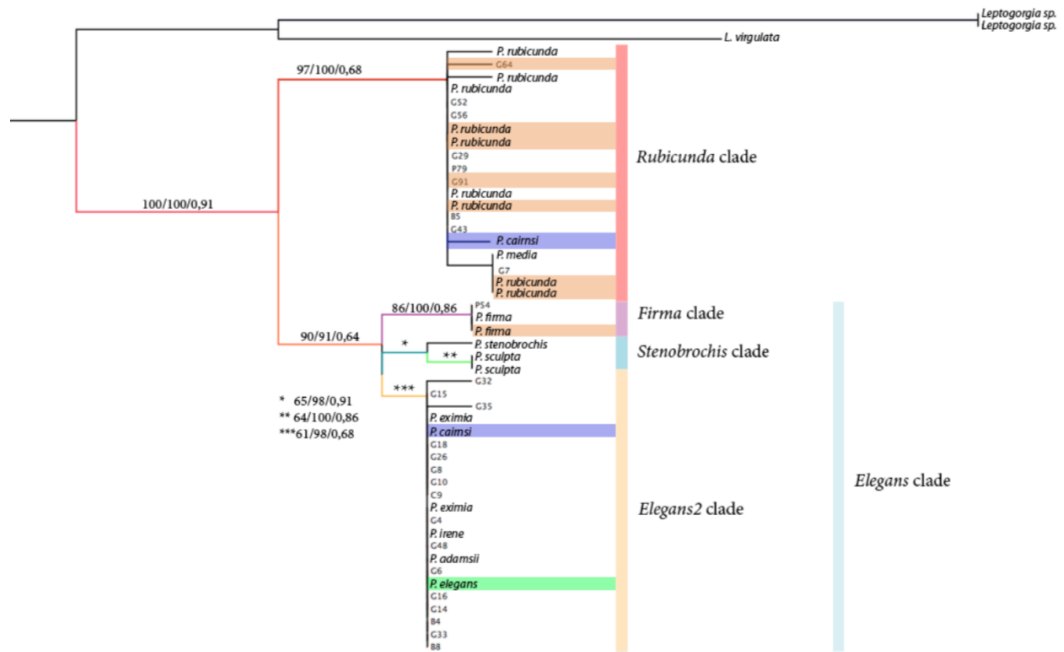
## 11. ANEXOS

### ANEXO A

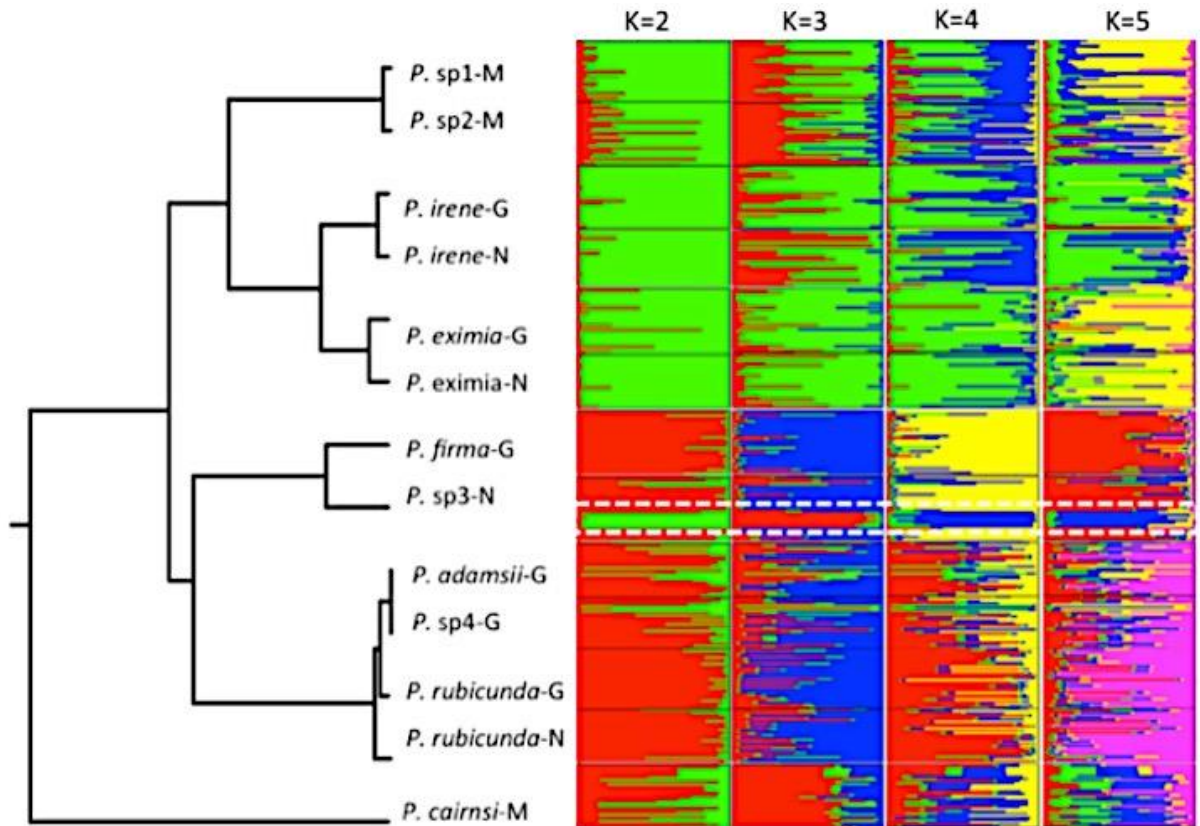
Filogenia de *Pacifigorgia* realizada con mt-MutS (msh1) por el grupo de investigación BIOMMMAR, realizada por González-Zapata F. (Datos no publicados).



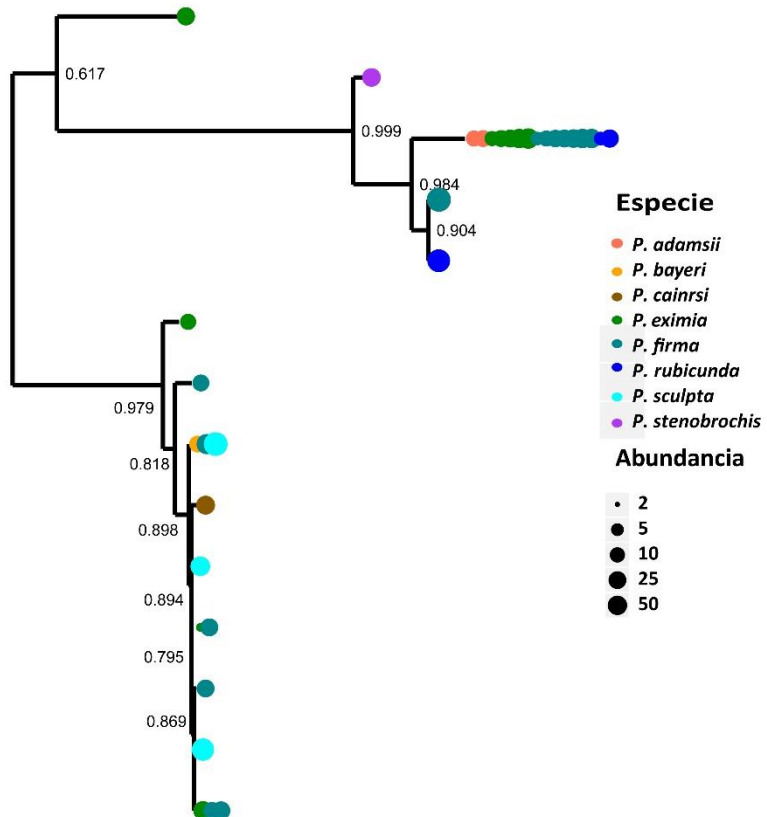
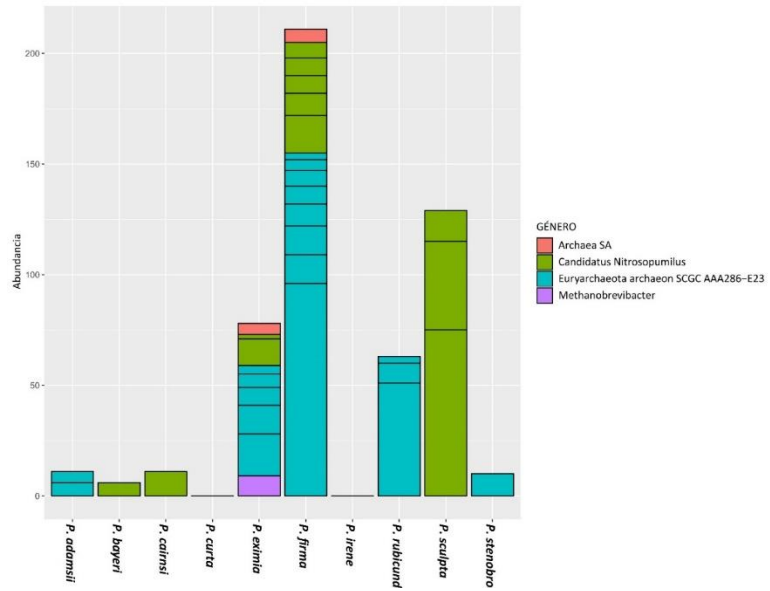
Filogenia realizada con mt-MutS, dentro del grupo de investigación BIOMMAR. No se obtuvo resolución a nivel de especie. Realizada por Tabima J. (Datos sin publicar)



Dendrograma realizado con microsatélites dentro del grupo de investigación BIOMMAR. No se obtuvo resolución a nivel de especie, además hay mezcla de especies, donde solo hubo amplificación para 9 especies. Realizada por Casas F. (Datos sin publicar)



**ANEXO B** Dominio Archaea con su abundancia en las 10 especies de *Pacifigorgia*, asimismo se muestra una filogenia en la parte inferior de los ASV del dominio.





**ANEXO C** Tabla de funciones metabólicas diferentes significativamente entre las especies de *Pacifigorgia*

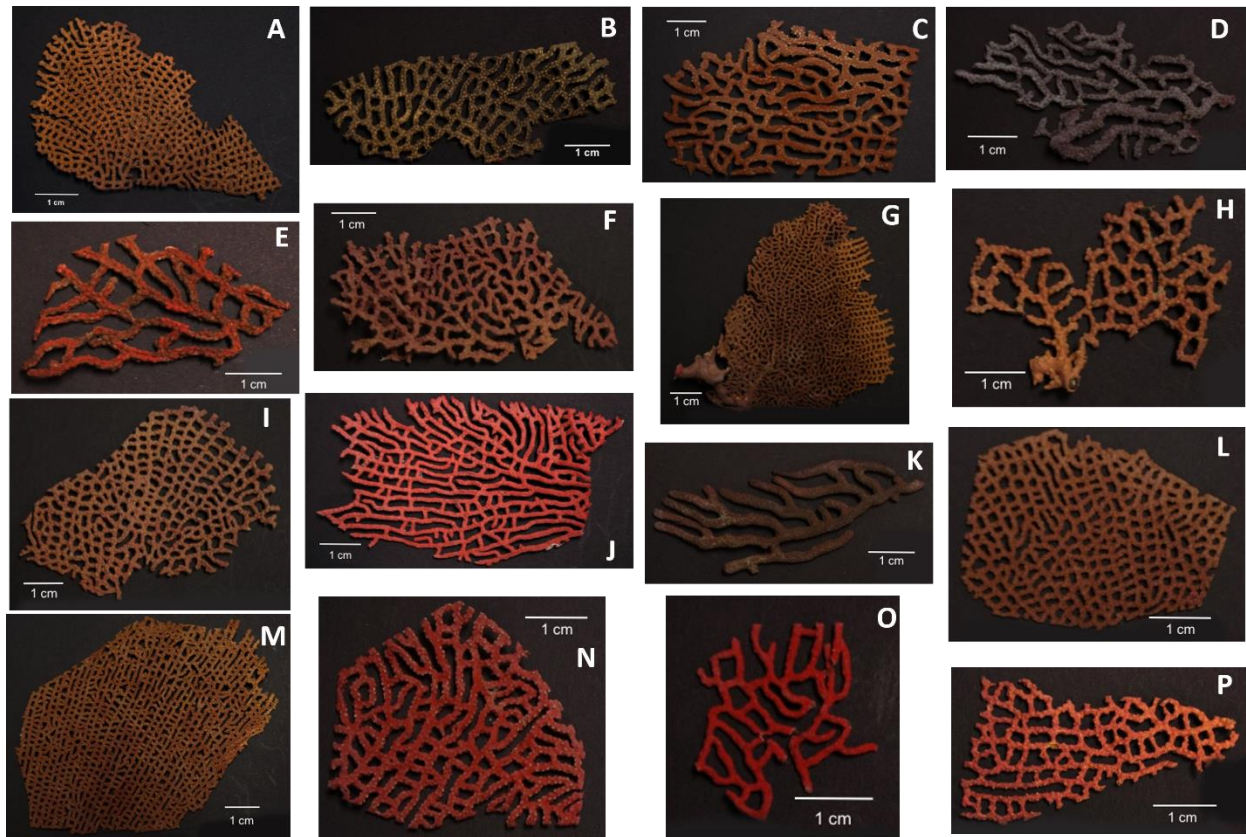
Muestra	Metab_2os	Metb_aa	Met_carboh	Rutasfijcarb	Quimiotaxis	Motilidad	Secrecion	Prod_toxi	ansamycina	Acido_grasos	Glicerolip	Can_ionic
sample-S2	929	4371	1945	23767	4449	16884	22664	1034	1224	13966	7025	200
sample-S4	2824	12902	5421	52472	20784	63555	41884	2627	2765	29808	15272	975
sample-S1	2390	7855	3200	34326	31056	74090	37112	1933	1358	18257	10400	245
sample-S5	12220	33651	9489	151609	198253	440070	177576	8293	4265	74496	41975	181
sample-S3	14173	38197	10540	172659	225698	500924	200618	9657	4948	84406	47698	341
sample-S23	4161	12576	3962	45331	28747	68664	29880	2539	2172	23809	13812	665
sample-S24	2084	6953	3471	23202	13655	36350	16755	1663	1407	14185	8648	365
sample-S25	7789	23833	11373	97772	63905	157447	73812	5045	4901	52458	30575	1101
sample-S26	11651	37803	18116	145668	109786	275300	120269	7673	6440	76041	44039	2193
sample-S27	9678	29849	15162	114163	73928	188885	89920	7012	5994	62165	35776	2233
sample-S51	1376	4245	1789	28608	20310	44885	33224	3487	2953	9389	16308	2219
sample-S52	5624	15052	3996	79617	93334	205336	96283	6206	4295	33933	30669	2379
sample-S53	2860	7688	2244	49930	46468	101532	58488	4881	4043	17860	24264	2939
sample-S54	12093	49019	15821	199175	131041	289804	134622	13946	13542	89078	69791	6114
sample-S55	1635	4831	1895	46517	22116	51376	57210	7641	7086	10164	37074	6603
sample-S63	4313	12071	3516	53093	68042	152484	61775	2975	1550	26409	15134	91
sample-S64	3139	9020	3187	39061	46186	104541	43319	2503	1447	19337	11802	236
sample-S65	2969	8819	3077	37349	43126	97684	40824	2269	1212	18854	10948	209
sample-S66	3652	11376	4949	43806	48488	116439	47251	2716	1421	22840	13849	360
sample-S11	1571	5398	2105	32587	16071	41122	31175	2845	2881	13384	15812	2038
sample-S10	5349	15233	4873	67672	77381	174149	70860	4195	2678	32695	20203	788
sample-S6	2863	9434	5176	39015	26536	65249	33382	3262	2338	19795	13575	717
sample-S7	11177	33572	11452	143863	169168	381539	156621	8605	4997	71090	41444	804
sample-S12	14314	38700	12590	176197	216825	485038	195921	11480	6114	85642	50375	1482
sample-S13	10209	29365	9624	127051	154386	348417	139778	7466	4222	63488	36373	771
sample-S9	15904	50736	17767	212705	195917	449772	196333	10943	8741	108749	62528	2049
sample-S8	15996	52864	14138	218437	266414	592720	235070	13642	9132	101583	65533	1573
sample-S36	12884	37877	12333	161952	183754	422534	172184	8772	5500	81494	45887	808
sample-S37	17562	50416	16672	222064	242845	548838	231897	11500	7327	110984	62047	1294
sample-S38	21088	65693	21971	280873	265303	614332	266387	14043	11026	142425	79717	2332
sample-S39	14285	43460	15393	184382	192816	448630	186963	9738	6465	94295	52210	1315
sample-S40	8614	25466	8067	108999	126965	284978	118789	5820	3614	55235	32372	224
sample-S41	18846	54484	22630	233947	163072	396341	178965	11023	10600	120284	68024	2996
sample-S42	9663	28182	9343	121590	143526	325739	132915	6748	3890	60724	34705	584
sample-S43	11573	31322	10586	141424	172887	387029	153778	9365	4964	69422	40147	1295
sample-S44	1951	7366	3281	29791	16350	43783	24493	1730	1791	17170	9986	671
sample-S45	2378	7931	3734	29934	26633	67689	28555	2295	1628	16077	9591	717
sample-S47	8157	27109	11464	109335	48495	133848	75986	4510	5230	57682	30839	1727
sample-S48	2404	8550	4221	34251	13042	38182	26716	2022	1985	18527	11928	581
sample-S15	5572	15457	6742	65983	50619	121025	54634	4609	3451	31441	21059	1703
sample-S16	7574	22469	7400	108204	97390	235753	101439	4615	5050	58498	31690	555
sample-S14	12497	39995	16729	168205	148221	350535	157612	9360	6679	87628	49149	1839
sample-S49	6695	23176	10387	83376	63364	164632	70403	4977	3918	44471	25688	1496
sample-S28	9749	31731	16055	121319	53847	151830	80974	6129	6562	65995	39459	1952
sample-S76	12610	40666	14533	167658	145275	344828	153110	8403	6645	86879	47872	1561
sample-S75	11323	33777	12448	143934	114232	268176	119862	6790	6053	72688	40670	1365
sample-S77	1428	4454	2490	19662	13833	34378	19672	1916	1051	9834	6364	490
sample-S35	4143	18705	9667	59977	32198	89364	48409	3754	4012	38165	22105	1272
sample-S78	658	2817	1553	9282	5719	15782	7910	642	563	5494	3514	193
sample-S29	931	3935	2260	12318	7587	21767	10423	901	780	7802	4795	252
sample-S30	13995	39162	11355	173805	224661	500219	201262	9712	5095	85842	48597	362
sample-S31	7192	22684	12049	84385	35454	109809	52706	3860	4167	44915	26666	1698
sample-S34	4532	13661	4965	56661	57466	131939	56044	2966	2141	28763	16538	352
sample-S80	11767	33868	10023	148341	184629	413045	165367	8512	4844	73349	41535	684
sample-S79	21648	72659	28970	302091	259301	630642	278711	15657	12340	157389	85927	3498
sample-S32	17863	47131	14705	218518	262377	590086	237459	12069	7209	108441	60574	881
sample-S82	17076	46430	16513	206854	200425	455506	196970	9838	7305	103282	57240	1307
sample-S81	17273	48223	14846	214567	245709	551199	228797	11175	6889	106818	59136	803
sample-S33	7832	21911	6743	95735	80525	188362	84241	5545	4632	48001	28604	1237
sample-S83	7584	17363	8338	95906	89251	214006	91370	8246	5362	44967	28940	3189
sample-S21	6801	18050	7378	70680	40996	105085	48244	3690	3456	34789	20785	1398
sample-S18	10282	29609	11890	129814	90788	213366	97227	5874	5834	64267	35427	1775
sample-S20	12585	35137	10546	156809	201659	447566	180082	8659	4709	77797	44144	315
sample-S22	6960	21094	6939	88221	104786	235823	98073	4998	2999	45610	26699	203
sample-S19	2243	9626	5837	28289	19056	55620	24738	1992	1509	17526	11613	514

Muestra	Sint_lipid	Cof_vita	Xenobiot	Met_N	Peptidogl	Foto	Prot_ant_foto	Prot_foto	Clorofila	Transd_señal	Met_S	Tetraciclina	Alcaloides	VitaB6
sample-S2	17467	3329	2864	11269	18433	21777	4526	27746	29110	8673	5209	3988	2390	4141
sample-S4	38769	8660	7120	33110	34244	38416	7063	47030	56658	24226	14509	8676	6133	9253
sample-S1	27244	6807	7263	24999	21571	23515	4985	29822	43518	17814	11163	5220	3249	5952
sample-S5	122979	33054	37155	122490	79511	44368	3449	52010	165601	83106	53812	20994	12829	24883
sample-S3	139269	37735	41667	140704	90075	47021	2715	54552	185752	94068	60765	23724	14606	28286
sample-S23	34319	8573	9032	35259	25946	20208	3428	25129	48512	18959	14035	6806	5681	7430
sample-S24	19198	5415	5809	19508	14788	24989	6659	32772	37075	11807	9239	4359	3213	4655
sample-S25	75315	19848	21863	70080	54973	62030	13938	82311	127818	45005	31414	15180	11316	15792
sample-S26	114031	30519	34267	109479	82249	92617	16924	115416	178491	75100	49056	21859	16345	24284
sample-S27	89627	24374	25883	87779	61097	63082	11072	80139	136673	56366	37457	16816	13886	18615
sample-S51	20599	3964	3692	19610	12295	27607	504	28527	22771	14218	6489	2733	1866	3407
sample-S52	63162	15220	16705	61464	36392	40795	643	43309	76632	42196	24616	9536	5747	11358
sample-S53	37046	8179	7945	36207	20074	37662	103	38657	40041	24667	12911	5147	3257	5959
sample-S54	145340	35830	39226	156251	93303	80393	448	84197	183569	67637	54631	23552	20392	32577
sample-S55	34056	5066	4384	27989	11986	70307	978	71866	26453	25334	7443	3047	2117	3797
sample-S63	43279	11453	13110	42640	28709	20611	2147	24447	62104	29344	19275	7600	4594	8907
sample-S64	30932	8335	8953	31428	22450	17769	2118	21058	46338	21692	13987	5689	3580	6706
sample-S65	30161	7975	9376	29949	20508	17197	2201	20553	44940	20132	13749	5402	3490	6404
sample-S66	36551	9607	11837	35470	26143	35495	6771	43831	62856	26379	16808	6962	4214	7872
sample-S11	23403	4156	4001	20227	14574	27341	2724	30983	30138	14728	6999	4080	2869	4588
sample-S10	52780	14462	14457	55302	35323	23526	2251	27918	71793	35338	22730	9229	6180	10942
sample-S6	28438	7786	6717	29657	25798	23362	4403	28709	45143	19916	13149	5737	4502	7125
sample-S7	113751	30819	32772	114265	79889	57759	7533	69158	160526	79425	50930	20252	13178	24258
sample-S12	136924	40032	38144	143223	95944	60619	6786	72265	187585	97723	62054	24798	16083	29715
sample-S13	101744	27931	29413	102480	68032	48214	5939	57724	140754	70232	45146	18149	11554	21226
sample-S9	165747	44460	46559	161816	112639	76155	7174	90022	214459	103925	70328	30152	23421	34683
sample-S8	167493	45150	46448	174660	131989	54253	2053	61643	220471	113287	69836	27707	18508	38352
sample-S36	129860	35108	37916	126916	85940	56772	6011	67783	176619	87505	56111	22971	15367	26434
sample-S37	176824	47000	53110	174564	116457	69955	6121	82976	235650	113954	75687	30613	21601	36382
sample-S38	220229	56788	61686	212810	148590	100367	9557	118509	290552	136186	91732	39324	28396	45830
sample-S39	148130	38389	42981	143675	99309	75158	9298	90094	202873	96902	63081	26351	17856	30571
sample-S40	87799	24071	26264	86517	59854	52113	10067	65604	131283	57838	39312	16208	10206	18509
sample-S41	182687	45358	52775	168019	119470	86664	8307	107370	251646	101482	69640	31535	26206	36136
sample-S42	97953	26090	29394	97972	64919	45747	5392	54647	136219	65626	42792	17142	11106	20256
sample-S43	110758	31456	30550	115874	74763	48694	5099	57648	150852	76534	49535	19644	12807	23455
sample-S44	23093	5654	4898	20677	17789	21486	4761	27494	34132	14692	9257	5111	3495	5627
sample-S45	23068	7312	5434	24223	18329	22072	5009	28111	35923	18559	11023	4714	3214	5682
sample-S47	81938	20517	23203	75681	59896	51641	7325	63551	112846	42927	31661	15453	13599	17415
sample-S48	24911	5941	5503	22503	23571	30103	7232	38558	42983	15074	9777	5608	4332	6191
sample-S15	48468	14021	13168	51474	34502	32367	4218	38715	68281	31680	20499	8917	7288	10648
sample-S16	85339	24015	22561	79086	60357	41279	4254	49163	108238	49256	34381	16861	11115	18853
sample-S14	132249	34002	37595	128282	89580	71851	9457	86626	179526	82528	55817	23631	18088	27713
sample-S49	65560	17980	17375	63180	47895	60541	11801	74652	99467	47811	29734	13057	9410	14449
sample-S28	94753	24873	27528	87221	69633	97490	22697	126467	159200	53603	40134	18976	15330	20304
sample-S76	132308	33731	36470	125816	89564	64449	7942	77629	173055	82476	55360	23737	17991	27592
sample-S75	110763	28832	31454	105689	74739	45607	3762	55292	147906	65104	44476	19680	15734	22740
sample-S77	14284	4442	3546	14979	11810	11744	1973	14153	21527	10340	6844	2833	2307	3626
sample-S35	50025	13087	13640	49718	36497	60654	16043	79286	84826	30350	23113	10694	8703	11585
sample-S78	7441	2078	1903	7256	6338	11746	3362	15444	14650	5534	3686	1748	1164	1811
sample-S29	10439	2825	2559	9562	8206	17026	4992	22547	20835	7766	5078	2467	1576	2503
sample-S30	140748	37974	42150	140568	91761	54726	5156	64700	191231	95827	61878	24303	14905	28665
sample-S31	64915	17174	19944	61178	49776	73464	16107	93358	112939	37323	26692	12985	10816	14200
sample-S34	44504	12296	13145	44934	30580	25547	4386	31707	63718	28988	19626	8223	5809	9353
sample-S80	118159	32411	33767	119726	78672	48043	4878	56946	159444	81290	52273	20850	13087	24456
sample-S79	236335	60918	68968	225863	162257	145485	21675	177641	337968	152556	101862	44096	32208	50505
sample-S32	173611	46977	50473	171669	114836	67714	5603	81322	238556	115181	74384	30635	19313	35616
sample-S82	162624	42122	49946	158565	106281	63385	4850	76855	222513	95834	65857	27841	21099	32382
sample-S81	171276	44814	51301	169460	112334	63832	4576	75203	231642	108947	72573	29583	19789	34772
sample-S33	71543	19854	18001	76156	55543	39600	4514	47097	94753	42983	29899	13979	10310	16638
sample-S83	66646	22793	15859	79588	54196	46920	6809	57552	100080	48176	31250	13626	10063	16189
sample-S21	51170	14795	14407	55873	38236	30982	4276	38111	75846	29574	21255	9678	8592	11317
sample-S18	93453	25823	27111	98497	67925	42986	3101	51021	124334	53812	39019	17675	15594	20793
sample-S20	126381	34440	37701	127364	83099	55288	7269	66946	176821	85850	56300	22266	13414	26069
sample-S22	72260	19491	21649	71118	49324	46813	9250	58907	110497	48375	32741	13387	8199	15313
sample-S19	24760	6861	7773	22993	20592	49772	13868	64844	56550	19319	12536	5911	3631	5987

## ANEXO D. Tabla con los datos de las variables morfológicas del estudio realizado

Muestra	Especie	Localidad	Profundidad	Pólipos	N huecos	Area malla	Clado	SV	N mallas	Grosor rama	Forma spindlle	Tipo red	Forma malla	Color col	Forma dom es	Nervadura
sample-S1	adamsii	loc_1	11	194	29	0.706	tres	21.47	27	0.07	6	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S2	adamsii	Piedra_chucho	4.5	204	25	0.734	tres	21.47	27	0.07	6	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S3	adamsii	Ensenada_utria	8.5	162	17	0.612	tres	38.66	27	0.07	6	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S4	adamsii	Piedra_chucho	4.5	163	19	0.758	tres	27.17	27	0.07	6	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S5	adamsii	Ensenada_utria	8.5	152	22	0.812	tres	21.86	27	0.07	6	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S23	bayeri	Morritos	6	129	2	0.717	siete	12.97	9	1.3	2	cerradaregular	redonoblonga	amarillo	capstans	ausente
sample-S24	bayeri	Morritos	6	93	4	0.68	siete	15.72	9	1.3	2	cerradaregular	redonoblonga	amarillo	capstans	ausente
sample-S25	bayeri	Ensenada_utria	8.5	87	5	0.705	uno	18.75	9	1.3	2	cerradaregular	redonoblonga	amarillo	capstans	ausente
sample-S26	bayeri	Ensenada_utria	8.5	95	3	0.618	uno	29.5	9	1.3	2	cerradaregular	redonoblonga	amarillo	capstans	ausente
sample-S27	bayeri	Ensenada_utria	8.5	61	3	0.752	uno	16.19	9	1.3	2	cerradaregular	redonoblonga	amarillo	capstans	ausente
sample-S51	cainrsi	Arrecife	16	74	3	0.638	uno	29.86	9	1.1	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	presente
sample-S52	cainrsi	Arrecife	16	84	0	0.524	uno	27.05	9	1.1	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	presente
sample-S53	cainrsi	Arrecife	16	63	0	0.483	uno	27.06	9	1.1	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	presente
sample-S54	cainrsi	Arrecife	16	93	1	0.596	uno	21.62	9	1.1	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	presente
sample-S55	cainrsi	Arrecife	16	77	2	0.576	uno	24	9	1.1	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	presente
sample-S63	curta	Nevera	18	75	0	0.474	siete	18.19	7.5	0.75	6	abiartaregular	oblopoligonal	purpura	capstans	ausente
sample-S64	curta	Nevera	18	85	0	0.622	siete	20.05	7.5	0.75	6	abiartaregular	oblopoligonal	purpura	capstans	ausente
sample-S65	curta	Nevera	18	92	2	0.621	siete	20.06	7.5	0.75	6	abiartaregular	oblopoligonal	purpura	capstans	ausente
sample-S66	curta	Nevera	18	68	1	0.522	siete	26.77	7.5	0.75	6	abiartaregular	oblopoligonal	purpura	capstans	ausente
sample-S10	eximia	Morritos	6	132	2	0.594	seis	34.66	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S11	eximia	Morritos	6	80	5	0.64	seis	32.15	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S12	eximia	loc_2	8.5	65	3	0.518	seis	25.88	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S13	eximia	Ensenada_utria	8.5	74	1	0.55	seis	26.19	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S6	eximia	loc_1	11	115	3	0.542	seis	29.79	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S7	eximia	Ensenada_utria	8.5	81	5	0.627	seis	33.05	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S8	eximia	Ensenada_utria	8.5	100	1	0.499	seis	25	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S9	eximia	Ensenada_utria	8.5	83	3	0.566	seis	30	9	1.3	3	abiartaregular	rectangular	rojo	spindle	ausente
sample-S36	firma	Ensenada_utria	8.5	81	4	0.545	dos	24.88	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S37	firma	Ensenada_utria	8.5	80	8	0.557	dos	37.95	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S38	firma	Ensenada_utria	8.5	70	4	0.586	dos	35.24	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S39	firma	Ensenada_utria	8.5	80	8	0.557	dos	20	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S40	firma	Ensenada_utria	8.5	104	10	0.655	dos	20.79	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S41	firma	Ensenada_utria	8.5	102	11	0.634	dos	34.73	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S42	firma	Ensenada_utria	8.5	46	8	0.68	dos	25.66	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S43	firma	Ensenada_utria	8.5	59	5	0.569	dos	26.32	11.5	1.75	2	cerradaregular	rectangular	purpura	spindle	ausente
sample-S44	irene	Morritos	6	152	32	0.841	tres	16.58	32	0.06	7	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	presente
sample-S45	irene	Morritos	6	116	20	0.783	tres	19.24	32	0.06	7	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	presente
sample-S47	irene	Piedra_chucho	4.5	133	17	0.821	tres	21.62	32	0.06	7	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	presente
sample-S48	irene	Piedra_chucho	4.5	207	33	0.814	tres	17.2	32	0.06	7	irregularfina	cuadrada	rojo	spindle	presente
sample-S14	rubicunda	Ensenada_utria	8.5	55	3	0.576	dos	26.35	17	0.1	5	cerradaregular	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S15	rubicunda	Morritos	6	82	8	0.752	dos	15.24	17	0.1	5	cerradaregular	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S16	rubicunda	Ensenada_utria	8.5	63	5	0.628	dos	20	17	0.1	5	cerradaregular	cuadrada	rojo	spindle	ausente
sample-S49	sculpta	Ensenada_utria	8.5	49	1	0.524	cinco	28.36	3	0.7	8	abiartaregular	enlongada	rojo	spindle	ausente
sample-S50	sculpta	Ensenada_utria	8.5	48	0	0.558	cinco	28.3	3	0.7	8	abiartaregular	enlongada	rojo	spindle	ausente
sample-S28	sp1	loc_1	11	43	0	0.487	dos	20	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S75	sp1	Ensenada_utria	8.5	71	6	0.65	dos	24.32	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S76	sp1	Ensenada_utria	8.5	90	6	0.634	dos	22.47	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S35	sp2	loc_1	11	91	4	0.543	seis	37.31	NA	NA	NA	NA	NA	rojo	NA	NA
sample-S77	sp2	Roca_liliana	21.5	58	1	0.533	seis	36.38	NA	NA	NA	NA	NA	rojo	NA	NA
sample-S78	sp2	loc_2	11	125	3	0.571	seis	38.4	NA	NA	NA	NA	NA	rojo	NA	NA
sample-S29	sp3	loc_1	11	162	17	0.78	tres	25.27	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S30	sp3	Ensenada_utria	8.5	185	32	0.724	tres	25.48	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S31	sp4	Piedra_chucho	4.5	104	2	0.578	cuatro	33.87	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S34	sp4	Ensenada_utria	8.5	86	1	0.601	cuatro	27.9	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S79	sp4	Piedra_fidel	12	79	5	0.609	dos	28.27	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S80	sp4	Ensenada_utria	8.5	82	8	0.555	dos	36.74	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S32	sp5	Ensenada_utria	8.5	142	23	0.795	tres	19.15	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S81	sp5	Ensenada_utria	8.5	131	15	0.691	tres	18.95	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S82	sp5	Ensenada_utria	8.5	163	10	0.706	tres	19.68	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S33	sp6	Morritos	6	107	4	0.627	seis	23.89	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S83	sp6	Morritos	6	148	8	0.733	seis	14.63	NA	NA	NA	NA	NA	purpura	NA	NA
sample-S18	stenobrochis	Morritos	6	118	5	0.826	dos	20	2	3.5	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	ausente
sample-S19	stenobrochis	Ensenada_utria	8.5	76	0	0.643	cinco	16.01	2	3.5	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	ausente
sample-S20	stenobrochis	Ensenada_utria	8.5	86	1	0.525	cuatro	22.72	2	3.5	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	ausente
sample-S21	stenobrochis	Morritos	6	118	5	0.826	cuatro	15.52	2	3.5	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	ausente
sample-S22	stenobrochis	Ensenada_utria	8.5	123	1	0.674	cuatro	18.78	2	3.5	5	abiartaregular	oblongrectangul	purpura	spindle	ausente

**ANEXO E.** Fotografías de la morfología de las colonias diferentes especies de *Pacifigorgia*. A) *P. adamsii*, B) *P. bayeri*, C) *P.cairnsii*, D) *P. curta*, E) *P. sculpta*, F) *P. firma*, G) *P. irene*, H) *P. rubicunda*, I) Sp. 1, J) *P. eximia*, K) *P. stenobrochis*, L) Sp. 3 , M) Sp. 5, N) Sp. 6, O) Sp. 2, P) Sp. 4. Fotografías por Stephanie Colmenares, disponibles en Colmenares, 2017.



CONGRESO CERTIFICACIÓN

# CERTIFICATE OF PARTICIPATION

*IGC Symposium 2018*

## Microbial Eco-Evolutionary Dynamics

This certifies that

**Sandra Montaña Salazar**

attended the Microbial Eco-Evolutionary Dynamics Symposium and presented  
the POSTER entitled

*An assessment of phyllosymbiosis between bacterial communities and seafan  
corals*

The conference organizers

Ana-Hermina Ghenu

Hugo Barreto

Inês Fragata

Ricardo Ramiro

Tanja Dapa



INSTITUTO  
GULBENKIAN  
DE CIÊNCIA



INOVA



Paperpile



### PUBLICACIÓN LIBRO

Sánchez, J. A., Dueñas, L. F., Rowley, S. J., Gonzalez-Zapata, F. L., Vergara, D. C., **Montaña-Salazar, S. M.**, ... & Cordeiro, R. T. (2019). Gorgonian corals. In *Mesophotic Coral Ecosystems* (pp. 729-747). Springer, Cham.