



Effects of thermal stress caused by the 2015–2016 El Niño on the biochemical composition, exoskeleton structure, and symbiont density of the fire coral *Millepora alcicornis*

Efecto del estrés térmico causado por el evento El Niño 2015-2016 sobre la composición bioquímica, la estructura del exoesqueleto y la densidad de simbioses del coral de fuego *Millepora alcicornis*

Norma B. Olguín-López^{1,2}, Víctor H. Hernández-Elizárraga¹, Rosalina Hernández-Matehuala¹, Juana I. Rojas-Molina¹, Ramón Guevara-González⁴, César Ibarra-Alvarado³, Alejandra Rojas Molina^{3*}

¹ Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010 Querétaro, Mexico.

² División Química y Energías Renovables. Universidad Tecnológica de San Juan del Río, 76800, San Juan del Río, Querétaro, Mexico.

³ Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010 Querétaro, Mexico.

⁴ C.A Ingeniería de Biosistemas. Facultad de Ingeniería-Campus Amazcala, 76265 El Marqués, Querétaro, Mexico.

* Corresponding author. E-mail: rojasa@uaq.mx

ABSTRACT. Reef-forming cnidarians are essential for maintaining ecological balance. Unfortunately, coral reefs are endangered due to coral bleaching, which interrupts mutualistic symbiosis between Symbiodiniaceae algae and their coral hosts. Bleaching events result in very high coral mortality and the rapid deterioration of reef structures. Studies aimed at explaining the causes, mechanisms, and consequences of coral bleaching have been mainly conducted with anthozoans, while the impacts of thermal stress responsible for coral bleaching have been scarcely studied in hydrozoans, such as *Millepora* species (phylum Cnidaria, class Hydrozoa), which are the second most important reef-forming cnidarians. In the present study, the effects of thermal stress caused by the 2015–2016 El Niño on symbiont abundance, exoskeleton structure, and the biochemical composition of *Millepora alcicornis* were analyzed. Unbleached *M. alcicornis* specimens exhibited a higher abundance of *Breviolum* and *Durisdinium* species, which suggests that unbleached hydrocoral colonies might counteract thermal stress by hosting thermotolerant symbionts of the *Durisdinium* genus. Bleached hydrocorals exhibited lower levels of calcification than unbleached hydrocorals as well as changes in the microstructure of trabeculae and zooid pores. In contrast, thermal stress did not affect total calcium carbonate and carbohydrate content. Bleached tissues showed significantly higher levels of protein and refractory material, whereas their lipid content decreased considerably. The present study provides evidence that bleached *M. alcicornis* colonies suffered a decline in calcification and changes in the structure of their exoskeletons after being exposed to the 2015–2016 El Niño. The significant decrease in lipid content suggests that *M. alcicornis* primarily uses energy stores to maintain vital cellular processes at the expense of calcification.

Key words: bleaching, *Millepora alcicornis*, biochemical composition, exoskeleton structure, symbiont.

RESUMEN. Los cnidarios formadores de arrecifes son esenciales en la ecología marina. Desafortunadamente, están amenazados por el fenómeno de blanqueamiento, el cual rompe la simbiosis mutualista entre algas de la familia Symbiodiniaceae y sus hospederos coralinos. El blanqueamiento causa un alto índice de mortalidad de corales y un rápido deterioro de las estructuras arrecifales. Los estudios dirigidos a explicar causas, mecanismos y consecuencias del blanqueamiento se han realizado principalmente con antozoos, mientras que los impactos del blanqueamiento de corales se han estudiado escasamente en especies de *Millepora* (phylum Cnidaria, clase Hydrozoa), que son los segundos constructores de arrecifes más importantes. En el presente estudio se analizó el efecto del estrés térmico causado por el evento El Niño 2015-2016 sobre la abundancia de simbioses, la estructura del exoesqueleto y la composición bioquímica de *Millepora alcicornis*. Los especímenes sin blanquear de *M. alcicornis* contenían una mayor abundancia de especies de *Breviolum* y *Durisdinium*, lo que sugiere que las colonias de hidrocorales sin blanquear podrían estar contrarrestando el estrés térmico al albergar simbioses termotolerantes del género *Durisdinium*. Los hidrocorales blanqueados mostraron niveles más bajos de calcificación y cambios en la microestructura de zooides y trabéculas. En contraste, el estrés térmico no modificó el contenido total de carbonato de calcio y carbohidratos en los hidrocorales. Los tejidos blanqueados mostraron niveles significativamente más altos de proteína y material refractario, mientras que su contenido de lípidos disminuyó considerablemente. El presente estudio muestra que las colonias blanqueadas de *M. alcicornis* sufrieron una disminución en la calcificación y cambios en la estructura de su exoesqueleto después de estar expuestas al estrés térmico provocado por el evento El Niño 2015-2016. La disminución significativa en el contenido de lípidos sugiere que *M. alcicornis* está utilizando sus reservas de energía principalmente para mantener sus procesos celulares vitales a expensas de la calcificación.

Palabras clave: blanqueamiento, *Millepora alcicornis*, composición bioquímica, estructura del exoesqueleto, simbiote.



INTRODUCTION

Coral reefs are some of the richest marine ecosystems on earth and are essential for maintaining ecological balance (Anthony et al. 2020). *Millepora* species (phylum Cnidaria, class Hydrozoa), which are recognized as the second most important reef-forming organisms, are extensively distributed in the Caribbean, which contains the second largest barrier reef on earth, the Mesoamerican Reef (Rojas-Molina et al. 2012). Reef-forming organisms engage in mutualistic symbiosis with unicellular dinoflagellate algae of the Symbiodiniaceae family, which is critical for the formation of coral reef structures (Fransolet et al. 2012).

Unfortunately, coral reefs are seriously threatened by environmental stressors, primarily global warming and ocean acidification. These stressors cause bleaching events in which coral and hydrocoral tissues lose their symbionts or pigments, which exposes their white calcium carbonate exoskeletons (McLachlan et al. 2020). In recent years, the frequency and severity of bleaching events have increased, and massive bleaching events have been documented in all tropical regions of the world (Suggett and Smith 2020). Notably, the thermal stress of the 2015–2016 El Niño was unprecedented in the Caribbean region over the period of 1871–2017. Indeed, 2017 was the warmest non-El Niño year ever recorded, which resulted in very high coral mortality and the rapid deterioration of reef structures, with far-reaching environmental impacts (Hughes et al. 2018, Lough et al. 2018, Eakin et al. 2019).

Thermally induced bleaching events have caused worldwide damage to coral reefs, with serious consequences for the biodiversity of tropical marine regions (Foster and Attrill 2021). A large number of studies have evaluated the consequences of thermal stress and bleaching and the resilience and tolerance of reef-forming anthozoans (Bay and Palumbi 2015; Ainsworth et al. 2016; Ricaurte et al. 2016; Hillyer et al. 2017, 2018; Oakley et al. 2017; Ruiz-Jones and Palumbi 2017; Mayfield et al. 2018). The results of these studies have linked tolerance and the capacity to recover after bleaching events with the energetic reserves present in cnidarians (Grottoli et al. 2014, Schoepf et al. 2015, Aichelman et al. 2016, Levas et al. 2016, Tremblay et al. 2016) and their ability to replace symbionts with more thermo-tolerant algal partners, either before or after a bleaching event (Sampayo et al. 2008, Baker et al. 2017, Swain et al. 2018). However, little is known regarding the consequences of thermal stress on reef-forming hydrozoans (García-Arredondo et al. 2011, Hernández-Elizárraga et al. 2019, Olguín-López et al. 2019). Thus, the aim of the present study was to conduct a comparative analysis of symbiont cell density, exoskeleton structure, and the biochemical composition of unbleached and bleached *Millepora alcicornis*, a fire coral, affected by the 2015–2016 El Niño in the Mexican Caribbean.

INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son algunos de los ecosistemas más ricos y son esenciales para mantener el equilibrio ecológico (Anthony et al. 2020). Las especies del género *Millepora* (phylum Cnidaria, clase Hydrozoa), reconocidas como los segundos organismos formadores de arrecifes más importantes, están ampliamente distribuidas en el Caribe, donde se encuentra la segunda barrera arrecifal más grande del mundo, el Arrecife Mesoamericano (Rojas-Molina et al. 2012). Los organismos formadores de arrecifes mantienen una simbiosis mutualista con las algas dinoflageladas unicelulares de la familia Symbiodiniaceae, que es fundamental para la formación de estructuras de arrecifes de coral (Fransolet et al. 2012).

Desafortunadamente, los arrecifes de coral están seriamente amenazados por estresores ambientales, principalmente el calentamiento global y la acidificación de los océanos. Estos estresores provocan eventos de blanqueamiento en los cuales los tejidos de los corales y los hidrocorales pierden sus simbiontes o pigmentos, lo que expone el exoesqueleto blanco de carbonato de calcio (McLachlan et al. 2020). En los últimos años se ha incrementado la frecuencia y severidad de eventos de blanqueamiento y se han documentado eventos masivos de blanqueamiento en todas las regiones tropicales del mundo (Suggett y Smith 2020). Notablemente, el nivel de estrés térmico durante el evento El Niño 2015-2016 no tuvo precedentes durante el periodo 1871-2017 en la región del Caribe. De hecho, 2017 fue el año sin un evento El Niño más cálido que se ha registrado, lo que resultó en un alto índice de mortalidad de corales en muchos arrecifes, un rápido deterioro de las estructuras de los arrecifes e impactos ambientales de gran alcance (Hughes et al. 2018, Lough et al. 2018, Eakin et al. 2019).

Los eventos de blanqueamiento provocados por el estrés térmico han causado daños a escala mundial en los arrecifes de coral, con graves efectos en el mantenimiento de la biodiversidad en las regiones marinas tropicales (Foster y Attrill 2021). Un gran número de estudios han evaluado las consecuencias del estrés térmico y el blanqueamiento y la resiliencia y tolerancia de los antozoos formadores de arrecifes (Bay y Palumbi 2015; Ainsworth et al. 2016; Ricaurte et al. 2016; Hillyer et al. 2017, 2018; Oakley et al. 2017; Ruiz-Jones y Palumbi 2017; Mayfield et al. 2018). Los resultados obtenidos de dichas investigaciones han relacionado la tolerancia y capacidad de recuperación tras un evento de blanqueamiento con la cantidad de reservas energéticas de los cnidarios (Grottoli et al. 2014, Schoepf et al. 2015, Aichelman et al. 2016, Levas et al. 2016, Tremblay et al. 2016) y su capacidad de albergar algas más termotolerantes, antes o durante el evento de blanqueamiento (Sampayo et al. 2008, Baker et al. 2017, Swain et al. 2018). Sin embargo, existe muy poca investigación sobre las consecuencias del estrés térmico en los organismos formadores de arrecifes de la clase Hydrozoa (García-Arredondo et al. 2011, Hernández-Elizárraga et al. 2019, Olguín-López et al. 2019). Por lo tanto, el objetivo del

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Millepora alcicornis fragments were collected from 3 unbleached and 3 bleached colonies at depths of 4–10 m by scuba diving. To reduce the possibility of sampling genetic clones, at least 10 m separated the fragments that were collected. Sampling was conducted in November 2016 during the third-largest, global-scale mass bleaching event ever documented (Hughes et al. 2018) in the area known as “La Bocana Chica” in Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Quintana Roo, Mexico). A field permit (PPF/DGOPA-139/15) was granted by the Ministry of Agriculture, Rural Development, Fisheries, and Food (SAGARPA, for its Spanish acronym) for specimen collection. The specimens were frozen in liquid nitrogen and transported to the laboratory at the Autonomous University of Queretaro.

Genetic identification of Symbiodiniaceae algae

Total DNA samples were obtained from the hydrocoral tissues using the following extraction buffer: 100 mM Tris-HCl pH 8, 2% CTAB, 200 mM EDTA, and 1.4 M NaCl (Salgado et al. 2007). The Symbiodiniaceae species hosted by the hydrocorals were identified by PCR to the genus level. Specific primer sets targeting the internal transcribed spacer region ITS1 or domain 2 of the large-subunit rDNA (LSU) of Symbiodiniaceae genera (*Symbiodinium* [formerly Clade A], *Breviolum* [formerly Clade B], *Cladocopium* [formerly Clade C], and *Durisdinium* [formerly Clade D]) were obtained (Table 1; Mieog et al. 2007, Correa et al. 2009). The PCR reaction mixture (20 μ L) contained 7.5 μ L sterile water, 2.0 μ L buffer (10 \times), 1.0 μ L MgCl₂, 2.0 μ L DNA, 2.5 μ L of each forward and reverse *Symbiodinium* primer (25 mM), 1.0 μ L DNTp mix (2 mM), and 0.5 U of Taq polymerase (Taq DNA Polymerase Recombinant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Amplifications were performed on an iCycler thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The PCR products were analyzed in 2% agarose gels, and the gels were visualized using ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories). The 1 Kb Plus DNA Ladder was used as a molecular weight marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Dominant bands on each gel were excised and sequenced using a BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) and a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Symbiont cell ratio densities were quantified from each DNA sample using qPCR. Primers and probes for qPCR assays targeting specific β -actin loci from *M. alcicornis*, *Symbiodinium* sp., *Breviolum* sp., *Cladocopium* sp., and *Durisdinium* sp. were used as controls. The qPCR amplification was performed in triplicate for each sample on a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Table 1).

presente estudio fue llevar a cabo un análisis comparativo de la composición bioquímica, la estructura del exoesqueleto y la densidad de simbiontes de colonias sin blanquear y blanqueadas de *Millepora alcicornis*, un coral de fuego, afectadas por el evento El Niño 2015-2016 en el Caribe mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se colectaron fragmentos de *M. alcicornis* de 3 colonias sin blanquear y 3 colonias blanqueadas a profundidades de 4 a 10 metros mediante buceo autónomo. Para reducir la posibilidad de muestrear clones genéticos, al menos 10 m separaron los fragmentos que se recolectaron. El muestreo se llevó a cabo en noviembre de 2016 durante el tercer evento más grande de blanqueamiento masivo a gran escala que se ha documentado (Hughes et al. 2018) en el área conocida como “La Bocana Chica” en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Quintana Roo, México). Un permiso de campo (PPF/DGOPA-139/15) fue otorgado por la Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) para la recolección de especímenes. Los especímenes fueron congelados en nitrógeno líquido y transportados a nuestro laboratorio de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Identificación genética de algas de la familia Symbiodiniaceae

Las muestras de ADN total se obtuvieron de los tejidos de los hidrocorales utilizando un buffer de extracción con la siguiente composición: 100 mM Tris-HCl pH 8, 2% CTAB, 200 mM EDTA y 1.4 M NaCl (Salgado et al. 2007). Los diferentes géneros de simbiontes hospedados por los hidrocorales fueron identificados por PCR. Se obtuvieron los cebadores específicos dirigidos a la región espaciadora transcrita interna ITS1 o al dominio 2 de la subunidad grande del ADNr de los géneros Symbiodiniaceae (*Symbiodinium* [anteriormente Clado A], *Breviolum* [anteriormente Clado B], *Cladocopium* [anteriormente Clado C] y *Durisdinium* [anteriormente Clado D]) (Tabla 1; Mieog et al. 2007, Correa et al. 2009). La mezcla de reacción de PCR (20 μ L) contenía 7.5 μ L de agua estéril, 2.0 μ L de buffer (10 \times), 1.0 μ L MgCl₂, 2.0 μ L DNA, 2.5 μ L de cada primer (25 mM), 1.0 μ L DNTp mix (2 mM) y 0.5 U de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase Recombinant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% y visualizados en ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories). Se utilizó como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las bandas dominantes en el gel se escindieron y secuenciaron utilizando el kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific) y un Analizador Genético 3130XL

Table 1. Primers used in PCR for Symbiodiniaceae algae identification (Mieog et al. 2007, Correa et al. 2009)

Tabla 1. Cebadores usados en la identificación por PCR de algas de la familia Symbiodiniaceae (Mieog et al. 2007, Correa et al. 2009).

Primer	Sequence
ITS A-specific forward	5'-CCTCTTGGACCTTCCACAAC-3'
ITS A-specific reverse	5'-GCATGCAGCAACACTGCTC -3'
LSU-28S B-specific forward	5'-GTCTTTGTGAGCCTTGAGC-3'
LSU-28S B-specific reverse	5'-GCACACTAACAAAGTGTACCATG-3'
nITS1 universal forward	5'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCC-3'
nITS1 C-specific reverse	5'-AAGCATCCCTCACAGCCAAA-3'
nITS1 D-specific reverse	5'-CACCGTAGTGGTTCACGTGTAATAG-3'

Alizarin red S staining

Fragments from unbleached and bleached *M. alcornis* specimens collected from different colonies were stained with alizarin red S. The uptake and incorporation of alizarin red S into hydrocoral skeletons, which results in pink-red areas, is proportional to the calcification rate and consequently highly correlated with newly calcified zones (Le Tissier 1990, 1991; Frank et al. 1995; Tambutté et al. 2012). Hydrocoral fragments were placed in seawater containing 10–15 mg of vital stain alizarin red S for 12 h. Then, the skeletons were cleaned of overlying tissues in a 5% sodium hypochlorite solution for 30 min, rinsed in distilled water (12 h), and air-dried. The stained areas of the hydrocoral exoskeletons indicated zones in which calcium carbonate deposition occurred.

Scanning electron microscopy

Three fragments from unbleached colonies and 3 fragments from bleached colonies collected in November 2016 were cleaned of overlying tissues. Cross sections of the hydrocoral fragments were obtained using a 0.5-cm sander, and the microstructure of the exoskeleton was examined by scanning electron microscopy under low vacuum conditions (30 Pa; JSM 6060LV, Jeol, Tokyo, Japan).

Biochemical composition

Fragments (approximately 1 cm²) from unbleached and bleached *M. alcornis* specimens were lyophilized, and their soluble protein, lipid, carbohydrate, and refractory material content were determined. To determine calcium carbonate content, the hydrocoral fragments were dried for 24 h in an oven at 60 °C. To estimate organic matter content, the dry weight (DW) of the sclerites was subtracted from the DW of calcium carbonate. The values of the biochemical

(Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.). Se cuantificaron las densidades de la proporción de células simbiotas a partir de cada muestra de ADN mediante qPCR. Se utilizaron como controles cebadores y sondas para ensayos de qPCR específicos para β -actina de *M. alcornis*, *Symbiodinium* sp., *Breviolum* sp., *Cladocopium* sp. y *Durisdinium* sp. La amplificación de qPCR se realizó por triplicado para cada muestra en un sistema CFX96 Touch de detección de PCR en tiempo real (Bio-Rad Laboratories, Tabla 1).

Tinción con rojo alizarina S

Fragmentos sin blanquear y blanqueados de *M. alcornis* recolectados de diferentes colonias fueron teñidos con rojo alizarina S. La captación e incorporación de rojo alizarina S en los esqueletos de hidrocorales, lo que da como resultado áreas de color rosa-rojo, es proporcional a la tasa de calcificación y, en consecuencia, está altamente correlacionada con las zonas recién calcificadas (Le Tissier 1990, 1991; Frank et al. 1995; Tambutté et al. 2012). Se colocaron fragmentos de hidrocoral en agua de mar que contenía 10-15 mg de colorante rojo alizarina S durante 12 h. Posteriormente, los esqueletos se limpiaron de tejidos suprayacentes en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 30 min, se enjuagaron con agua destilada (12 h) y se secaron al aire. Las áreas del exoesqueleto de hidrocoral que se tiñeron indicaron zonas donde se había producido la deposición de carbonato de calcio.

Microscopía electrónica de barrido

Tres fragmentos de colonias sin blanquear y 3 fragmentos de colonias blanqueadas de *M. alcornis* recolectados en noviembre de 2016 fueron limpiados de tejidos suprayacentes. Las secciones transversales de los fragmentos de hidrocoral se obtuvieron empleando una lijadora de 0.5 cm y la microestructura del exoesqueleto se examinó mediante

components of each sample were expressed as the percentage of total DW (% g DW) and as the percentage of total organic matter (% g OM). Calcium carbonate, lipids, carbohydrates, and refractory material (insoluble protein content) were extracted and quantified from the lyophilized *M. alcicornis* fragments using the method described by Shirur et al. (2014).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM; $n = 3$; symbiont cell ratio density and biochemical composition). Statistical analyses were performed in GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The means \pm SEM were compared using unpaired Student *t*-tests. In all cases, a significance level of 95% ($\alpha = 0.05$) was employed.

RESULTS

Unbleached and bleached fragments of *M. alcicornis* collected in the Mexican Caribbean during November 2016 are shown in Figure 1a and 1b, respectively. Figure 1c and 1d show unbleached and bleached *M. alcicornis* fragments stained with alizarin red S. Unbleached hydrocorals exhibited a pink-red color (hue saturation value [HSV]: 346%, 45%, and 66%), while the bleached hydrocorals exhibited a white-red color (HSV: 355%, 15%, and 96%), which indicated an elevated rate of calcification. Unbleached and bleached *M. alcicornis* fragments from different colonies harbored *Symbiodinium* sp., *Breviolum* sp., *Cladocopium* sp., and *Durisdinium* sp. Unbleached *M. alcicornis* specimens showed a higher distribution of *Breviolum* sp. and *Durisdinium* sp. compared to those of bleached specimens, which exhibited similar symbiont distributions (Fig. 2).

Microstructural properties of the exoskeleton representative of unbleached and bleached *M. alcicornis* specimens are shown in Figure 3 and Table 2. These properties included gastropores and dactylopores in the skeletal surface, individual zooid pores, trabeculae, and pillar crystals. No significant differences were observed in the number or size of gastropores, dactylopores, or pores of the exoskeleton microstructure between unbleached (Fig. 3a) and bleached (Fig. 3e) hydrocorals. However, images obtained from individual zooid pores indicated that these were significantly smaller in the exoskeletons of bleached specimens compared to those of unbleached specimens (Fig. 3f), and their shapes differed from those of unbleached hydrocorals (Fig. 3b). Moreover, trabecular (wall) thickness in the exoskeletons of unbleached specimens (Fig. 3c) was greater than that of bleached specimens (Fig. 3g). We compared the bars of unbleached and bleached specimens from *M. alcicornis* by the widths of one side of the bar. No differences were observed in the regular cross-linking of solid bars and aragonite supports between the exoskeletons of unbleached (Fig. 3d) and bleached (Fig. 3h) specimens.

escaneos de microscopía electrónica de barrido bajo vacío (30 Pa; Jeol JSM 6060LV, Tokio, Japón).

Composición bioquímica

Se liofilizaron fragmentos (aproximadamente 1 cm²) de *M. alcicornis* sin blanquear y blanqueadas y se determinó su contenido de proteínas solubles, lípidos, carbohidratos y material refractario. Para determinar el contenido de carbonato de calcio, los fragmentos de hidrocoral se secaron durante 24 h en un horno a 60 °C. Para estimar el contenido de materia orgánica, al peso seco (PS) de carbonato de calcio se le restó el PS de los escleritos. Los valores de cada componente bioquímico de cada muestra se expresaron como porcentaje del PS total (% g PS) y como porcentaje de la cantidad total de materia orgánica (% g MO). El carbonato de calcio, lípidos, carbohidratos y material refractario (contenido de proteína insoluble) se extrajeron y se cuantificaron de los fragmentos liofilizados de *M. alcicornis* utilizando el método descrito por Shirur et al. (2014).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar de la media (SEM; $n = 3$; densidad de simbioses y composición bioquímica). El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los promedios \pm SEM obtenidos se compararon mediante una prueba *t* de Student para datos no pareados. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Los fragmentos de *M. alcicornis* sin blanquear y blanqueados colectados en el Caribe Mexicano durante noviembre de 2016 se muestran en la Figura 1a y 1b, respectivamente. En la Figura 1c y 1d se muestran los fragmentos sin blanquear y blanqueados de *M. alcicornis* que fueron teñidos con rojo de alizarina. Los corales sin blanquear muestran un color rosa-rojo (valor de saturación del tono [HSV]: 346%, 45% y 66%), mientras que los fragmentos blanqueados muestran un color blanco-rojo (HSV: 355%, 15% y 96%), lo que indica una mayor tasa de calcificación. En los fragmentos de *M. alcicornis* sin blanquear y blanqueados se encontraron *Symbiodinium* sp., *Breviolum* sp., *Cladocopium* sp. y *Durisdinium* sp. Los especímenes sin blanquear de *M. alcicornis* mostraron una mayor distribución de *Breviolum* sp. y *Durisdinium* sp. en comparación con los de especímenes blanqueados, que mostraron distribuciones similares de simbioses (Fig. 2).

Las propiedades microestructurales de la estructura del exoesqueleto de especímenes sin blanquear y blanqueados de *M. alcicornis* se muestran en la Figura 3 y la Tabla 2. Estas propiedades incluían gastroporos y dactiloporos en la superficie del esqueleto, poros zooides individuales, trabéculas y

Figure 4 shows the biochemical composition (calcium carbonate, refractory material, and other organics) of the dry tissues obtained from unbleached and bleached *M. alcicornis* specimens. No significant differences in composition were observed between unbleached and bleached specimens. Hydrocoral dry tissue was composed mainly of calcium carbonate, which constituted approximately 90% of the DW of unbleached and bleached specimens. In addition, 6–7% and 2% of the DW of the specimens was refractory material and other organics, respectively (Table 3).

cristales de pilares. No se observaron diferencias significativas en el número o tamaño de los gastroporos, dactiloporos o poros de la microestructura del exoesqueleto entre los hidrocorales sin blanquear (Fig. 3a) y blanqueados (Fig. 3e). Sin embargo, las imágenes obtenidas de los poros zooides individuales indicaron que estos eran significativamente más pequeños en los exoesqueletos de especímenes blanqueados en comparación con los de los especímenes no blanqueados (Fig. 3f), y sus formas diferían de las de los hidrocorales no blanqueados (Fig. 3b). Además, el grosor trabecular (pared) en

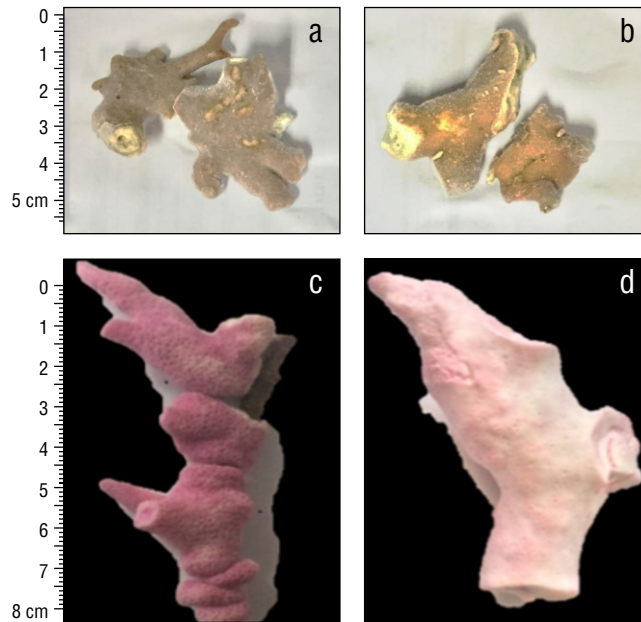


Figure 1. Unbleached (a) and bleached (b) *Millepora alcicornis* fragments collected in 2016 in the Mexican Caribbean. Bleached (c) and unbleached (d) *M. alcicornis* fragments stained with alizarin red S.

Figura 1. Fragmentos sin blanquear (a) y blanqueados (b) de *Millepora alcicornis* recolectados en 2016 en el Caribe Mexicano. Fragmentos blanqueados (c) y sin blanquear (d) de *M. alcicornis* teñidos con colorante rojo alizarina S.

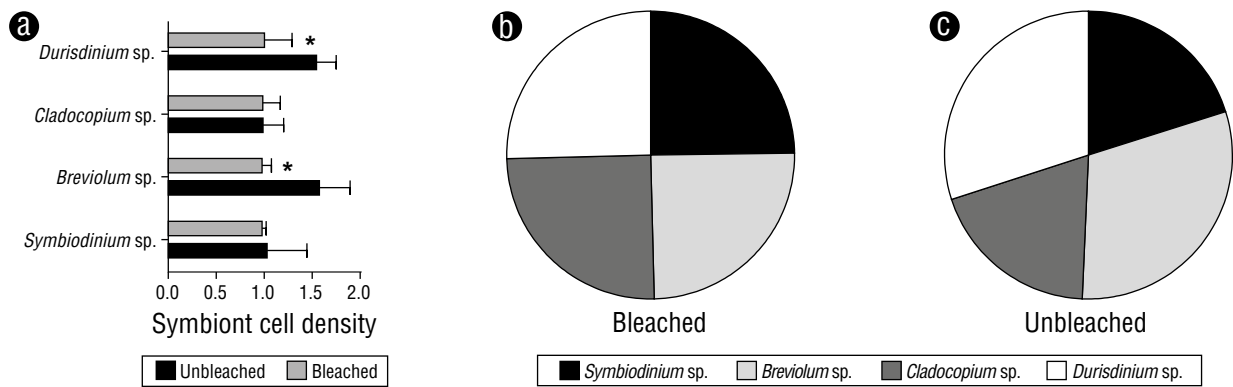


Figure 2. (a) Cell ratio densities of symbionts in unbleached and bleached *Millepora alcicornis* colonies. Values are reported as means ± standard error of the mean (SEM). Distribution of symbionts in bleached (b) and unbleached (c) specimens.

Figura 2. (a) Densidades de la proporción celular de simbiontes en colonias de *Millepora alcicornis* sin blanquear y blanqueadas. Los valores son reportados como promedio ± error estándar de la media (SEM). Distribución de simbiontes en especímenes blanqueados (b) y sin blanquear (c).

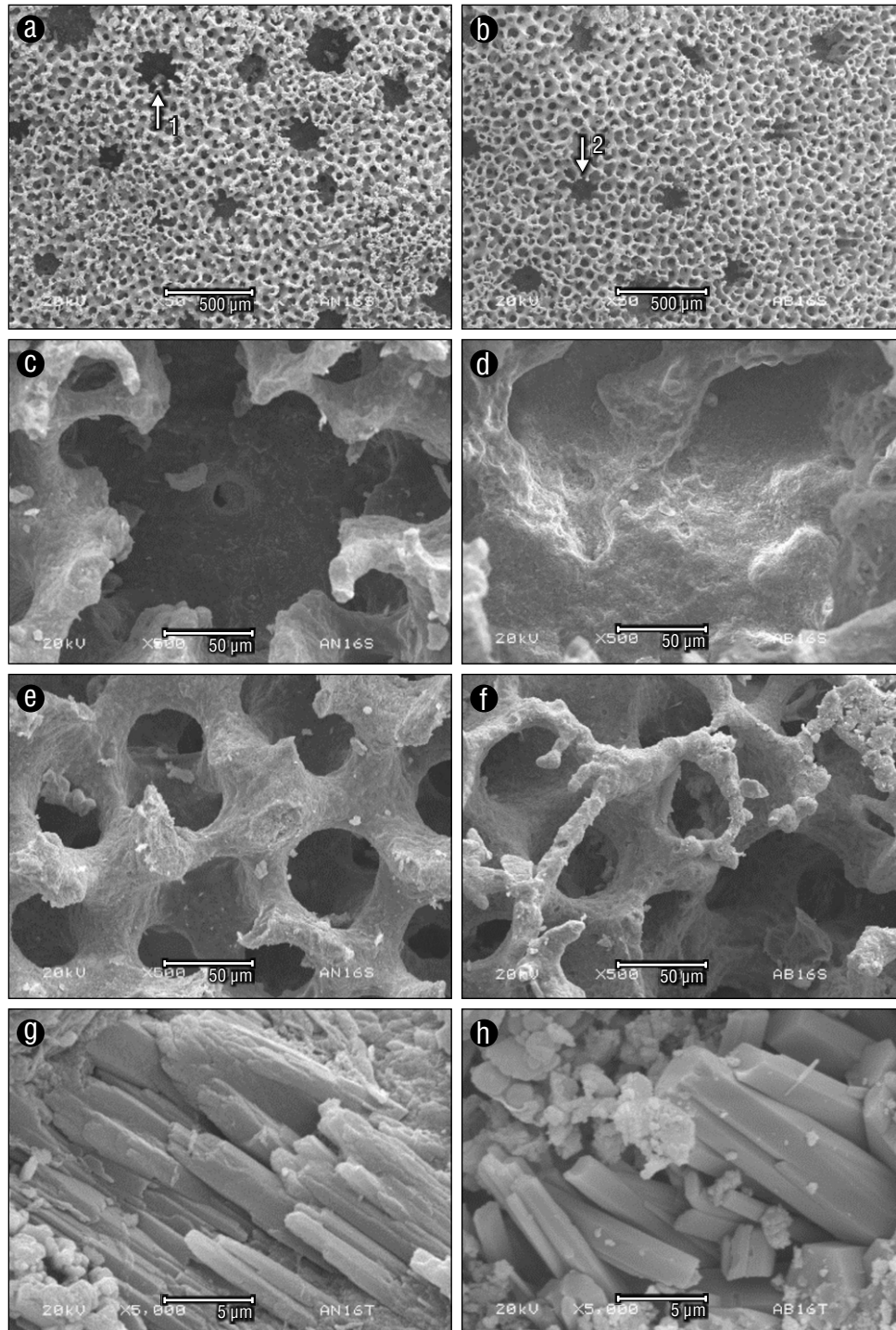


Figure 3. Representative images of scanning electron micrographs (1: gastropore; 2: dactyloporo) of the skeletal surface (a), individual zooid pores (b), trabeculae (c), and pillar crystal (d) from unbleached *Millepora alcornis*. Scanning electron microscope images of the skeletal surface (e), individual zooid pores (f), trabeculae (g), and pillar crystal (h) from bleached *M. alcornis*.

Figura 3. Imágenes representativas de las micrografías electrónicas de barrido (1: gastróporo; 2: dactilóporo) de la superficie del exoesqueleto (a), poros zooides individuales (b), trabéculas (c) y cristales (d) de fragmentos sin blanquear de *Millepora alcornis*. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de la superficie del exoesqueleto (e), poros zooides individuales (f), trabéculas (g) y pilares (h) de *M. alcornis* blanqueados.

Table 2. Measured characteristics (μm) of the exoskeleton structure from unbleached and bleached *Millepora alcicornis* specimens.

Tabla 2. Medidas (μm) de características de la estructura del exoesqueleto de especímenes de *Millepora alcicornis* blanqueados y sin blanquear.

	Unbleached	Bleached	<i>P</i> value
Gastropore	325.000	350.000	0.3508
Dactylopores	166.700	178.600	0.4486
Zooide	90.150	79.120*	0.0212
Trabecular (wall) thickness	24.700	14.480*	0.0047
Cross-linking of solid bars and aragonite supports	1.085	1.088	0.9607

Each value is expressed as the mean \pm standard error of the mean ($n = 3$).
* $P < 0.05$ compared to control by student's *t*-test.

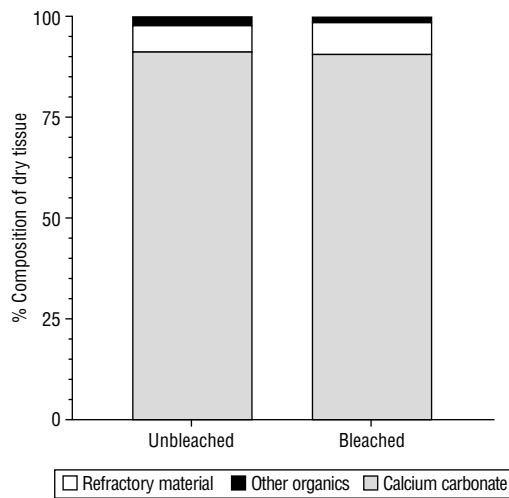


Figure 4. Biochemical composition of tissues from unbleached (uMa) and bleached (bMa) *Millepora alcicornis* specimens. Calcium carbonate (CaCO_3), refractory material (insoluble protein), and other organic constituents (soluble proteins, lipids, and carbohydrates) are standardized to the dry weight (DW) percentage.

Figura 4. Composición bioquímica de los tejidos de ejemplares de *Millepora alcicornis* no blanqueados (uMa) y blanqueados (bMa). El carbonato de calcio (CaCO_3), el material refractario (proteínas insolubles) y otros constituyentes orgánicos (proteínas solubles, lípidos y carbohidratos) se estandarizan al porcentaje de peso seco (PS).

The biochemical composition of the organic matter (i.e., the percentage that represents the removal of calcium carbonate from total DW) of unbleached and bleached hydrocorals is presented in Figure 5. The highest percentage corresponded to refractory material (insoluble proteins), which was significantly higher in bleached specimens than in unbleached specimens, as was the case with the percentage of soluble proteins. In contrast, the percentage of lipids was

los exoesqueletos de colonias sin blanquear de *M. alcicornis* (Fig. 3c) fue mayor que el de los organismos blanqueados (Fig. 3g). Comparamos las barras de especímenes sin blanquear y blanqueados de *M. alcicornis* mediante el ancho de un lado de la barra. No se observaron diferencias en la interconexión regular de las barras sólidas y los soportes de aragonita entre los exoesqueletos de los especímenes sin blanquear (Fig. 3d) y blanqueados (Fig. 3h).

La Figura 4 muestra la composición bioquímica (carbonato de calcio, material refractario y otros orgánicos) del tejido seco de especímenes sin blanquear y blanqueados de *M. alcicornis*. No se observaron diferencias significativas en la composición entre los especímenes sin blanquear y blanqueados. El componente principal del tejido seco del hidrocoral es carbonato de calcio, que constituyó aproximadamente el 90% del PS de las muestras sin blanquear y blanqueadas. Además, 6-7% y el 2% del PS de las muestras era material refractario y otros compuestos orgánicos, respectivamente (Tabla 3).

La composición bioquímica de la materia orgánica (i.e., el porcentaje que representa la diferencia entre el carbonato de calcio y el PS total) de hidrocorales sin blanquear y blanqueados se presenta en la Figura 5. El porcentaje más alto correspondió al material refractario (proteínas insolubles), el cual fue significativamente mayor en las muestras blanqueadas que en las muestras sin blanquear, al igual que ocurrió con el porcentaje de proteínas solubles. En contraste, el porcentaje de lípidos fue significativamente menor en las muestras blanqueadas que en las muestras no blanqueadas. El porcentaje de carbohidratos no cambió como resultado del blanqueamiento (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En los últimos años, la ocurrencia de eventos de blanqueamiento masivo ha aumentado en intensidad y frecuencia, lo

significantly lower in bleached specimens than in unbleached specimens. The percentage of carbohydrates did not change as a result of bleaching (Table 4).

DISCUSSION

In recent years, massive bleaching events have increased in intensity and frequency, resulting in declines in coral cover worldwide (Anthony et al. 2020), with some of the most severe effects observed in Caribbean coral reefs. Hydrocorals are particularly vulnerable to thermal stress (Pereira-Dias and Gondim 2016). For example, *M. alcicornis* has experienced severe bleaching episodes over different periods in various locations, including summer 2005 in the Great Barrier Reef (Marshall and Baird 2000); summer 2006 and 2007 in the Florida Keys (Wagner et al. 2010); and 1987, 1993, 1995, 1998, 2003, 2005, 2009, 2010, and 2014–2017 in Puerto Rico and the Caribbean (Pereira-Dias and Gondim 2016, Eakin et al. 2019).

The Symbiodiniaceae genera *Symbiobinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, and *Durisdinium* have been previously identified in *Millepora* species (Rodríguez et al. 2019) and scleractinian corals in the Caribbean Sea (LaJeunesse 2002, Santos et al. 2004). *Cladocopium* species are the most common symbionts found in reef-forming corals, and *Breviolum* species are among the most dominant symbionts associated with reef-forming cnidarians in the Caribbean Sea (LaJeunesse 2004). In contrast, *Symbiodinium* and *Durisdinium* species are considerably less common, although certain species appear to be adapted to high irradiance and temperature conditions (Jones et al. 2008, Reynolds et al. 2008).

It has been widely documented that Symbiodiniaceae algae provide different physiological benefits to their coral hosts. Silverstein et al. (2015) found that *Montastraea cavernosa*

que ha resultado en una disminución de la cobertura de coral en todo el mundo (Anthony et al. 2020), con algunos de los efectos más severos observados en los arrecifes de coral del Caribe. Los hidrocorales son especialmente vulnerables al estrés térmico (Pereira-Dias y Gondim 2016). Por ejemplo, *M. alcicornis* ha experimentado episodios severos de blanqueamiento en diferentes periodos y lugares, incluyendo verano de 2005 en la Gran Barrera de coral (Marshall y Baird 2000), los veranos de 2006 y 2007 en el arrecife de los Cayos de la Florida (Wagner et al. 2010) y en 1987, 1993, 1995, 1998, 2003, 2005, 2009, 2010 y 2014–2017 en Puerto Rico y el Caribe (Pereira-Dias y Gondim 2016, Eakin et al. 2019).

Los géneros de Symbiodiniaceae *Symbiobinium*, *Breviolum*, *Cladocopium* y *Durisdinium* han sido identificados previamente en otras especies del género *Millepora* (Rodríguez et al. 2019) y corales escleractinios en el mar Caribe (LaJeunesse 2002, Santos et al. 2004). Las especies de *Cladocopium* son los simbioses más comunes que se encuentran en los corales formadores de arrecifes, y las especies de *Breviolum* se encuentran entre los simbioses más dominantes asociados con los cnidarios formadores de arrecifes en el mar Caribe (LaJeunesse 2004). En contraste, especies de *Symbiodinium* y *Durisdinium* son considerablemente menos comunes, aunque ciertas especies parecen estar adaptadas a condiciones de altos niveles de irradiancia y temperatura (Jones et al. 2008, Reynolds et al. 2008).

Se ha documentado ampliamente que las algas de la familia Symbiodiniaceae brindan diferentes beneficios fisiológicos a sus hospederos de coral. Silverstein et al. (2015) descubrió que las colonias de *Montastraea cavernosa* dominadas por *Symbiodinium* D1a experimentaron menos fotodaño y pérdida de simbioses en comparación con los corales que albergan solo simbioses sensibles al estrés (*Symbiodinium* C3). También se ha demostrado que la distribución de Symbiodiniaceae puede

Table 3. Biochemical composition of dry tissues from unbleached (uMa) and bleached (bMa) *Millepora alcicornis* specimens. Values are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

Tabla 3. Composición bioquímica del tejido seco de especímenes de *Millepora alcicornis* blanqueados y sin blanquear. Los valores son reportados como promedio \pm error estándar de la media (SEM).

Parameter (% g DW)	uMa	bMa	P value
Calcium carbonate	91.23 \pm 1.56	90.62 \pm 1.67	0.8028
Refractory material	6.64 \pm 1.12	7.987 \pm 1.36	0.4881
Protein	0.27 \pm 0.03	0.52 \pm 0.10	0.0708
Lipid	1.31 \pm 0.28	0.27 \pm 0.04*	0.0208
Carbohydrate	0.55 \pm 0.16	0.59 \pm 0.17	0.8517

Each value is expressed as the mean \pm standard error of the mean ($n = 3$).

* $P < 0.05$ compared to control by student's t -test.

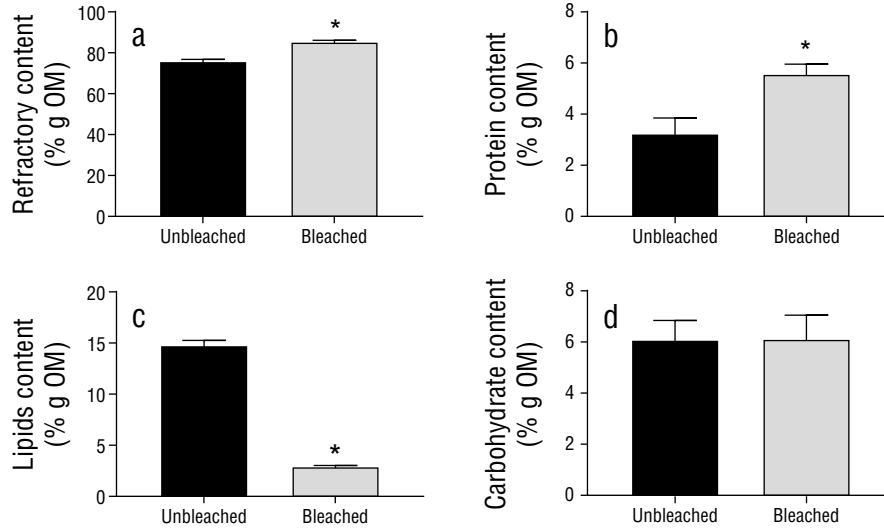


Figure 5. Biochemical composition of organic matter (OM) from unbleached (uMa) and bleached (bMa) *Millepora alcicornis* specimens. Plots show (a) refractory material, (b) NaOH-soluble protein, (c) lipid, and (d) carbohydrate contents. Variables are standardized to the weight of the organic matter (% g OM) within fragments. Values are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

Figura 5. Composición bioquímica de la materia orgánica (OM) de especímenes de *Millepora alcicornis* sin blanquear (uMa) y blanqueados (bMa). Los gráficos muestran (a) material refractario, (b) proteína soluble en NaOH, (c) lípidos y (d) contenido de carbohidratos. Las variables están estandarizadas según el peso seco (PS) de la materia orgánica (% g OM) dentro de los fragmentos. Los valores son reportados como promedio \pm error estándar de la media (SEM).

Table 4. Biochemical composition of organic matter (OM) from lyophilized tissues of unbleached (uMa) and bleached (bMa) *Millepora alcicornis* specimens. Values are reported as means \pm standard error of the mean (SEM).

Tabla 4. Composición bioquímica del material orgánico (OM) de tejidos liofilizados de especímenes de *Millepora alcicornis* blanqueados y sin blanquear. Los valores son reportados como promedio \pm error estándar de la media (SEM).

Parameter (% g DW)	uMa	bMa	P value
Refractory material	75.90 \pm 0.89	85.39 \pm 0.71*	0.0012
Protein	3.23 \pm 0.61	5.57 \pm 0.39*	0.0323
Lipid	14.77 \pm 0.48	2.92 \pm 0.11*	0.0001
Carbohydrate	6.09 \pm 0.76	6.11 \pm 0.94	0.9820

Each value is expressed as the mean \pm standard error of the mean ($n = 3$).

* $P < 0.05$ compared to control by student's t -test.

colonies dominated by D1a *Symbiodinium* experienced less photo-damage and symbiont loss compared to corals that hosted only stress-sensitive symbionts (*Symbiodinium* C3). It has also been demonstrated that the distribution of Symbiodiniaceae can change after bleaching events due to a shift in symbiont dominance (Jones et al. 2008, Sampayo et al. 2008, Silverstein et al. 2015). Moreover, symbiont shuffling has also been observed prior to and during bleaching events (LaJeunesse et al. 2009).

In a previous study conducted by our research group, we found that *M. alcicornis* specimens exhibited a 40% decrease

cambiar después de eventos de blanqueamiento debido a un cambio en la dominancia de simbioses (Jones et al. 2008, Sampayo et al. 2008, Silverstein et al. 2015). Además, el cambio de simbioses también se ha observado antes e incluso durante el blanqueamiento (LaJeunesse et al. 2009).

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, encontramos que los especímenes de *M. alcicornis* mostraron una disminución del 40% en la densidad de simbioses por centímetro cuadrado después del evento El Niño 2015-2016 (Olguín-López et al. 2019), lo que corresponde a un “blanqueamiento moderado” según las categorías

in symbiont density per square centimeter after the 2015–2016 El Niño (Olguín-López et al. 2019), which was classified as “moderate bleaching” according to the categories defined by ReefBase (Oliver et al. 2019). It is worth mentioning that the *M. alcicornis* specimens employed in the present study were selected from the hydrocoral samples collected by Oliver et al. (2019). In this study, we found that, although both unbleached and bleached *M. alcicornis* specimens hosted *Symbiobinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, and *Durisdinium* species, the abundance of thermotolerant *Durisdinium* species was higher in unbleached *M. alcicornis* specimens than in bleached specimens.

Durisdinium species, which are relatively rare yet globally distributed, have attracted increasing interest over recent decades, as they increase the thermal tolerance of their coral hosts (Oliver and Palumbi 2011, Kennedy et al. 2015). Similar to what we found in unbleached *M. alcicornis* in this study, a higher abundance of *Durisdinium* spp. has also been observed in *Orbicella faveolata* after a bleaching event (Kemp et al. 2014). Thus, *M. alcicornis* might be acquiring a certain degree of thermotolerance related to the presence of thermotolerant symbionts. Indeed, our results allow us to hypothesize that *M. alcicornis* colonies that were not bleached by the 2015–2016 El Niño in the Mexican Caribbean were more thermotolerant due to their associations with *Durisdinium* algae.

We used alizarin red S to assess calcification in unbleached and bleached *M. alcicornis* specimens. Unbleached hydrocorals exhibited greater calcification than bleached specimens given the intensity of alizarin red S incorporation. These findings were expected, as the products of photosynthesis conducted by Symbiodiniaceae algae play critical roles in the calcification process, and the photosynthetically fixed carbon pool that is supplied to the coral host significantly diminishes after bleaching events (Colombo-Pallotta et al. 2010, Muller-Parker et al. 2015, D’Olivo and McCulloch 2017). As has been observed with anthozoans, our findings suggest that thermal stress that provokes bleaching also affects hydrocoral calcification.

To determine if a decrease in calcification was reflected in changes in the microstructure of the hydrocoral exoskeleton, unbleached and bleached samples were analyzed by scanning electron microscopy. No apparent differences were detected in the number or size of gastropores or dactyloporos, which are related to the number of polyps specialized in prey capture and heterotrophic feeding, between unbleached and bleached specimens. However, when analyzing individual zooid pores, a reduction in depth, size, and trabecular thickness was observed in the exoskeletons of bleached hydrocorals, which suggests that the deposition of calcium carbonate decreased. Not surprisingly, exoskeletons from bleached specimens showed no evident changes in the regular cross-linking of solid bars and aragonite crystals, as modifications in the calcification process were expected to be observed in the early mineralization centers

definidas por ReefBase (Oliver et al. 2019). Cabe mencionar que los ejemplares de *M. alcicornis* que se utilizaron en la presente investigación fueron seleccionados de las muestras de hidrocorales colectadas por Oliver et al. (2019). En este estudio encontramos que, aunque tanto los especímenes de *M. alcicornis* sin blanquear como los blanqueados albergaban simbiontes de los géneros *Symbiobinium*, *Breviolum*, *Cladocopium* y *Durisdinium*, la abundancia de las especies termotolerante de *Durisdinium* fue mayor en los especímenes de *M. alcicornis* sin blanquear que en los especímenes blanqueados.

Las especies de *Durisdinium*, que son relativamente raras pero distribuidas globalmente, han atraído un creciente interés en las últimas décadas, ya que aumentan la tolerancia térmica de sus hospederos de coral (Oliver y Palumbi 2011, Kennedy et al. 2015). Similar a lo que encontramos en *M. alcicornis* sin blanquear en este estudio, una mayor abundancia de *Durisdinium* spp. también se ha observado en *Orbicella faveolata* después de un evento de blanqueamiento (Kemp et al. 2014). Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten hipotetizar que *M. alcicornis* podría estar adquiriendo un cierto grado de termotolerancia relacionada con la presencia de simbiontes termotolerantes. De hecho, nuestros resultados nos permiten hipotetizar que las colonias de *M. alcicornis* que no se blanquearon por el efecto del evento El Niño 2015-2016 en el Caribe mexicano eran más termotolerantes debido a sus asociaciones con las algas *Durisdinium*.

En el presente estudio, se utilizó la tinción con rojo de alizarina S para evaluar la calcificación de especímenes de *M. alcicornis* blanqueados y sin blanquear. Los hidrocorales sin blanquear exhibieron mayores niveles de calcificación que los especímenes blanqueados dada la intensidad de incorporación del rojo alizarina S. Estos resultados eran esperados, ya que los productos de la fotosíntesis llevada a cabo por las algas de la familia Symbiodiniaceae juegan un papel crítico en el proceso de calcificación, y la reserva de carbono fijada fotosintéticamente suministrada al coral disminuye significativamente después de eventos de blanqueamiento (Colombo-Pallotta et al. 2010, Muller-Parker et al. 2015, D’Olivo y McCulloch 2017). Como se ha observado con los antozoos, nuestros resultados sugieren que el estrés térmico que provoca el blanqueamiento también afecta la calcificación de los hidrocorales.

Con el fin de determinar si una disminución en los niveles de calcificación se reflejaba en cambios en la microestructura del exoesqueleto de hidrocorales, se analizaron muestras de hidrocorales blanqueados y sin blanquear mediante microscopía electrónica de barrido. No se detectaron diferencias aparentes en el número o tamaño de gastróporos o dactilóporos, los cuales están relacionados con el número de pólipos especializados en la captura de presas y alimentación heterótrofa, entre las muestras blanqueadas y sin blanquear. Sin embargo, al analizar los poros zoides individuales, se observó una reducción en la profundidad, el tamaño y el espesor trabecular en el exoesqueleto de los hidrocorales

and not in the fibrous aragonite crystals that were already formed.

It has been well demonstrated that thermal stress reduces calcification and causes a differential expression of genes and proteins involved in regulatory pathways associated with the biomineralization of coral exoskeletons in *Acropora palmata*, *Montastraea faveolata*, *Acropora Millepora*, *Galaxea astreata*, *Porites astreoides*, *Porites divaricata*, and *O. faveolata* (Desalvo et al. 2008, Rodríguez-Lanetty et al. 2009, De Salvo et al. 2010, Moya et al. 2012, Ricaurte et al. 2016, D'Olivo and McCulloch 2017, Huang et al. 2018, Levas et al. 2018). Calcium carbonate comprised the bulk of the hydrocoral exoskeletons (DW) of both unbleached and bleached *M. alcicornis* specimens. Refractory material (insoluble proteins) constituted ~7% of the hydrocoral tissue samples (DW). No significant differences were observed in the content of either component between unbleached and bleached fragments.

Given that Symbiodinaceae algae carry out photosynthesis and transfer more than 50% of their photosynthetic products to their cnidarian hosts (Venn et al. 2008, Yellowlees et al. 2008, Davy et al. 2012, Fransolet et al. 2012), we explored whether a decline in symbiont density resulted in an increase in the consumption of energy sources, including stores of carbohydrates, lipids, and proteins. Carbohydrate content was not modified in bleached *M. alcicornis* specimens, which suggests that a carbohydrate deficit induced by the departure of symbionts could be attenuated by an increase in heterotrophic feeding. This result supports our previous observation that hemolytic and proteolytic activity and the activity of phospholipase A2 in the soluble proteome of bleached *M. alcicornis* were not modified, with bleached specimens showing a higher expression of cytolytic toxins potentially involved in prey capture and digestion than those of unbleached specimens (Olguín-López et al. 2019). Moreover, studies carried out in scleractinian corals have demonstrated that some corals are able to recover from bleaching events by increasing heterotrophic feeding rates and the percent contribution of heterotrophically acquired carbon to daily animal respiration (CHAR; Grottoli et al. 2006, Aichelman et al. 2016).

Lipids were the second most abundant organic compounds in unbleached *M. alcicornis* tissues (approximately 14.7%), while the lipid percentage in bleached specimens was only 2.9%. Previous studies have found that the lipid percentage in dry tissues of unbleached scleractinian corals varies from 12% in *Porites porites* to 30% in *Orbicella annularis* (Harland et al. 1992). As observed with *M. alcicornis*, lipid levels were significantly lower in bleached *Porites divaricate* and *Porites compressa* specimens when compared to those of unbleached specimens (Grottoli et al. 2004, Levas et al. 2018). High energy reserves may play a central role in long-term recovery from bleaching, as coral species that possess high energy reserves have better chances of overcoming the negative effects of bleaching events (Schoepf et al. 2015). Therefore, our results suggest that bleached *M. alcicornis*

blanqueados, lo que sugiere una disminución en la deposición de carbonato de calcio. No sorprendió el hecho de que el exoesqueleto de especímenes blanqueados no mostró cambios evidentes en el entrecruzamiento regular de barras sólidas y cristales de aragonita, ya que se esperaba observar modificaciones en el proceso de calcificación en los primeros centros de mineralización, no en los cristales fibrosos de aragonita ya formados.

Está bien demostrado que el estrés térmico reduce la calcificación y provoca una expresión diferencial de genes y proteínas involucradas en vías reguladoras asociadas con la biomineralización de los exoesqueletos de coral en *Acropora palmata*, *Montastraea faveolata*, *Acropora Millepora*, *Galaxea astreata*, *Porites astreoides*, *Porites divaricata* y *O. faveolata* (Desalvo et al. 2008, Rodríguez-Lanetty et al. 2009, De Salvo et al. 2010, Moya et al. 2012, Ricaurte et al. 2016, D'Olivo y McCulloch 2017, Huang et al. 2018, Levas et al. 2018). El carbonato de calcio constituyó la mayor parte del exoesqueleto (PS) de los especímenes de *M. alcicornis*, tanto los blanqueados y los sin blanquear. El material refractario (proteínas insolubles) representó aproximadamente el 7% del tejido de los hidrocorales (PS). No se observaron diferencias significativas en los contenidos de ambos componentes entre los fragmentos blanqueados y sin blanquear.

Considerando que las algas Symbiodinaceae realizan la fotosíntesis y transfieren más del 50% de sus productos fotosintéticos a sus hospederos cnidarios (Venn et al. 2008, Yellowlees et al. 2008, Davy et al. 2012, Fransolet et al. 2012), exploramos si la disminución en la densidad de simbioses provocó un incremento en el consumo de fuentes de energía, incluidas las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas. El contenido de carbohidratos no se modificó en los especímenes blanqueados de *M. alcicornis*, lo que sugiere que el déficit de carbohidratos provocado por la pérdida de los simbioses podría atenuarse por un aumento en la alimentación heterótrofa. Este resultado apoya nuestra observación anterior de que la actividad hemolítica y proteolítica y la actividad de la fosfolipasa A2 en el proteoma soluble de *M. alcicornis* no se modificaron, siendo los especímenes blanqueados los que mostraron una mayor expresión de toxinas citolíticas potencialmente involucradas en la captura y digestión de presas en comparación con los especímenes no blanqueados (Olguín-López et al. 2019). Además, los estudios realizados en corales escleractinios han demostrado que algunos corales pueden recuperarse de un evento de blanqueamiento aumentando su tasa de alimentación heterótrofa y el porcentaje de contribución de carbono adquirido heterótrofamente a la respiración animal diaria (CHAR, por sus siglas en inglés; Grottoli et al. 2006, Aichelman et al. 2016).

Los lípidos fueron los segundos compuestos orgánicos más abundantes en los tejidos de *M. alcicornis* sin blanquear (aproximadamente 14.7%), mientras que el porcentaje de lípidos en las muestras blanqueadas fue solo 2.9%. El porcentaje de lípidos en tejidos secos de corales escleractinios sin blanquear varía del 12% en *Porites porites* al 30% en

compensates for its nutritional deficiency by utilizing its lipid reserves.

Both refractory material (insoluble proteins) and soluble protein content were significantly higher in bleached *M. alcicornis* specimens than in unbleached specimens. Previous studies that have employed proteomic and transcriptomic approaches have demonstrated that corals show changes in protein synthesis and folding after bleaching events (Ricaurte et al. 2016, Hou et al. 2018, Mayfield et al. 2018). However, the results obtained to date related to the effects of thermal stress on the protein content in reef-forming cnidarians remain inconclusive. For example, *Aiptasia pallida* was found to accumulate amino acids and their intermediates after being exposed to thermal stress. However, bleached *Acropora aspera* specimens exhibited a decrease in the levels of amino acids and other metabolites (Hillyer et al. 2016, 2017). In the present study, the importance of high protein levels in bleached hydrocorals was unclear.

If resilience and recovery from bleaching events depends upon heterotrophic plasticity, shifts in endosymbiont types, and energy reserves (Grottoli et al. 2006, 2014; Anthony et al. 2009; Connolly et al. 2012), it is possible to hypothesize that an increase in heterotrophic feeding and the use of energy reserves and a higher abundance of thermotolerant *Durisdinium* symbionts may constitute some of the mechanisms of resilience developing within *M. alcicornis* that counteract the effects of global warming.

The present study provides evidence that the 2015–2016 El Niño induced a decrease in calcification and changes in the exoskeleton microstructure of *M. alcicornis* in the Mexican Caribbean. The increase in seawater temperatures modified the biochemical composition of these organisms, resulting in a notable decrease in lipid levels, which suggests that bleached hydrocorals use metabolic reserves to maintain cellular activities necessary for their survival, even at the expense of limiting important processes such as calcification. *Symbiodinium*, *Breviolum*, *Cladocopium*, and *Durisdinium* species were found in both unbleached and bleached specimens. The greater abundance of *Durisdinium* species in unbleached *M. alcicornis* specimens suggests that unbleached colonies were more thermotolerant due to their associations with these symbionts, which are tolerant to thermal stress.

Copyediting by MacTavish Scientific Editing.

REFERENCES

- Aichelman HE, Townsend JE, Courtney TA, Baumann JH, Davies SW, Castillo KD. 2016. Heterotrophy mitigates the response of the temperate coral *Oculina arbuscula* to temperature stress. *Ecol Evol.* 6(18):6758–6769. <https://doi.org/10.1002/ece3.2399>
- Ainsworth TD, Heron SF, Ortiz JC, Mumby PJ, Grech A, Ogawa D, Eakin CM, Leggat W. 2016. Climate change disables coral bleaching protection on the Great Barrier Reef. *Science.* 352(6283):338–342. <https://doi.org/10.1126/science.aac7125>

Orbicella annularis (Harland et al. 1992). Como en el caso de *M. alcicornis*, los niveles de lípidos fueron significativamente más bajos en las muestras de *Porites divaricate* y *Porites compressa* blanqueadas en comparación con los niveles en las muestras no blanqueadas (Grottoli et al. 2004, Levas et al. 2018). Los altos niveles de reservas de energía podrían jugar un papel central en la recuperación a largo plazo del blanqueamiento, ya que las especies de coral que poseen altas reservas de energía tienen mejores posibilidades de superar un evento de blanqueamiento (Schoepf et al. 2015). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que *M. alcicornis* blanqueada compensa su deficiencia nutricional utilizando sus reservas de lípidos.

Tanto el contenido de material refractario (proteínas insolubles) como el contenido de proteínas solubles fueron significativamente mayores en los especímenes blanqueados de *M. alcicornis* que en las muestras no blanqueadas. Estudios previos que han empleado enfoques proteómicos y transcriptómicos han demostrado que los corales muestran una alteración en la síntesis y plegamiento de proteínas después de haber sido expuestos a un evento de blanqueamiento (Ricaurte et al. 2016, Hou et al. 2018, Mayfield et al. 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha relacionados con el efecto del estrés térmico sobre el contenido de proteínas en cnidarios formadores de arrecifes no son concluyentes. Por ejemplo, *Aiptasia pallida* mostró una acumulación de aminoácidos y sus intermediarios después de estar expuesta a estrés térmico. Sin embargo, los especímenes blanqueados de *Acropora aspera* mostraron una disminución en los niveles de este tipo de metabolitos (Hillyer et al. 2017, 2016). En el caso del presente estudio, la importancia de los niveles altos de proteína en los hidrocorales blanqueados no fue clara.

Si la resiliencia y la recuperación de eventos de blanqueamiento se basan en la plasticidad heterótrofa, los cambios en el tipo de endosimbionte y los niveles de reservas de energía (Grottoli et al. 2006, 2014; Anthony et al. 2009; Connolly et al. 2012), es posible hipotetizar que un aumento en la alimentación heterótrofa y en uso de reservas energéticas y una mayor abundancia de simbioses termotolerantes del género *Durisdinium* son algunos de los mecanismos de resiliencia que está desarrollando *M. alcicornis* para contrarrestar los efectos de calentamiento global.

El presente estudio proporciona evidencia de que el evento El Niño 2015–2016 indujo una disminución en la calcificación y cambios en la microestructura del exoesqueleto de especímenes de *M. alcicornis* pertenecientes a colonias que habitan el Caribe mexicano. El aumento de la temperatura del mar modificó la composición bioquímica de estos organismos y provocó una importante disminución de los niveles de lípidos, lo que sugiere que los hidrocorales blanqueados están utilizando sus reservas metabólicas para mantener la actividad celular necesaria para su supervivencia, incluso a costa de limitar procesos importantes, como la calcificación. Las especies de *Symbiodinium*, *Breviolum*, *Cladocopium* y *Durisdinium* se encontraron tanto en especímenes no

- Anthony KRN, Helmstedt KJ, Bay LK, Fidelman P, Hussey KE, Lundgren P, Mead D, McLeod IM, Mumby PJ, Newlands M, et al. 2020. Interventions to help coral reefs under global change—A complex decision challenge. *Plos one*. 15:e0236399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236399>
- Anthony KRN, Hoogenboom MO, Maynard JA, Grottoli AG, Middlebrook R. 2009. Energetics approach to predicting mortality risk from environmental stress: a case study of coral bleaching. *Funct Ecol*. 23(3):539-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01531.x>
- Baker AC, Correa AMS, Cunning R. 2017. Chapter 13—Diversity, distribution and stability of *Symbiodinium* reef corals of the Eastern Tropical Pacific, Persistence and Loss in a Dynamic Environment. In: Glynn PW, Manzello DP, Enochs IC (eds.), *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific, Coral Reefs of the World*. Netherlands: Springer. p. 405-420. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4>
- Bay RA, Palumbi SR. 2015. Rapid acclimation ability mediated by transcriptome changes in reef-building corals. *GBE*. 7(6):1602-1612. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv085>
- Colombo-Pallotta MF, Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R. 2010. Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs*. 29:899-907. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0638-x>
- Connolly SR, Lopez-Yglesias MA, Anthony KRN. 2012. Food availability promotes rapid recovery from thermal stress in a scleractinian coral. *Coral Reefs*. 31:951-960. <https://doi.org/10.1007/s00338-012-0925-9>
- Correa AMS, McDonald MD, Baker AC. 2009. Development of clade-specific *Symbiodinium* primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Mar Biol*. 156:2403-2411. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1263-5>
- Davy SK, Allemann D, Weis VM. 2012. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 76(2):229-261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>
- De Salvo MK, Sunagawa S, Voolstra CR, Medina M. 2010. Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Mar Ecol Prog Ser*. 402:97-113. <https://doi.org/10.3354/meps08372>
- Desalvo MK, Voolstra CR, Sunagawa S, Schwarz JA, Stillman JH, Coffroth MA, Szmant AM, Medina M. 2008. Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Mol Ecol*. 17(17):3952-3971. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03879.x>
- D'Olivo JP, McCulloch MT. 2017. Response of coral calcification and calcifying fluid composition to thermally induced bleaching stress. *Sci Rep*. 7:2207. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02306-x>
- Eakin CM, Sweatman HPA, Brainard RE. 2019. The 2014–2017 global-scale coral bleaching event: insights and impacts. *Coral Reefs*. 38:539-545. <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01844-2>
- Foster NL, Attrill MJ. 2021. Chapter 20 - Changes in coral reef ecosystems as an indication of climate and global change. In: Letcher TM (ed.), *Climate Change, Observed Impacts on Planet Earth*. 3rd ed. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier. p. 427-443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821575-3.00020-7>
- Frank U, Brickner I, Rinkevich B, Loya Y, Bak RPM, Achituv Y, Ilan M. 1995. Allogeneic and xenogeneic interactions in reef-building corals may induce tissue growth without calcification. *Mar Ecol Prog Ser*. 124:181-188. <https://doi.org/10.3354/meps124181>
- blanqueados como en especímenes blanqueados. La mayor abundancia de especies de *Durisdinium* en especímenes de *M. alcicornis* sin blanquear sugiere que las colonias sin blanquear eran más termotolerantes debido a sus asociaciones con estos simbiontes, los cuales son tolerantes al estrés térmico.
- Traducido al español por los autores.
-
- Fransolet D, Roberty S, Plumier JC. 2012. Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and *Symbiodinium*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 420–421:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.03.015>
- García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C, Iglesias-Prieto R. 2011. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *J Exp Mar Biol Ecol*. 396(2):171-176. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.10.021>
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Juarez C. 2004. Lipids and stable carbon isotopes in two species of Hawaiian corals, *Porites compressa* and *Montipora verrucosa*, following a bleaching event. *Mar Biol*. 145:621-631. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1337-3>
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE. 2006. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature*. 440:1186-1189. <https://doi.org/10.1038/nature04565>
- Grottoli AG, Warner ME, Levas SJ, Aschaffenburg MD, Schoepf V, McGinley M, Baumann J, Matsui Y. 2014. The cumulative impact of annual coral bleaching can turn some coral species winners into losers. *Glob Chang Biol*. 20(12):3823-3833. <https://doi.org/10.1111/gcb.12658>
- Harland AD, Davies PS, Fixter LM. 1992. Lipid content of some Caribbean corals in relation to depth and light. *Mar Biol*. 113:357-361. <https://doi.org/10.1007/BF00349159>
- Hernández-Elizárraga VH, Olgún-López N, Hernández-Matehuala R, Ocharán-Mercado A, Cruz-Hernández A, Guevara-González RG, Caballero-Pérez J, Ibarra-Alvarado C, Sánchez-Rodríguez J, Rojas-Molina A. 2019. Comparative analysis of the soluble proteome and the cytolytic activity of unbleached and bleached *Millepora complanata* (“Fire Coral”) from the Mexican Caribbean. *Mar drugs*. 17(7):393. <https://doi.org/10.3390/md17070393>
- Hillyer KE, Dias D, Lutz A, Roessner U, Davy SK. 2018. 13C metabolomics reveals widespread change in carbon fate during coral bleaching. *Metabolomics*. 14:12. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1306-8>
- Hillyer KE, Dias DA, Lutz A, Wilkinson SP, Roessner U, Davy SK. 2017. Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in the coral *Acropora aspera*. *Coral Reefs*. 36:105-118. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1508-y>
- Hillyer KE, Tumanov S, Villas-Bôas S, Davy SK. 2016. Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in a model cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *J Exp Biol*. 219(4):516-527. <https://doi.org/10.1242/jeb.128660>
- Hou J, Xu T, Su D, Wu Y, Cheng L, Wang J, Zhou Z, Wang Y. 2018. RNA-Seq reveals extensive transcriptional response to heat

- stress in the stony coral *Galaxea fascicularis*. *Front Genet.* 9:37.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00037>
- Huang Y, Yuan J, Zhang Y, Peng H, Liu L. 2018. Molecular cloning and characterization of calmodulin-like protein CaLP from the Scleractinian coral *Galaxea astreata*. *Cell Stress Chaperon.* 23(6):1329-1335.
<https://doi.org/10.1007/s12192-018-0907-0>
- Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH, Baum JK, Berumen ML, Bridge TC, et al. 2018. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science.* 359(6371):80-83.
<https://doi.org/10.1126/science.aan8048>
- Jones AM, Berkemans R, van Oppen MJH, Mieog JC, Sinclair W. 2008. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc Royal Soc B Biol Sci.* 275:1359-1365.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0069>
- Kemp DW, Hernandez-Pech X, Iglesias-Prieto R, Fitt WK, Schmidt GW. 2014. Community dynamics and physiology of *Symbiodinium* spp. before, during, and after a coral bleaching event. *Limnol Oceanogr.* 59(3):788-797.
<https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.3.0788>
- Kennedy EV, Foster NL, Mumby PJ, Stevens JR. 2015. Widespread prevalence of cryptic *Symbiodinium* D in the key Caribbean reef builder, *Orbicella annularis*. *Coral Reefs.* 34:519-531.
<https://doi.org/10.1007/s00338-015-1264-4>
- LaJeunesse TC. 2002. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar Biol.* 141:387-400.
<https://doi.org/10.1007/s00227-002-0829-2>
- LaJeunesse TC. 2004. "Species" radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Mol Biol Evol.* 22(3):570-581.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi042>
- LaJeunesse TC, Smith RT, Finney J, Oxenford H. 2009. Outbreak and persistence of opportunistic symbiotic dinoflagellates during the 2005 Caribbean mass coral 'bleaching' event. *Proc Royal Soc B Biol Sci.* 276:4139-4148.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1405>
- Le Tissier MDA. 1990. The ultrastructure of the skeleton and skeletogenic tissues of the temperate coral *Caryophyllia smithii*. *J Mar Biol Assoc UK.* 70(2):295-310.
<https://doi.org/10.1017/S0025315400035414>
- Le Tissier MDA. 1991. The nature of the skeleton and skeletogenic tissues in the Cnidaria. *Hydrobiologia.* 216(1):397-402.
<https://doi.org/10.1007/BF00026492>
- Levas S, Grottoli AG, Schoepf V, Aschaffenburg M, Baumann J, Bauer JE, Warner ME. 2016. Can heterotrophic uptake of dissolved organic carbon and zooplankton mitigate carbon budget deficits in annually bleached corals? *Coral Reefs.* 35:495-506.
<https://doi.org/10.1007/s00338-015-1390-z>
- Levas S, Schoepf V, Warner ME, Aschaffenburg M, Baumann J, Grottoli AG. 2018. Long-term recovery of Caribbean corals from bleaching. *J Exp Mar Biol Ecol.* 506:124-134.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.06.003>
- Lough JM, Anderson KD, Hughes TP. 2018. Increasing thermal stress for tropical coral reefs: 1871–2017. *Sci Rep.* 8:6079.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24530-9>
- Marshall PA, Baird AH. 2000. Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: differential susceptibilities among taxa. *Coral Reefs.* 19:155-163.
<https://doi.org/10.1007/s003380000086>
- Mayfield AB, Chen YJ, Lu CY, Chen CS. 2018. The proteomic response of the reef coral *Pocillopora acuta* to experimentally elevated temperatures. *Plos one.* 13:e0192001.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192001>
- McLachlan RH, Price JT, Solomon SL, Grottoli AG. 2020. Thirty years of coral heat-stress experiments: a review of methods. *Coral Reefs.* 39:885-902.
<https://doi.org/10.1007/s00338-020-01931-9>
- Mieog JC, van Oppen MJH, Cantin NE, Stam WT, Olsen JL. 2007. Real-time PCR reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four scleractinian corals across the Great Barrier Reef: implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs.* 26:449-457.
<https://doi.org/10.1007/s00338-007-0244-8>
- Moya A, Ganot P, Furla P, Sabourault C. 2012. The transcriptomic response to thermal stress is immediate, transient and potentiated by ultraviolet radiation in the sea anemone *Anemonia viridis*. *Mol Ecol.* 21(5):1158-1174.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05458.x>
- Muller-Parker G, D'Elia CF, Cook CB. 2015. Interactions between corals and their symbiotic algae. In: Birkeland C (ed.), *Coral Reefs in the Anthropocene*. Dordrecht (Netherlands): Springer. p. 99-116.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5_5
- Oakley CA, Durand E, Wilkinson SP, Peng L, Weis VM, Grossman AR, Davy SK. 2017. Thermal shock induces host proteostasis disruption and endoplasmic reticulum stress in the model symbiotic cnidarian *Aiptasia*. *J Proteome Res.* 16(6):2121-2134.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00797>
- Olguín-López N, Hernández-Elizárraga VH, Hernández-Matehuala R, Cruz-Hernández A, Guevara-González R, Caballero-Pérez J, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A. 2019. Impact of El Niño-Southern Oscillation 2015-2016 on the soluble proteomic profile and cytolytic activity of *Millepora alcicornis* ("fire coral") from the Mexican Caribbean. *PeerJ Aquat Biol.* 7:e6593.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6593/supp-1>
- Oliver JK, Berkemans R, Eakin CM. 2009. Coral bleaching in space and time. In: van Oppen MJH, Lough JM (eds.), *Coral Bleaching*. Berlin, Heidelberg (Germany): Springer. p. 21-39.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-69775-6_3
- Oliver TA, Palumbi SR. 2011. Many corals host thermally resistant symbionts in high-temperature habitat. *Coral Reefs.* 30:241-250.
<https://doi.org/10.1007/s00338-010-0696-0>
- Pereira-Dias TL, Gondim AI. 2016. Bleaching in scleractinians, hydrocorals, and octocorals during thermal stress in a northeastern Brazilian reef. *Mar Biodivers.* 46:303-307.
<https://doi.org/10.1007/s12526-015-0342-8>
- Reynolds JM, Bruns BU, Fitt WK, Schmidt GW. 2008. Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *PNAS.* 105(36):13674-13678.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805187105>
- Ricaurte M, Schizas NV, Ciborowski P, Boukli NM. 2016. Proteomic analysis of bleached and unbleached *Acropora palmata*, a threatened coral species of the Caribbean. *Mar Poll Bull.* 107(1):224-232.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.068>
- Rodriguez-Lanetty M, Harii S, Hoegh-Guldberg O. 2009. Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Mol Ecol.* 18(24):5101-5114.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04419.x>
- Rodríguez L, López C, Casado-Amezua P, Ruiz-Ramos DV, Martínez B, Banaszak A, Tuya F, García-Fernández A, Hernández M. 2019. Genetic relationships of the hydrocoral *Millepora alcicornis* and its symbionts within and between locations across the Atlantic. *Coral Reefs.* 38:255-268.
<https://doi.org/10.1007/s00338-019-01772-1>

- Rojas-Molina A, García-Arredondo A, Ibarra-Alvarado C, Bah MM. 2012. *Millepora* (“fire corals”) species: toxinological studies until 2011. *Adv Env Res*. 26:133-48.
- Ruiz-Jones LJ, Palumbi SR. 2017. Tidal heat pulses on a reef trigger a fine-tuned transcriptional response in corals to maintain homeostasis. *Sci Adv*. 3(3):e1601298. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601298>
- Salgado A, Veiralves T, Lamarão FR, Assumpção LL, Gomes D, Jascone L, Valadão AL, Albano RM, Lôbo-Hajdu G. 2007. Field preservation and optimization of a DNA extraction method for Porifera. In: Custodio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (eds.), *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Rio de Janeiro (Brazil): Série Livros 28, Museu Nacional. p. 555-560.
- Sampayo EM, Ridgway T, Bongaerts P, Hoegh-Guldberg O. 2008. Bleaching susceptibility and mortality of corals are determined by fine-scale differences in symbiont type. *PNAS*. 105(30):10444-10449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708049105>
- Santos SR, Shearer TL, Hannes AR, Coffroth MA. 2004. Fine-scale diversity and specificity in the most prevalent lineage of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyceae) of the Caribbean. *Mol Ecol*. 13(2):459-469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.02058.x>
- Schoepf V, Grottoli AG, Levas SJ, Aschaffenburg MD, Baumann JH, Matsui Y, Warner ME. 2015. Annual coral bleaching and the long-term recovery capacity of coral. *Proc R Soc B*. 282:20151887. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1887>
- Shirur KP, Ramsby BD, Iglesias-Prieto R, Goulet TL. 2014. Biochemical composition of Caribbean gorgonians: Implications for gorgonian — *Symbiodinium* symbiosis and ecology. *J Exp Mar Biol Ecol*. 461:275-285. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.08.016>
- Silverstein RN, Cunning R, Baker AC. 2015. Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Glob Chang Biol*. 21(1):236-249. <https://doi.org/10.1111/gcb.12706>
- Suggett DJ, Smith DJ. 2020. Coral bleaching patterns are the outcome of complex biological and environmental networking. *Glob Chang Biol*. 26(1):68-79. <https://doi.org/10.1111/gcb.14871>
- Swain TD, Westneat MW, Backman V, Marcelino LA. 2018. Phylogenetic analysis of symbiont transmission mechanisms reveal evolutionary patterns in thermotolerance and host specificity that enhance bleaching resistance among vertically transmitted *Symbiodinium*. *Eur J Phycol*. 53(4):443-459. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1466200>
- Tambuté E, Tambuté S, Segonds N, Zoccola D, Venn A, Erez J, Allemand D. 2012. Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification. *Proc Royal Soc B Biol Sci*. 279:19-27. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733>
- Tremblay P, Gori A, Maguer JF, Hoogenboom M, Ferrier-Pagès C. 2016. Heterotrophy promotes the re-establishment of photosynthate translocation in a symbiotic coral after heat stress. *Sci Rep*. 6:srep38112. <https://doi.org/10.1038/srep38112>
- Venn AA, Loram JE, Douglas AE. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J Exp Bot*. 59(5):1069-1080. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm328>
- Wagner DE, Kramer P, van Woesik R. 2010. Species composition, habitat, and water quality influence coral bleaching in southern Florida. *Mar Ecol Prog Ser*. 408:65-78. <https://doi.org/10.3354/meps08584>
- Yellowlees D, Rees TAV, Leggat W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ*. 31(5):679-694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x>