




Polyamines levels in *Pocillopora capitata* reef coral and their relationship to Central Mexican Pacific tides

Niveles de Poliaminas en el coral *Pocillopora capitata* y su Relación con las Mareas del Pacífico Central Mexicano

Barrientos Ramírez, L.¹, Torres Ortiz, M.³, Noa Pérez, M.², Ruiz López, M. A.³, Enciso Padilla, I.⁴, Vargas-Radillo, J. J.¹, Reynoso Orozco, R.^{5*} 

¹Universidad de Guadalajara, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Cucei, México. Universidad de Guadalajara, ²Departamento de Salud Pública, ³Departamento de Botánica y Zoología, ⁴Departamento de Ecología, ⁵Departamento de Biología Celular y Molecular; Cucba, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Barrientos Ramírez, L., Torres Ortiz, M., Noa Pérez, M., Ruiz López, M. A., Enciso Padilla, I., Vargas-Radillo, J. J., Reynoso Orozco, R. (2019). Polyamines levels in *Pocillopora capitata* reef coral and their relationship to Central Pacific Mexican tides. *Revista Bio Ciencias* 6, e545. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.01.19>



ABSTRACT

Polyamines are thought to be healers of stress-induced physiological damage in plants. It may be assumed that this healing function applies to coral as well, and that polyamines could be a marker of physiological state in these organisms. The levels of Putrescine, Spermidine and Spermine polyamines were measured in three different sites of coral reefs of the Central Mexican Pacific coasts. One of these sites, Playa Mora, exhibited a low tide which almost exposed the coral above the sea level. Tide levels and polyamines in coral samples were measured during February and October from 2012 to 2016. Surprisingly, the highest polyamines levels were measured during October, at a period when the highest tides and precipitations, were recorded with $(42.91 \pm 1.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2)$ of Putrescine, $5.31 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Spermidine and $12.10 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 6th 2018.

Accepted/Aceptado: October 20th 2018.

Available on line/Publicado: March 25th 2019.

RESUMEN

Se cree que las poliaminas son restauradores del daño fisiológico inducido por el estrés en las plantas. Se podría suponer que esta función benéfica de curación también se aplica al coral, y que las poliaminas podrían ser un marcador del estado fisiológico en estos organismos. Los niveles de las poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina se midieron en tres sitios diferentes de arrecifes de coral de la costa del Pacífico Central Mexicano. Uno de estos sitios, Playa Mora, exhibió una marea baja que casi expuso al coral sobre el nivel del agua. Los niveles de marea y las poliaminas en las muestras se midieron durante febrero y octubre del año 2012 a 2016. Sorprendentemente, los niveles más altos de poliaminas ($42.91 \pm 1.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Putrescina, $5.31 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Espermidina, y $12.10 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Espermina) se observaron durante octubre, una época en la que se registraron las mareas más altas y precipitación pluvial. En cambio, los niveles más bajos de poliaminas ($1.35 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Putrescina, $0.15 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Espermidina, y $0.07 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Espermina) se vieron durante febrero, el mes con las mareas y precipitación más bajas.

*Corresponding Author:

Reynoso Orozco, R. Universidad de Guadalajara, Departamento de Biología Celular y Molecular, Cucba, Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100, Nextipac, Zapopan, Jalisco; México. Phone: +52(33)3777 1150, Ext: 33246. E-mail: ramon.reynoso@academicos.udg.mx

Spermine). The lowest polyamines levels were observed during February, the month with the lowest tides and precipitations, with $1.35 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Putrescine, $0.15 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Spermidine and $0.07 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Spermine. A relation between Spermidine and Spermine concentrations, and tide levels was established. It could be speculated that Polyamines levels are correlated with physiological stress levels of coral reef in these zones of the Central Mexican Pacific coast.

KEY WORDS

Stony coral reef, stress, healers, Pacific.

Introduction

Putrescine (Pu), Spermidine (Spd) and Spermine (Spm) polyamines (PAs) are ubiquitous molecules essential for the growth and survival of organisms (Kusano *et al.*, 2008); as well for the replication, transcription, translation, modulation of ionic and receptor binding channels, and for the stabilization of many glycoproteins (Brooks, 2013). PAs are conserved from bacteria to animals and plants with some variations in their biosynthetic pathways (Tabor & Tabor, 1984). The synthesis essentially starts from L-arginine and L-methionine precursors (Smirnova *et al.*, 2018). Although genes encoding for the enzymes, which participate in PAs metabolic pathways and metabolome, are known (Panicot *et al.*, 2002), the dynamics of its expression during environmental changes has not been investigated yet. However, the importance of PAs participation in stress response is obvious, due to the increasing number of research works showing changes in PAs levels associated to diverse kinds of stress (Smirnova *et al.*, 2018; Satish *et al.*, 2018; Majumdar *et al.*, 2017; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014). Total intracellular concentration of PAs is in the range of various hundreds of micromoles to a few millimoles and is tightly regulated, since the highest levels of PAs are toxic for cells and drive to cellular death (Dong-Hun *et al.*, 2018). PAs levels are regulated in various steps including *de novo* synthesis, degradation and transport; as well, limiting enzymes of its metabolism are used to sustain distinct effects due to stimuli they are subjected to (Ou *et al.*, 2016), making them adequate regarding

Se estableció la asociación entre la concentración de Espermidina y Espermina y los niveles de marea. Se podría especular que los niveles de poliaminas se correlacionan con los niveles de estrés fisiológico del arrecife de coral en estas zonas de la costa del Pacífico Central Mexicano.

PALABRAS CLAVE

Coral pétreo, estrés, restauradores, Pacífico.

Introducción

Las poliaminas (PAs) Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm) son moléculas ubicuas esenciales para el crecimiento y supervivencia de los organismos (Kusano *et al.*, 2008); así como para la replicación, la transcripción, la traducción, modulación de los canales iónicos y de unión a receptores, y para estabilización de muchas glicoproteínas (Brooks, 2013). Las PAs se conservan de bacterias a animales y plantas, con algunas variaciones en sus vías biosintéticas (Tabor & Tabor 1984). La síntesis esencialmente parte de los precursores L-arginina y L-metionina (Smirnova *et al.*, 2018). Aunque se conocen los genes que codifican para las enzimas participantes en las vías metabólicas de las PAs y su metabolón (Panicot *et al.*, 2002), pero la dinámica de su expresión durante los cambios ambientales aún no se ha investigado. Sin embargo, es evidente la importancia de la participación de las PAs en la respuesta al estrés, dado el creciente número de trabajos que muestran cambios en los niveles de PAs asociados a diversas formas de estrés (Smirnova *et al.*, 2018; Satish *et al.*, 2018; Majumdar *et al.*, 2017; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014). La concentración intracelular total de PAs está en el rango de varios cientos de micromoles a unos pocos milimoles y está estrechamente regulado, ya que los niveles más altos de PAs son tóxicos para las células y conducen a la muerte celular (Dong-Hu, *et al.*, 2018). Los niveles de PAs se regulan en varias etapas incluyendo la síntesis de novo, degradación y transporte; también las enzimas limitantes de su metabolismo suelen sufrir distintos efectos por los estímulos a que son sometidas (Ou *et al.*, 2016), lo que las hace apropiadas respecto a otros marcadores moleculares menos económicos utilizados en *P. capitata* (Delgadillo-Nuño *et al.*, 2014; Liñán-Cabello *et al.*, 2010a; Liñán-Cabello *et al.*, 2010b). En los tejidos vegetales la acumulación de Especies Oxígeno Reactivas (ROS) y PAs durante las tensiones abióticas y bióticas se consideran restauradores del daño inducido por el

other less economical molecular markers used in *P. capitata* (Delgadillo-Nuño et al., 2014; Liñán-Cabello et al., 2010a; Liñán-Cabello et al., 2010b). In vegetal tissues the accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS) and PAs during abiotic and biotic tensions are considered as healers of stress-induced damage and active elements of signaling cascade of such phenomenon, more than being collateral consequences of metabolic changes (Shabala & Pottosin, 2014). Therefore, its levels could be associated to the physiological state of organisms, depending on environmental conditions in which they are.

Since depth, and therefore irradiation, affect productivity in coral reefs (Lesser et al., 2000), studies with molecular markers associated to the survival of these organisms in environmental changes are required (Buckley & Szmant, 2004). Among other physicochemical and optical characteristics, light incidence has been observed to be altered, including in Photosynthetically Active Radiation (PAR, 400-700 nm) in sites where the tide falls below the normal average (Banaszak & Lesser, 2009), like in Playa Mora, one of the sampled sites in this study. Moreover, the submarine light field is modified by the incident light angle, light absorption and dispersion by dissolved materials, as well as by particles in water. As well, the illuminated environment is an important component of coral reef productivity, physiology and ecology (Lesser et al., 2000). In symbiotic zooxanthellae found in coral reefs, there are microsporine-like amino acids (MAA), working by absorbing UV radiation between 330 and 360 nm, in which a probable similar function to the one of PAs has been described, and causing the loss of a methyl group, when analyzing them with an ion trap and in standard conditions (Whitehead & Hedges, 2003). The present study tries to determine Pu, Spd and Spm levels in three areas of the Central Mexican Pacific (CMP) coast with coral reef development of *P. capitata*, subjected to extreme variations in sea level. The objective is to assess the concentration of such PAs in *P. capitata* and the possible differences in the levels of these compounds of coral reefs, obtained under environmental conditions in two contrasting periods of the year, February, in which sea level significantly falls, and October, in which corals are always immersed in water. In the particular case of Playa Mora, the coral development of this site remains emerged during February, therefore environmental effects may be more obvious, compared to both systems of *Pocillopora* genus in Chamela Bay, located in always immersed sites.

estrés, y elementos activos de cascadas de señalización de dicho fenómeno, más que ser consecuencias colaterales de los cambios metabólicos (Shabala & Pottosin, 2014), por lo que sus niveles podrían asociarse con el estado fisiológico de los organismos, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentren.

Dado que la profundidad y por tanto la irradiación afectan la productividad en los corales (Lesser et al., 2000) se requieren estudios con marcadores moleculares que se asocien con la sobrevivencia de estos organismos en cambios ambientales (Buckley & Szmant, 2004). Entre otras características físico-químicas y ópticas, la incidencia de la luz se ve alterada, incluso en la Radiación Fotosintética Activa (PAR, 400-700 nm) en lugares donde la marea baja más allá del promedio normal (Banaszak & Lesser, 2009), como es en Playa Mora, uno de los sitios muestreados en este estudio. Además el campo de luz submarina se modifica por el ángulo de la luz incidente, la absorción y dispersión de la luz por los materiales disueltos, así como por las partículas en el agua. También se sabe que el ambiente luminoso es un componente importante de la productividad, fisiología y ecología de los corales (Lesser et al., 2000). En las zooxantelas simbiotes que se encuentran en los corales existen aminoácidos tipo Microsporina (MAA) que funcionan absorbiendo la radiación UV de entre 330 y 360 nm, en los cuales se ha descrito una probable función similar a la de PAs, y que provoca la pérdida de un grupo metilo cuando se analizan con trampa de iones y las condiciones estándares de la misma (Whitehead & Hedges, 2003). El presente estudio pretende determinar los niveles de Pu, Spd y Spm en tres áreas de la costa del Pacífico Central Mexicano (PCM) con desarrollo coralino de *P. capitata*, sujetas a variaciones extremas en el nivel de marea. El objetivo es evaluar la concentración de dichas PAs en *P. capitata* y las posibles diferencias en los niveles de estos compuestos de corales obtenidos bajo condiciones ambientales en dos épocas del año contrastantes, febrero en la que el nivel del agua baja de forma significativa, y octubre, en la que los corales están siempre cubiertos de agua. En el caso particular de Playa Mora, el desarrollo coralino de este sitio queda al descubierto durante febrero, por lo que los efectos medioambientales podrían ser más evidentes, comparado con los dos sistemas del género *Pocillopora* en Bahía Chamela, ubicados en sitios siempre cubiertos por el agua.

Materiales y Métodos

Para evaluar el estado de salud de las poblaciones del coral *P. capitata* en el PCM, utilizando las PAs como

Materials and Methods

To assess health status of *P. capitata* coral populations in CMP coasts, using PAs as molecular markers, the branch coral was sampled in two extreme environmental conditions: winter, when tide level presents the maximum lowest tide of the year and at the end of summer and beginning of autumn, when tide levels are at their highest during the year or maximum full tide. Moreover, diverse attributes were considered in the selection of coral colonies for sampling. Among them, in order of importance, there were: the green-brownish color of the colony, visual indicator of health, free of epibionts, and some apparent damage visually detected. Based on the afore-mentioned, eight fragments were sampled, between 5 and 10 cm in length for the branch of randomly selected colonies at a depth of 1.8 to 3.5 m in Piedra Bola (19°34'31.6" N, 105°07'59.4" W), Palmito (19°33'0.4" N, 105°06'20.7" W) and Playa Mora (19°16'49" N, 104°52'20" W) in February and October of 2014, with the help of SCUBA diving, latex gloves, hammer, chisel and dark plastic bag with Ziploc-type zipper. Samples were stored at 4 °C until its transfer to the Laboratory of Biotechnology of the University Center of Biological and Agricultural Sciences and stored at -20 °C for its further analysis.

The identification of *P. capitata* coral was realized under anatomical and structural criteria of the exoskeleton of each fragment with the help of taxonomical keys of Hodgson (1995) and Reyes-Bonilla *et al* (2005).

Chamela Bay

It has an extension of 2,364 km²; geologically here is the Cocos plate, subduction ridge and narrow platform, with cliffs, islands and jetties. In Chamela Bay, two sites were selected (Figure 1), to realize sampling of *P. capitata* coral fragments: Piedra Bola, with two big coral reefs separated from each other by a sandy area; and Palmito with isolated coral growth of *Poritas* sp.

Tenacatita Bay

It has an extension of 6.5 km and three main beaches are identified: Manzanilla, Tenacatita and Boca de Iguanas. The selected site is Playa Mora which is located at the northwestern tip of the bay.

marcadores moleculares se tomó muestra del coral ramoso en dos condiciones ambientales extremas; invierno, cuando el nivel de la marea se presenta la bajamar máxima del año, y a finales de verano y principios de otoño, cuando el nivel de marea es la más alta del año o pleamar máxima. Además, se consideraron diversos atributos en la elección de las colonias de coral a toma de muestra, entre ellos fueron en orden de importancia que la colonia presentara un tono verde-café, indicador visual de buena salud, libre de epibiontes y algún daño aparente detectado visualmente. Con base a lo anterior, se realizó la colecta de ocho fragmentos de entre 5 y 10 cm de longitud de rama en colonias seleccionadas al azar a una profundidad de 1.8 a 3.5 m en Piedra Bola (19°34'31.6" N, 105°07'59.4" O), Palmito (19°33'0.4" N 105°06'20.7") y Playa Mora (19°16'49" N. 104°52'20") en febrero y octubre de 2014, con la ayuda de buceo SCUBA, guantes de goma, martillo, cincel y bolsa oscura de plástico con cierre tipo ziploc. La muestra fue conservada a 4 °C hasta su traslado al laboratorio de Biotecnología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias y colocadas a -20 °C para su posterior análisis.

La identidad del coral *P. capitata* fue realizado bajo los criterios anatómicos y estructurales del exoesqueleto de cada fragmento con el apoyo de las claves taxonómicas Hodgson (1995) y Reyes-Bonilla *et al* (2005).

Bahía Chamela

Cuenta con una extensión de 2,364 km², geológicamente está la placa de cocos, fosa de subducción y plataforma estrecha, con acantilados, islas, y escolleras. En la bahía de chamela se seleccionaron dos sitios (Figura 1), para realizar los muestreos de fragmentos del coral *P. capitata*: Piedra Bola, con dos grandes borras coralinas separadas entre sí por una barra arenosa; y Palmito con crecimientos coralinos aislados de *Poritas* sp.

Bahía Tenacatita

Cuenta con una extensión de 6.5 km y se ubican tres principales playas: La Manzanilla, Tenacatita y Boca de Iguanas. El sitio seleccionado es Playa Mora que está ubicado en la punta noroeste de la bahía.

Nivel de marea en el Pacífico Central Mexicano (PCM). Registro de Mareas

Los valores mensuales del nivel de marea para el PCM fueron obtenidos de la(s) bases de datos de La Estación del Puerto de Manzanillo, Colima, México. Se

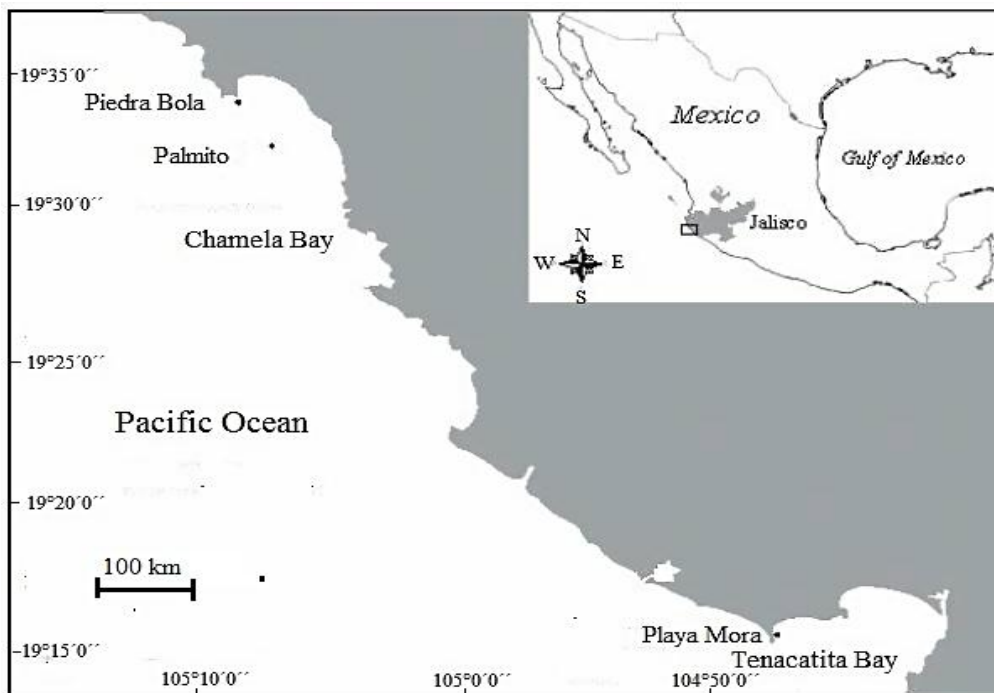


Figure 1. Coral reefs Location of *Pocillopora capitata* in the Central Mexican Pacific.
Figura 1. Localización de arrecifes de coral de *Pocillopora capitata* en el Pacífico Central Mexicano.

Tide level in CMP. Tide register

Monthly values of tide level for CMP were obtained from databases of the Station of Manzanillo port, Colima, Mexico. A period of five years was considered, from 2012 to 2016. The statistical analysis of the values of the tides was performed for the months of February and October of the five years.

Laboratory Analysis

Sample extraction

Eight replicas were cut from the 1 cm² fragments of coral for each sampling site and were macerated with 10 mL of acetone at a concentration of 90 % with distilled water as a solvent, they were left to rest for 2 h and the obtained supernatant was centrifuged at 6,000 rpm for 15 min. Later, 30 µL of diaminoheptane (1 nmol/µL) was added as an intern standard, and they were left to air-dry and at room temperature for 7 days. Later, they were

considered un período de cinco años, de 2012 a 2016. El análisis estadístico de los valores de las mareas fue realizado para los meses de febrero y octubre de los cinco años.

Análisis de Laboratorio

Extracción de la muestra

Se cortaron ocho réplicas de los fragmentos de 1 cm² de coral por cada sitio de muestreo y se maceraron con 10 mL de acetona a una concentración de 90 % con agua destilada como disolvente, se dejaron reposar por 2 h y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min, posteriormente se les colocó 30 µL de Diaminoheptano [1 nmol/µL] como estándar interno, y se dejó desecar al aire y a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente se resuspendió en 300 µL de Acetonitrilo (AcN) y se centrifugó (Labgene 1730R) a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C. En viales ámbar se agregó 40 µL de bicarbonato 20 mM, pH 12, más

resuspended in 300 μ L of acetonitrile (AcN) and then centrifuged (Labgene 1730R) at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C. Forty μ L of bicarbonate 20 mM, pH 12, 100 μ L of sample supernatant and 100 μ L of dansyl chloride (Sigma-Aldrich) were added in amber flasks, it was let overnight in darkness, then dried again with N₂ gas at 60 °C (dry bath-Labnet) and resuspended with 100 μ L of AcN to take it to Solid-Phase separation.

Equipment and chromatographic conditions

The HPLC system (VARIAN, Melbourne, Victoria, Australia) was used. It was equipped with Supelcosil™ LC-18 column (30 x 0.4 cm x 5 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, USA); UV-Vis detector (Varian 9050). The mobile phase used was an AcN-water solution (90 %-10 %) with a 1 mL/min flow. Spectrophotometric detection was performed at 450 nm and total time of the analysis was of 13 min.

Solid-Phase separation

To activate the cartridge (Hypersil ODSC₁₈), it was passed through 1 ml of methanol, then 1 mL of bicarbonate 20 mM, pH 12. Later, 1mL the resuspended sample in AcN was added and it was washed with 5 mL of HPLC-grade water. Sample was eluted 1.0 mL de can/min, at 26 °C. Finally, 20 μ L of sample were injected by duplicate in the chromatograph, all solvents were previously filtered. PAs recovering test was performed, recovering more than 80 % of Pu, Spd and Spm (data not shown).

Statistical analysis

Results were presented as $x \pm sd$ and were analyzed by means of a normality test at 95 % of confidence. Data were assessed by means of an analysis of variance (ANOVA) of two factors, using experimental variables, site and tide levels (mean for February and October for 5 years) pursuing with a Duncan's Multiple Range Test, to determine differences by site and tide level. Statistical analyses were realized with STATGRAPHICS Centurion XVII statistical software (©2014 Statpoint Technologies, Inc.).

Results and Discussion

Nowadays there are no reports determining PAs levels in coral. For this reason, we report some relevant aspects of the chromatographic study, such as the retention times for the three analyzed PAs, which were: 3.64 min for Pu; 5.88 min for Spd and 9.51 min for Spm. For the lower

100 μ L del sobrenadante de la muestra, además de 100 μ L de cloruro de dansilo (Sigma-Aldrich), se dejó durante toda la noche en oscuridad, se desecó nuevamente con N₂ gas a 60 °C (dry bath-Labnet) y se resuspendió con 100 μ L de AcN para llevarla a separación en Fase Sólida.

Equipo y condiciones cromatografías

Se utilizó el sistema HPLC (VARIAN, Melbourne, Victoria, Australia). Está equipado con columna Supelcosil™ LC-18 (30 x 0.4 cm x 5 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, USA); Detector UV-Vis (Varian 9050). La fase móvil utilizada fue una solución de AcN-Agua (90 %-10 %) con flujo de 1 mL/min. La detección espectrofotométrica se realizó a 450 nm y el tiempo total del análisis fue de 13 min.

Separación en Fase Sólida

Para activar el cartucho (Hypersil ODSC₁₈), se hizo pasar por un 1 mL de metanol, enseguida 1 mL de bicarbonato 20 mM con pH 12, después se agregó la muestra resuspendida en 1 mL de AcN y se lavó con 5 mL de agua grado HPLC, posteriormente se eluyó la muestra con 1 mL de AcN, velocidad de flujo 1,0 mL/min a 26 °C. Finalmente se inyectaron 20 μ L de muestra por duplicado en el cromatógrafo, todos los solventes fueron filtrados previamente. Se realizó la prueba de recuperación de PAs, rescatando más del 80 % de Pu, Spd, Spm (datos no presentados).

Análisis Estadístico

Los resultados son presentados como $x \pm sd$ y fueron analizados mediante la prueba de normalidad al 95 % de confianza. Los datos fueron evaluados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, utilizando las variables experimentales, sitio y nivel de marea (promedio para febrero y octubre durante 5 años) continuando con una prueba de comparación múltiple de Duncan, para determinar las diferencias por sitio y nivel de marea. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVII (©2014 Statpoint Technologies, Inc.).

Resultados y Discusión

No existen reportes que determinen los niveles de PAs en corales actualmente. Los tiempos de retención para las tres PAs analizadas se presentaron en 3.64 min para Pu; 5.88 min para Spd y 9.51 min para Spm. Para el límite inferior de detección se determinó en 35 pg/mL para Pu; 62 pg/

detection limit, 35 pg/mL was determined for Pu; 62 pg/mL for Spd and 45 pg/mL of Spm. For the upper limit detection, it was assessed up to a concentration of 80 µg/mL.

Although such molecules are considered as stress bioindicators in plants and one of the main molecular markers in this kingdom (Majumdar *et al.*, 2017); PAs participation and its changes in response to stress (Smirnova *et al.*, 2018; Satish *et al.*, 2018; Majumdar *et al.*, 2017; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014), make them a potential alternative to other indicators used in coral. However, more studies are required to allow to establish them as true stress-related indicators in such organisms.

A general evaluation of experimental data, show that the presence of PAs, Pu, Spd and Spm, in *P. capitata* coral tissue significantly varies among sites (Palmito, Piedra Bola and Playa Mora) and sampling time (February and October). Similarly, PAs concentration was significantly higher in October. If the presence of the different PAs is compared (Figures 1-3). The overall average was: 10.03 µg/cm² of Pu, 1.24 µg/cm² of Spd and 4.06 of Spm, with lower limits of 1.35±0.16 µg/cm² in Pu, 0.15±0.03 µg/cm² in Spd and 0.07 ± 0.02 µg/cm² in Spm and upper limits of 42.91 ± 1.40 µg/cm² in Pu, 5.31 ± 1.06 µg/cm² in Spd and 12.10 ± 0.75 µg/cm² in Spm. It is important to establish, the relation in PAs contents in *P. capitata* coral regarding studies reporting PAs levels in distinct tissues and/or fluids of animals, since there are no reports regarding corals. For instance, Khuhawar & Qureshi (2001) used concentrations at levels of µg/mg of creatine in urine; and the review by Teti *et al.* (2002) showed values ranging from nmol/mL of simple, not only for urine, but also for plasma, pmol/µL in red blood cells, urine and cells of lymphoma, as well as µg/mL in serum and ng/µL in concentrated urine. In such a way that these levels of concentration in corals, equivalent to that of animals and plants, would allow estimates to be reached, including at the cellular level, both coral and symbiont or zooxanthellae.

Regarding sampling sites, in Palmito, Pu was observed to present the highest concentration, in various orders of magnitude, among PAs recorded by site and month. In contrast, Playa Mora and Piedra Bola, in October, presented the highest concentration of Spm, while Playa Mora showed the highest concentration of Spd. When comparing tide level by sampling month, which is one of the oceanographic factors that draws attention the most, the height of the water column is significantly

mL de Spd y 45 pg/mL de Spm. Para la estimación de límite superior se probó hasta una concentración de 80 µg/mL.

Aunque dichas moléculas son consideradas bioindicadores de estrés en plantas y es uno de los principales marcadores moleculares en este reino (Majumdar *et al.*, 2017); la participación de las PAs y sus cambios en respuesta al estrés (Smirnova *et al.*, 2018; Satish *et al.*, 2018; Majumdar *et al.*, 2017; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014), hace sugerirlas como alternativa a otros indicadores utilizados en los corales. Sin embargo es necesario realizar más estudios que permitan establecerlas como verdaderos indicadores asociados al estrés en dichos organismos.

La presencia de las PAs Pu, Spd y Spm en tejido coralino de *P. capitata* varían significativamente entre sitios (Palmito, Piedra Bola y Playa Mora) y épocas de muestreo (febrero y octubre). De igual manera, la concentración de PAs fue consistentemente mayor en octubre. Si se compara entre sí la presencia de las PAs, (Figuras 1-3) se aprecia que la concentración promedio de Pu fue de 10.03 µg/cm², 1.24 µg/cm² de Spd y 4.06 µg/cm² para Spm, con un valor mínimo de 1.35 ± 0.16 µg/cm² en Pu, 0.15±0.03 µg/cm² en Spd y 0.07 ± 0.02 µg/cm² en Spm; y concentraciones máximas de 42.91 ± 1.40 µg/cm² en Pu, 5.31±1.06 µg/cm² Spd y 12.10 ± 0.75 µg/cm² en Spm. Es importante establecer la relación en los contenidos de PAs en el coral *P. capitata* respecto a los estudios que reportan los niveles de las mismas en distintos tejidos y/o fluidos de animales, por ejemplo el grupo de Khuhawar & Qureshi (2001) utiliza la concentración en µg/mg de creatinina en orina; y la revisión de Teti *et al.* (2002) muestra valores que van del rango nmol/mL de muestra no solo para orina, sino también para plasma, pmol/µL en eritrocitos, orina y células de linfoma, así como µg/mL en suero y ng/µL en orina concentrada. De esta manera se puede llegar a mejores estimaciones por célula, tanto de coral como del simbiote o zooxantela.

Por sitio de muestreo, se observa que en Palmito, la Pu presentó una concentración en varios órdenes de magnitud mayor entre las PAs registradas por sitio y mes. En contraste, Playa Mora y Piedra Bola, en octubre, presentaron la mayor concentración de Spm, mientras que Playa mora mostró la mayor concentración de Spd. Si comparamos el nivel de la marea por mes de muestreo (Figura 5), el cual es uno de los factores oceanográficos que más llaman la atención. La altura de la columna de agua es significativamente menor en febrero (-0.31 ± 0.02 m respecto al promedio anual de altura de la marea) respecto al mes de marzo (0.05 ± 0.01 m).

lower in February (-0.31 ± 0.02 m regarding the annual average tide height) than in October (0.05 ± 0.01 m regarding the annual average tide height).

A discussion on the particular individual cases is made.

Pu concentration is observed in Figure 2. This polyamine presented significant differences among sampling sites, but not among sampling periods or tide level ($P_{\text{site}} = 0.0102$; $P_{\text{tide level}} = 0.375$), recording the highest concentrations in Palmito, with $7.29 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in February and $42.91 \pm 1.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in October.

In relation to Spd, the highest concentrations were presented in October (Figure 3). Significant differences were established among sampling sites, but not among sampling months or tide level ($P_{\text{site}} = 0.0167$; $P_{\text{tide level}} = 0.307$). Playa Mora showed the highest concentrations with $0.60 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in February and $5.31 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in October.

Spm (Figure 4) registered significant differences among sampling months or tide level ($P_{\text{tide level}} = 0.0439$). The highest concentrations were in October, with $12.10 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Playa Mora, and $5.33 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Piedra Bola.

La comparación de la concentración de PAs entre sitios y época de muestreo se aprecia de forma gráfica en las Figuras 2, 3 y 4.

En la Figura 2 se observa la concentración de Pu, esta poliamina presentó diferencia significativa por sitio de muestreo, más no en la temporada de muestreo ($P_{\text{mes}} = 0.0102$; $P_{\text{sitio}} = 0.375$), registrándose en Palmito las mayores concentraciones, con $7.29 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en febrero y $42.91 \pm 1.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en octubre.

En relación a la Spd, las concentraciones más altas se presentan en octubre (Figura 3). Se establecieron diferencias significativas por sitio de estudio, más no por mes de muestreo ($P_{\text{mes}} = 0.0102$; $P_{\text{sitio}} = 0.375$). Playa Mora muestra las mayores concentraciones con $0.60 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en febrero y $5.31 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en octubre.

La Spm (Figura 4) registró valores estadísticamente significativos por mes de muestreo ($P_{\text{mes}} = 0.0439$), en Playa Mora y Piedra Bola. Las mayores concentraciones fueron en octubre, con $12.10 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Playa Mora y $5.33 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en Piedra Bola.

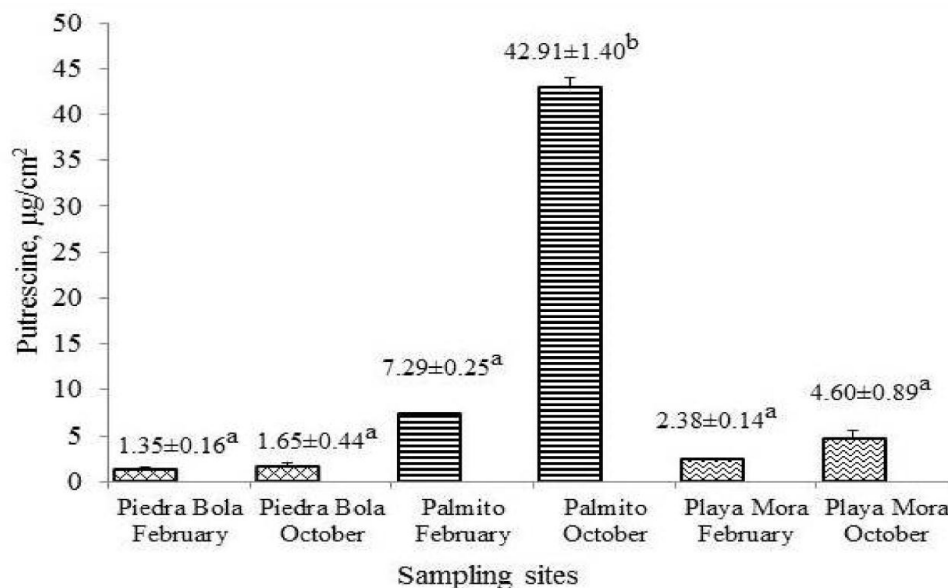


Figure 2. Concentration of putrescine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in *P. capitata* tissue during February and October in the three sampling sites. Different letter indicates significant differences ($p < 0.05$).

Figura. 2. Concentración de Putrescina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en tejidos de *P. capitata* durante febrero y octubre en los tres sitios de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

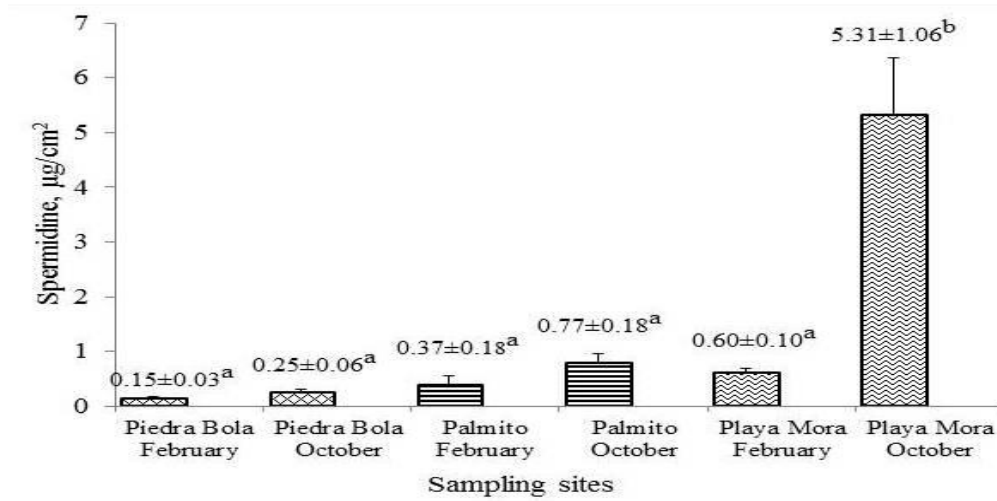


Figure 3. Spermidine concentration (µg/cm²) in *P. capitata* tissue during February and October in the three sampling sites. Different letter indicates significant differences ($p < 0.05$).

Figura 3. Concentración de Espermina (µg/cm²) en tejidos de *P. capitata* durante febrero y octubre en los tres sitios de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

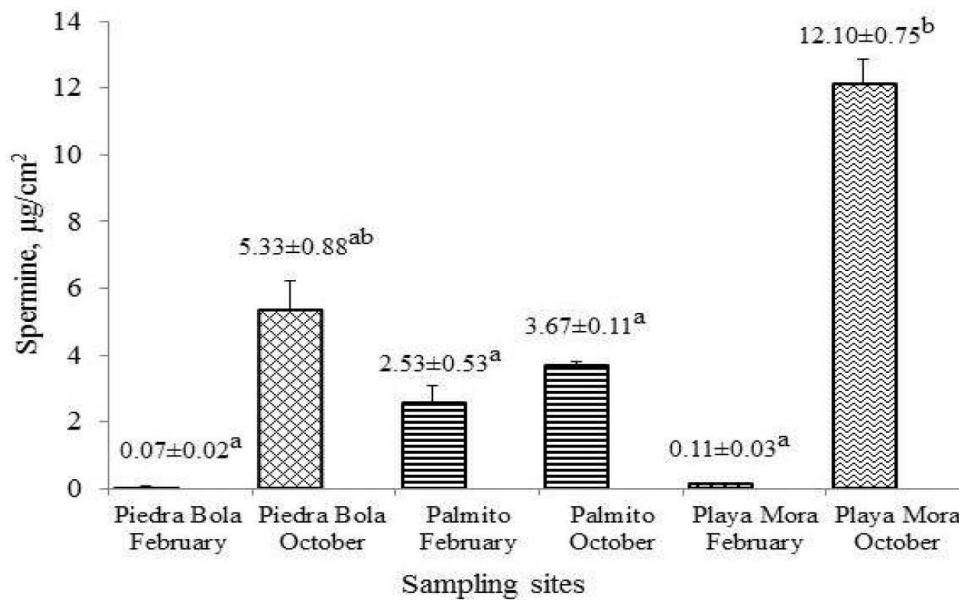


Figure 4. Average Spermine concentrations (µg/cm²) in coral tissue *P. capitata* recorded at sites and months of sampling. Different letter indicates significant differences ($p < 0.05$).

Figure 4. Promedios de las concentraciones de Espermina (µg/cm²) en tejidos del coral *P. capitata* obtenidos en los sitios y meses de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

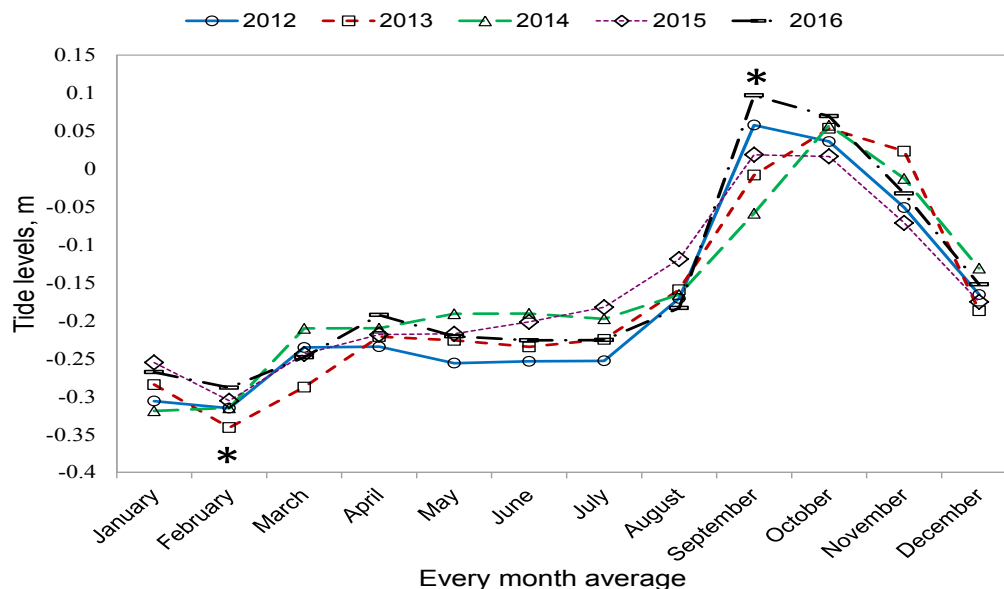


Figure 5. Tide levels in monthly average, during 5 years. The asterisks show that there is a statistically significant difference by the ANOVA test and multiple comparison, $p < 0.001$.

Figura 5. Promedio de los niveles de mareas, durante 5 años. Los asteriscos presentan las diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA y comparación múltiple, $p < 0.001$.

Changes in tides were recorded from the tide station of Manzanillo port, for 5 years in the period comprised between 2012 and 2016 and averaging the 12 months of each year (Figure 5). By means of a non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test ($p \leq 0.001$), results showed very marked significant differences among the first 4 months of the year, compared to September, October and November months, especially in February and October months when sampling of the present research work was performed and in the three analyzed sites.

Results obtained in the present study suggest PAs, specially Spd and Spm, as markers associating PAs levels with tides, which could indicate a proper homeostasis for all metabolic pathways to be fully operational, as well as replication, transcription and protein synthesis, while Pu over-accumulation induced apoptosis (Tobias *et al.*, 1995; Teti *et al.*, 2002), although more studies are required with other stress control indicators, like chlorophylls, carotenoids, nutrients and/or biomass present in *P. capitata* (Buckley & Szmant,

Los cambios en las mareas se registraron a partir de la estación mareográfica del puerto de Manzanillo, durante 5 años en el periodo comprendido entre 2012 y 2016 y promediando los 12 meses de cada año (Figura 5). Mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y comparación de medias de Dunn ($p \leq 0.001$) los resultados muestran diferencias estadísticas muy marcadas entre los primeros 4 meses del año, respecto a los meses de septiembre, octubre y noviembre, sobre todo en los meses de febrero y octubre cuando se llevó a cabo los muestreos del presente trabajo y en los tres sitios analizados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren a las PAs, sobre todo a Spd y Spm, son marcadores que asocian a los niveles de PAs con las mareas, lo que podría indicar una homeostasis adecuada para que todas las vías metabólicas se encuentren en pleno funcionamiento, así como la replicación, transcripción y síntesis de proteínas, mientras la sobreacumulación de Pu induce apoptosis (Tobias *et al.*, 1995; Teti *et al.*, 2002), aunque se requiere de más estudios con otros indicadores de control del estrés como, clorofilas, carotenoides, nutrientes y/o la biomasa presentes

2004). Biological systems are generally complex and have mechanisms operating at different levels, molecular, cellular or population (Downs *et al.*, 2005). Consequently, an adequate quantity of indicators is required (Buckley & Szmant, 2004) to determine the stress degree in which they are, implying that they are representative of the structure, function and composition of the ecological system and that the information they bring can be complemented in a whole analysis (Adams, 2005). It is important to take into account that some chemical and cellular markers appeared in short periods of time or after an impact, and others indicate a cumulative effect for lengthy periods of time (Hughes *et al.*, 2003).

Given the multiple functions attributed to PAs, it is difficult to establish the origin of Spd and Spm, accumulated in this coral species from Playa Mora, since it could be the characteristic metabolism of such molecules, its exacerbation and/or probably some relation with Micosporinas (MAAs) metabolism for defense, given not only in artificial conditions (Whitehead & Hedges, 2003) but also in natural ones as well, where they may interfere with the donor of methyl groups through the S-adenosil metionina (SAM) (Brooks, 2013). It is known as well that PAs have direct effects on ion transport at membrane scale in mammals (Li *et al.*, 2007; Kusano *et al.*, 2008). Due to the null research work conducted on the metabolism of these molecules in corals, physiological studies on these molecules are required to be able to propose them as stress indicators (Buckley & Szmant, 2004) as it is accepted for plants (Liu *et al.*, 2017).

On the other hand and importantly, associating PAs levels with some other parameters of the ecosystem results difficult since many factors may influence in the space where corals are. If primary productivity is taken as a reference for stress in the zone where the present study was performed, it is found that in low tides period, which is in February, the best productivity of coral biomass is registered, synonym of lower stress and PAs levels without important changes or its association with the physiological status of the organisms in symbiosis (Teti *et al.*, 2002).

Another alternative could be the association of tide levels, since tide level has an effect on other factors impacting the coral system, such as the incidence of solar radiation, turbulence associated to the water column and turbidity or

en *P. capitata* (Buckley & Szmant, 2004). Los sistemas biológicos, en general, son complejos y poseen mecanismos que operan a diferentes niveles, ya sea molecular, celular o poblacional (Downs *et al.*, 2005). Consecuentemente se requiere una cantidad apropiada de indicadores (Buckley & Szmant, 2004) para determinar el grado de estrés en el que se encuentran, lo que implica que estos sean representativos de la estructura, función y composición del sistema ecológico y que la información que aportan pueda complementarse en un análisis en conjunto (Adams, 2005). Es importante tomar en cuenta que algunos marcadores químicos y celulares se manifiestan en periodos breves de tiempo o después de un impacto, y otros indican un efecto acumulativo por periodos prolongados de tiempo (Hughes *et al.*, 2003).

Dadas las múltiples funciones que se le conocen a las PAs, es difícil establecer la procedencia de las PAs Spd y Spm acumuladas en esta especie de coral de Playa Mora dado que puede ser el metabolismo propio de dichas moléculas, su exacerbación y/o probablemente alguna relación con el metabolismo de MAAs para defensa, dado tanto en condiciones artificiales (Whitehead & Hedges, 2003) como naturales donde interfieren con el donador de metilos S-adenosilmetionina (SAM) (Brooks, 2013). También se sabe que las PAs tienen efectos directos sobre el transporte de iones a nivel de las membranas en mamíferos (Li *et al.*, 2007; Kusano *et al.*, 2008). Dada la nula investigación que existe en el metabolismo de estas moléculas en los corales, se requiere de estudios sobre las mismas en su fisiología para proponerlas como indicadores de estrés (Buckley & Szmant, 2004) como se acepta en el caso de las plantas (Liu *et al.*, 2017).

Por otro lado y de manera importante resulta difícil asociar los niveles de PAs con algún otro parámetro en el ecosistema ya que son muchos factores los que podrían influir en el espacio donde se encuentran los corales. Si se toma como referencia la productividad primaria respecto al estrés en la zona en que se realizó el presente estudio, se encuentra que en la temporada de bajamareas, es decir en febrero, se registra la mejor productividad de la biomasa coralina, sinónimo de menor estrés y niveles de PAs sin cambios importantes o su asociación con el estado fisiológico de los organismos en simbiosis (Teti *et al.*, 2002).

Otra alternativa puede ser la asociación de los niveles de las mareas, dado que el nivel de las mareas tiene efecto sobre otros factores que impactan al sistema coralino, tales como incidencia de la radiación solar, turbulencia asociada a la columna de agua y turbidez o claridad de la misma, por

clarity of it, to name a few; and stress indicators, although those already established for this type of study, act as a response to more demanding environmental conditions (Sosa-Avalos *et al.*, 2006). In such a way that Spd and Spm can represent an adaptive mechanism to conditions of less productivity around October, if considered as a stress condition, increasing its concentration to favor metabolic pathways of stress indicator molecules, like MAAs and given the vast relation of PAs precursor amino acid, specifically ornithine (Sivashanmugam *et al.*, 2017), in this model, but studies in the same model and PAs levels are required, in addition to those already established indicators.

The present study performed in natural conditions on coral located in CMP region, and since they are exposed to diverse light regimes according to depth and location in the reef (Liñán-Cabello *et al.*, 2010) there are not many previous studies. *P. capitata*, one of the two most abundant coral species in the zone of study (Reyes-Bonilla *et al.*, 2013), shows an adequate physiological adaptive mechanism to seasonal changes (Liñán-Cabello *et al.*, 2010). Moreover, it presents, at an enzymatic level, a series of responses focused on adaptation and maintenance of its reproductive capacity in oceanic shallow environments, which usually exhibit high levels of ultra-violet radiation, in addition to tide influence, short-term changes in turbidity, nutrient concentration, temperature and osmolarity that can act in combination and cause irreversible damages (Liñán-Cabello *et al.*, 2010). All or some of these conditions can be modified when tides reach a difference of approximately 35 cm, like in the case of coral zones studied in February and October (Figure 5). Spm concentration was significantly different among sampling periods; the sampling site had a higher effect on Pu and Spm concentrations, 42.91 and 12.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectively. The obtained results showed a significant higher PAs concentration in October than in February, as well as differences among sites, the highest Spd and Spm levels being registered in Playa Mora, while the highest Pu value was expressed in Palmito, probably by activation of PAs retro-conversion pathway (Dong-Hun *et al.*, 2018). These differences are not explained only by tide levels, since the studied systems are submitted to diverse environmental factors. On one hand, in October, when the tide is at its highest, corals can be prone to the turbulence and pressure of a higher water column, to solar radiation with a lower inclination and to higher

mencionar algunas; y los indicadores de estrés, aún los ya establecidos para este tipo de estudios, actúan como respuesta a condiciones ambientales más exigentes (Sosa-Avalos *et al.*, 2006). De tal manera que Spd y Spm pueden representar un mecanismo de adaptación a las condiciones de menor productividad alrededor de octubre, si la consideramos como condición estresante, aumentando su concentración para favorecer las vías metabólicas de las moléculas indicadoras de estrés, como MAAs y dada la relación tan basta que tiene el aminoácido precursor de las PAs específicamente la ornitina (Sivashanmugam, 2017), pero se requiere de estudios en el mismo modelo y niveles de PAs además de dichos indicadores ya establecidos.

El presente estudio realizado en condiciones naturales de corales ubicados en la región del PCM, y dado que están expuestos a diversos regímenes de luz en función de la profundidad y ubicación en el arrecife, no tiene muchos estudios precedentes. *P. capitata*, una de las dos especies de coral más abundantes en la zona de estudio (Reyes-Bonilla *et al.*, 2013), muestra un adecuado mecanismo fisiológico de adaptación a los cambios estacionales (Liñán-Cabello *et al.*, 2010). Además, presenta a nivel enzimático una serie de respuestas orientadas a adaptarse y mantener su capacidad reproductiva en entornos oceánicos poco profundos que comúnmente exhiben altos niveles de radiación ultravioleta, adicionalmente a la influencia de las mareas, cambios en la turbidez a corto plazo, concentración de nutrientes, temperatura y osmolaridad, que pueden actuar en combinación y causar daños irreversibles (Liñán-Cabello, *et al.*, 2010). Todas o algunas de estas condiciones se pueden modificar cuando las mareas alcanzan una diferencia de aproximadamente 35 cm como el caso de las zonas coralinas estudiadas en febrero y octubre (Figura 5). La concentración de Spm fue estadísticamente significativa por temporada de muestreo; el sitio de muestreo tuvo mayor efecto sobre las concentraciones de Pu y Spm, 42.91 y 12.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran consistentemente una mayor concentración de PAs en octubre que en febrero, así como diferencias entre los sitios, registrando en Playa Mora los mayores niveles de Spd y Spm, mientras que en Palmito se expresó el mayor valor de Pu, probablemente por activación de la vía de retroconversión de las PAs (Dong-Hun *et al.*, 2018). Estas diferencias no solo se explican por el nivel de las mareas, ya que los sistemas estudiados están sometidos a diversos factores ambientales. Por una parte en octubre, en el que la marea es más alta, los corales pueden estar propensos a la turbulencia y presión de una mayor columna de agua, radiación solar con una menor inclinación, y mayores temperaturas ambientales y del agua de

environmental and seawater temperatures, as well as to a higher water transparency, favoring a lower dispersion of solar rays. On the other hand, conditions in February and part of March, with lower tide level, to such a degree that even in Playa Mora, coral mass remains exposed to air, and consequently, does not receive pressure and turbulence of the water column, and the environmental conditions showed a lower temperature of these months of the end of the winter, as well as a higher turbidity, which could disperse solar rays (Sosa-Avalos *et al.*, 2006).

Conclusions

There is a relation between PAs levels in *P. capitata* and tide levels considered as stress inductors in CMP beaches, assessed in the present study. The present work reports, for the first time, the concentration of diverse polyamines in *P. capitata* coral tissue, obtained in coral development from the CMP. The possible use of these molecules is suggested as tools to determine the health status of organisms from the most diverse and complex ecosystem of the planet, as coral reefs are.

Acknowledgements

We thank Mario Ramírez, PhD and Ernesto López Uriarte, PhD for their useful discussion and the careful review of the manuscript.

References

- Adams, S. M. (2005). Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8): 649-657. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.040>
- Banaszak, A. T. & Lesser M. P. (2009). Effects of solar ultraviolet radiation on coral reef organisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(9): 1276-94. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/pp/b902763g/unauth#!divAbstract>
- Brooks, W. H. (2013). Increased polyamines alter chromatin and stabilize autoantigens in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 4(91): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00091>
- Buckley, B. A. & Szmant A. M. (2004). RNA/DNA ratios as indicators of metabolic activity in four species of Caribbean reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*. 282: 143-149. <https://doi.org/10.3354/meps282143>
- Delgadillo-Nuño, M. A., Liñán-Cabello, M. A., Reyes-Gómez, J. and Soriano-Santiago, O. (2014). Response to pH stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(3): 449-459. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5230207>
- Dong-Hun B., Darius, J. R. L., Patric, J. J. and Des, R. R. (2018) The old and new biochemistry of polyamines. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.06.004>

mar, así como mayor transparencia del agua, lo que favorece una menor dispersión de los rayos solares. Por otra parte, las condiciones en febrero y parte de marzo, con un nivel de marea más bajo, a tal grado que incluso en Playa Mora queda expuesta la masa coralina al aire, y que no obstante esta exposición, no recibe la presión y turbulencia de la columna de agua, y las condiciones medioambientales muestran una menor temperatura de estos meses de finales del invierno, así como una mayor turbiedad, que podría dispersar los rayos solares (Sosa-Avalos *et al.*, 2006).

Conclusiones

Existe una asociación entre los niveles de PAs en *P. capitata* y los niveles de mareas considerados inductores de estrés en las playas del PCM, evaluadas en el presente estudio. El presente trabajo reporta por primera vez la concentración de diversas poliaminas en tejido del coral *P. capitata* obtenido en desarrollos coralinos del PCM. Se sugiere el posible uso de estas moléculas como herramientas para determinar el estado de salud de organismos del ecosistema más diverso y complejo del planeta, como son los corales formadores de arrecife.

Agradecimientos

Agradecemos a los Drs. Mario Ramírez y Ernesto López Uriarte su útil discusión y la cuidadosa revisión del manuscrito.

- Downs, C. A., Woodley, C. M., Richmond, R. H., Lanning, L. L. and Owen, R. (2005). Shifting the paradigm of coral-reef 'health' assessment. *Marine Pollution Bulletin*. 51(5): 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.028>
- Hodgson, G. (1995). Corales pétreos marinos (tipo Cnidaria, orden Scleractinia). En: W. Fischer., F. Krupp., W. Scheider., C. Sommer., K.E. Carpenter y V.H. Niem (eds.), Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Algas e Invertebrados. FAO, Roma, pp. 83-97. www.fao.org/publications/en/
- Hughes, T. P., Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C. and Roughgarden, J. (2003). Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*, 301(5635): 929-933. <https://doi.org/10.1126/science.1085046>
- Kuhawar, M.Y., & Qureshi, G.A. (2001) Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 764: 385-407. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00395-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00395-4)
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 228(3): 367-81. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>
- Lesser, M. P., Mazel, C., Phinney, D. and Yentsch, C. S. (2000). Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals *Montastraea faveolata* and *Montastraea cavernosa*. *Limnology and Oceanography*. 45(1): 76-86. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.1.0076>
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F. and Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102(3): 771-776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Liñán-Cabello, M. A., Flores-Ramírez, L. A., Cobo-Díaz, J. F., Zenteno-Savín, T., Olguín-Monroy, N. O., Olivos-Ortiz, A. and Tintos-Gómez, A. (2010). Response to short term ultraviolet stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Revista de Biología Tropical (Int J Trop Biol)*. 58(1): 103-118. <https://doi.org/10.15517/RBT.V58I1.5197>
- Liñán-Cabello, M. A., Flores-Ramírez, L. A., Zenteno-Savín, T., Olguín-Monroy, N. O., Sosa-Avalos, R., Patiño-Barragan, M. and Olivos-Ortiz, A. (2010a). Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. *Marine Ecology*. 31: 407-417. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00349.x>
- Liñán-Cabello, M. A., Flores-Ramírez, L. A., Cobo-Díaz, J. F., Zenteno-Savín, T., Olguín-Monroy, N. O., Olivos-Ortiz, A. and Tintos-Gómez, A. (2010b). Response to short term ultraviolet stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Revista de Biología Tropical*. 58(1): 103-118. <https://doi.org/10.15517/RBT.V58I1.5197>
- Liu, M., Chen, J., Guo, Z. and Lu, S. (2017). Differential Responses of Polyamines and Antioxidants to Drought in a Centipede-grass Mutant in Comparison to Its Wild Type Plants. *Front Plant Sci*. 16(8): 792. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00792>
- Majumdar, R., Shao, L., Turlapati, S. A. and Minocha, S. C. (2017). Polyamines in the life of Arabidopsis: profiling the expression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene family during its life cycle. *BMC Plant Biology*. 28;17(1): 264. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1208-y>
- Ou, Y., Wang, S. J., Li, D., Chu, B. and Gu, W. (2016). Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America* 113(44): E6806-E6812. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607152113>
- Panicot, M., Minguet, E. G., Ferrando, A., Alcázar, R., Blázquez, M. A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C. and Tiburcio, A. F. (2002). A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*. 14(10): 2539-51. <https://doi.org/10.1105/tpc.004077>
- Reyes-Bonilla, H. L., Calderón-Aguilera, G., Cruz-Piñón, P., Medina-Rosas, R. A., López-Pérez, M. D., Herrero-Pérezrul, G., Leyte-Morales, A., Cupul-Magaña, J. and Carriquiry-Beltrán J. D. (2005). *Atlas de los corales pétreos (Scleractinia) del Pacífico Mexicano*. CICESE/CONABIO/CONACYT/UABSC, Universidad de Guadalajara, Universidad del Mar, México. 124 p.
- Reyes-Bonilla, H. L. (2013). Coral reefs of the Pacific coast of México. In: Cortés J (ed) Coral reefs of Latin America. Latin American Coral Reefs, pp 310-330 <https://doi.org/10.1016/B978-044451388-5/50015-1>

- Satish, L., Rency, A. S. and Ramesh, M. (2018). Spermidine sprays alleviate the water deficit-induced oxidative stress in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) plants. *3 Biotech.* 8(1): 63. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1097-2>
- Shabala, S. & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia. Plantarum*, 151: 257–279. <https://doi.org/10.1111/ppl.12165>
- Sivashanmugam, M., Jaidev, J., Umashankar, V. and Sulochana, K. N. (2017). Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86: 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.024>
- Smirnova, O. A., Bartosch, B., Zakirova, N. F., Kochetkov, S.N. and Ivanov, A. V. (2018). Polyamine Metabolism and Oxidative Protein Folding in the ER as ROS-Producing Systems Neglected in Virology. *Int J Mol Sci.* 17;19(4): 1219. <https://doi.org/10.3390/ijms19041219>
- Sosa-Avalos, R., Martínez-Gaxiola, M.D. and Gaxiola- Castro, G.. (2006). Producción primaria en el Pacífico tropical mexicano estimada a partir de datos derivados de sensores remotos, p. 315-323. In Jiménez- Quiroz, M.C. & Espino-Barr E. (ed.). Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. Instituto Nacional de la Pesca, México.
- Tabor, C. W. & Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual Review Biochemistry.* 53: 749-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003533>
- Teti D, Visalli M. and McNair H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B.* 781(1-2): 107-49. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00669-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00669-4)
- Tobias, K. E., Shor, J. and Kahana, C. (1995). c-Myc and Max transregulate the mouse ornithine decarboxylase promoter through interaction with two downstream CACGTG motifs. *Oncogene* 11(9): 1721-1727. <https://europepmc.org/abstract/med/7478599>
- Valdés-Santiago, L. & Ruiz-Herrera, J. (2014). Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front Chem.* 1(42): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00042>
- Whitehead, K., & Hedges, J. I. (2003). Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 17: 2133–2138. <https://doi.org/10.1002/rcm.1162>