



Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012

.....

Editores: Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota



Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado
2008-2012

Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota

Editores



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Diseño gráfico
Liliana Ramírez B.

Diseño editorial
Mónica Pérez-Ramírez

Edición de textos en inglés
Diana Leticia Dorantes Salas

Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur. Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012.
Editado por Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota.

Primera edición 2012
D.R.© Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja California Sur, México, 23096

ISBN 978-607-7634-07-2

Hecho en México

“Las opiniones expresadas por los autores (textos, figuras y fotos) no necesariamente reflejan la postura de la institución editora de la publicación”

Contenido

Agradecimientos

Presentación

Tutores participantes

Primera Parte

MIDIENDO LA BIODIVERSIDAD

Capítulo 1	1
Desarrollo y evaluación de métodos moleculares para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las costas de Baja California Sur Angélica Herrera-Sepúlveda	
Capítulo 2	25
Efecto de <i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943) productor de toxinas paralizantes (PSP) sobre la expresión genética del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) Norma García-Lagunas	
Capítulo 3	51
Respuesta del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y sub-crónica a <i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreicas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos Reyna Romero	
Capítulo 4	76
Asincronía en la especiación asociada con el levantamiento del Istmo de Panamá: el caso de los haemúlidos Jose Tavera	

	Capítulo 5	
Ecomorfología y evolución de la familia Pomacentridae (Perciformes: Labroidi) en el Pacífico Oriental		94
	Rosalía Aguilar-Medrano	
	Capítulo 6	
Composición temporal del fitoplancton en ambiente de arrecife costero en el sureste de la Península de Baja California		122
	Alejandra Torres-Ariño	
	Capítulo 7	
Variabilidad temporal de los ensamblajes de macroalgas en arrecifes rocosos de Bahía de Loreto		145
	Alejandra Mazariegos-Villarreal	
	Capítulo 8	
Macroalgas en bancos abuloneros de la costa occidental de Baja California Sur		165
	Alma Rosa Rivera-Camacho	
	Capítulo 9	
Variación espacio-temporal de la densidad de <i>Acanthaster planci</i> (Echinodermata: Asteroidea) en el Golfo de California		183
	Daniela A. Murillo-Cisneros	
	Capítulo 10	
Estructura comunitaria de asteroideos (Echinodermata: Asteroidea) en Bahía de Loreto		199
	Fabián Cervantes-Gutiérrez	
	Capítulo 11	
Variación estacional, contenido energético y biomarcadores lipídicos –ácidos grasos- de la comunidad planctónica de Balandra, Baja California Sur en un ciclo anual		218
	Nayeli Pedroza-Martínez	

	Capítulo 12	
Variación espacial de la estructura de las comunidades de peces de arrecife en la costa oeste del Golfo de California		230
	Alejandro Aldana-Moreno	

	Capítulo 13	
Señales isotópicas del $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de <i>Megastraea undosa</i> (Wood, 1828), <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) y algunas de sus fuentes de alimento		245
	M. Magali Gómez-Valdez	

	Capítulo 14	
Dieta natural de <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) en arrecifes rocosos de la costa Pacífico de Baja California Sur		256
	Fatima Aguilar-Mora	

	Capítulo 15	
Condición fisiológica de la almeja generosa, <i>Panopea globosa</i> , en Bahía Magdalena, BCS		269
	Laura Margarita Cruz-Gómez	

	Capítulo 16	
Relación trófica entre los peces de arrecife y manglar en La Paz, BCS		284
	Samuel Calderón-Liévanos	

Segunda Parte

RELACIONANDO LA BIODIVERSIDAD CON LA VULNERABILIDAD DE LOS ECOSISTEMAS

	Capítulo 17	
Macroalgas en el arrecife del Canal de San Lorenzo BCS después del impacto del buque Lázaro Cárdenas II y el huracán Juliette		296
	Tonatiuh Chávez-Sánchez	

	Capítulo 18	
Revisión del conocimiento actual sobre florecimientos macroalgales en lagunas costeras del Golfo de California		310
	Alejandra Piñón-Gimate	

	Capítulo 19	
Reclutamiento coralino en un arrecife restaurado en La Paz, BCS		330
	Rafael Andrés Cabral-Tena	
	Capítulo 20	
Elementos de dinámica poblacional para el manejo de peces damisela del Golfo de California		346
	Julio Ayala-Aguilar	
	Capítulo 21	
Análisis de la comunidad íctica posterior a un evento de perturbación antropogénica en arrecife de San Lorenzo, Bahía de la Paz, BCS		359
	Briseida Mejía-Torres	
	Capítulo 22	
Estructura de la comunidad íctica de manglar en tres sistemas (Balandra, Enfermería y Zacatecas) y dos periodos (1980 y 2010) en relación con el grado de influencia antrópica		375
	Francisco J. López-Rasgado	
	Capítulo 23	
Pesca incidental en la pesquería de pelágicos menores en el noroeste de México		399
	Sergio Macías-Mejía	
	Capítulo 24	
Índice de fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante el impacto de la pesca de arrastre		412
	Pablo Vega-García	
	Capítulo 25	
Certificación pesquera en países en desarrollo: tópicos recientes y perspectivas de implementación		428
	Mónica Pérez-Ramírez	

Agradecimientos

Agradecemos a CONACYT, ya que su apoyo fue primordial para la realización de este libro. Por un lado, la mayoría de los autores fueron beneficiados con becas de posgrado. Por otra parte, el proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros* otorgó el financiamiento que permitió realizar parte de los estudios aquí presentados, y su integración. Otras fuentes importantes de subvención fueron: 1) proyecto SEP-CONACYT 83442 *Identificación molecular y estudio de la regulación de la expresión diferencial de genes, en el ostión del Pacífico Crassostrea gigas, en respuesta a exposición a toxinas marinas*; 2) proyecto CONACYT 50589 *Disponibilidad y aprovechamiento de macroalgas y pastos marinos en ecosistemas altamente productivos*; 3) proyecto CONABIO CT001 *Programa de monitoreo de la restauración de arrecife coralino afectado por el Buque Tanque Lázaro Cárdenas II, y de las comunidades arrecifales de la región del Parque de Loreto, Baja California Sur*; 4) proyecto CONACYT 126574 *Recursos pesqueros masivos de México ante el cambio climático*; 5) proyecto SIP 20121034 *Desempeño productivo de captura y económico-financiero de la pesca deportivo-recreativa de la zona de Los Cabos, B.C.S., México*; 6) proyecto COBI *Uso y manejo de especies de peces e invertebrados de ornato en el Parque Nacional Marino Bahía de Loreto* y 7) proyectos CONANP *Estudio técnico: Desarrollo microregional dentro del marco del área natural protegida Cabo San Lucas* y *Estudio técnico: Análisis y perspectivas para el desarrollo económico y diversificación de actividades dentro del marco del área natural protegida Cabo Pulmo*.

Expresamos nuestro agradecimiento a las instituciones donde los autores estudian y llevan a cabo sus investigaciones: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad

del Mar (UMAR) y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Así como a las instituciones nacionales y en el extranjero que se vinculan a este proyecto proveyendo expertos en diferentes disciplinas para la conformación de comités tutoriales: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidades Mazatlán y Guaymas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN (CICIMAR), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Instituto de Ecología (INECOL), Curtin University, Marine Biological Association (MBA), Universidad Nacional de Colombia, University of California, Université de Liège, UPMC Banyuls y SCRIPPS Institution of Oceanography (SIO).

No podemos dejar de reconocer las aportaciones que han brindado todos y cada uno de los integrantes de los comités tutoriales en CIBNOR: Bertha O. Arredondo Vega, José Alfredo Arreola Lizárraga, Felipe Ascencio Valle, Eduardo F. Balart Páez, Luis Felipe Beltrán Morales, Thelma Castellanos Cervantes, Pedro Cruz Hernández, Juan Antonio de Anda Montañez, Norma Y. Hernández Saavedra, Ana María Ibarra Humphries, Alfonso Maeda Martínez, Enrique Morales Bojórquez, Lourdes Morquecho Escamilla, Gopal Murugan, Alejandra Piñón Gimete, Elisa Serviere Zaragoza, María Teresa Sicard González y Dariel Tovar Ramírez.

Gracias a las personalidades que participan en los comités desde otras instituciones en México: Reyna Alvarado Jiménez, Francisco Becerril Bobadilla, Francisco Benítez Villalobos, Rolando Cardeña López, Gerardo Ceballos Corona, José de la Cruz Agüero, Efraín de Luna, Pablo del Monte Luna, Lloyd Findley, Alma Lilia Fuentes Farías, Silvia Alejandra García Gasca, Gustavo Hernández Carmona, Luis Hernández Moreno, Liliana Hernández Olalde, Eduardo Herrera Galindo, Sharon Herzka Llona, Volker Koch, Antonio López Serrano, Juan Manuel López Vivaz, Daniel Lluch Belda, Marco Antonio Medina,

Germán Ponce Díaz, Héctor Reyes Bonilla, Rafael Riosmena Rodríguez y Oscar Trujillo Millán. En el extranjero: Arturo Acero Pizarro (Colombia), Giacomo Bernardi (Estados Unidos), Jixin Chen (Reino Unido), Bruno Frédéricich (Bélgica), Philip A. Hastings (Estados Unidos), Linda Medlin (Francia), Bruce Phillips (Australia) y Declan Schroeder (Reino Unido).

El trabajo en campo, en laboratorio y en las colecciones fue apoyado por el personal técnico del CIBNOR: Jorge Angulo Calvillo (capítulos 11, 15, 22), Jesús Bautista Romero (15, 22, 23, 24), Horacio Bervera León (7, 15, 17, 19), Noemí Bocanegra Castillo (12, 21), Enrique Calvillo Espinoza (11, 22), Lucía Campos Dávila (4, 5, 12, 21), Laura Carreón Palau (11), Mario Cota Castro (7, 17, 19, 21), Roberto Hernández Herrera (15), Alejandra Mazariegos Villareal (8, 13, 14, 17), Carlos Pacheco Ayub (15, 22, 23, 24), Juan José Ramírez Rosas (7, 8, 13, 19, 21), Delia Irene Rojas Posadas (1, 2, 3, 6) y Arturo Sierra Beltrán (2, 3, 6). Asistencia en otras colecciones biológicas: José de la Cruz Agüero y Víctor Cota Gómez (CICIMAR), Rick Feeney (Los Angeles County Museum), Sandra J. Raredon (Museum of Natural History Smithsonian Institution) y H. J. Walker (SIO). Los autores también agradecen a los compañeros y amigos que participaron directa o indirectamente en los 25 estudios comprendidos en esta obra.

P r e s e n t a c i ó n

Diversos foros mundiales han resaltado la necesidad de conciliar la biodiversidad (entendida como la variedad de organismos y ecosistemas) con el factor humano puesto que la biodiversidad representa beneficios ecológicos y socioeconómicos para las generaciones actuales y futuras. Este libro es presentado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y financiado por la Secretaría de Educación Pública (SEP) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros*. La obra compila una serie de tesis recientes que examinan la biodiversidad en los ambientes costeros de Baja California Sur y el Golfo de California. La importancia de estas contribuciones radica en generar dos vertientes de conocimiento para la región: por un lado, mediciones de biodiversidad, que abarcan desde número y composición de especies hasta identificación genética y dominios tróficos. Por otra parte, la relación entre biodiversidad y vulnerabilidad de los ecosistemas en el entendido que los factores ambientales y las actividades humanas provocan impactos y cambios en los ecosistemas y las especies que en ellos habitan.

La historia geológica y evolutiva, la interacción de condiciones ambientales y la diversidad de ecosistemas costeros hacen de Baja California Sur lugar de residencia estacional o permanente para un elevado número de especies acuáticas; algunas de ellas endémicas de la región, esto es, que no se encuentran en ninguna otra parte del mundo. Esta diversidad de ecosistemas costeros se debe a características geográficas, climáticas y topográficas propias de la región. Por ello la marcada diferencia entre ambientes de alta energía situados en el Océano Pacífico y ambientes protegidos en el Golfo de California. Unido a esto consideremos un grado todavía moderado de explotación humana y tendremos

modelos excepcionales de estudio: ecosistemas arrecifales coralinos y rocosos, sistemas submareales rocosos asociados a bosques de macroalgas, lagunas costeras y manglares, que han sido escenarios para la recolección o censos de organismos, el registro de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, clorofila, nutrientes) y ensayos *in situ* con organismos móviles.

Contar con información que permita mejorar el entendimiento de la relación entre biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas es importante para analizar procesos naturales, determinar beneficios y costos ambientales, y pronosticar la respuesta de los ecosistemas ante variaciones climáticas y presión antropogénica. Esta información biológica al interactuar con otras disciplinas (*p. ej.* administración, economía), debe funcionar como marco de referencia para proponer medidas de manejo en materia de biodiversidad tal y como lo sugieren distintos instrumentos y convenios internacionales. En nuestro país, múltiples dependencias federales y estatales, organizaciones no gubernamentales, universidades y centros públicos de investigación llevan a cabo estudios sobre biodiversidad.

Es así como el CIBNOR, en su carácter de centro público CONACYT, produce e integra conocimientos científicos sobre impactos ambientales y antropogénicos y prepara recursos humanos especializados en manejo y conservación de recursos naturales. El proyecto SEP-CONACYT 83339, así como otros proyectos asociados a la Línea Estratégica CIBNOR EP3 *Variabilidad y vulnerabilidad de ecosistemas marinos del noroeste mexicano*, apoyaron la generación de recursos humanos para alcanzar diferentes grados académicos. Sus aportaciones, que exhiben la frescura y energía de jóvenes comprometidos con su investigación, se vieron enriquecidas con la experiencia de sus comités tutoriales conformados por científicos nacionales e internacionales, fortaleciendo las redes de cooperación y la línea de investigación en CIBNOR.

El presente libro, resultado y muestra de lo arriba expuesto, está constituido por veinticinco capítulos organizados en dos partes que en conjunto ofrecen conocimiento científico y teórico sobre la diversidad de especies y su vulnerabilidad ante algunos eventos ambientales e impactos antropogénicos. En la primera parte, se exploran mediciones de biodiversidad en sistemas costeros empleando técnicas moleculares (genética) y métodos tradicionales (taxonomía, índices de variación y relaciones tróficas). Las técnicas moleculares aquí presentadas sirven para monitorear mareas rojas (proliferación de microalgas tóxicas) y sus efectos en mariscos dirigidos a consumo humano y con importancia económica para la región. También se utilizaron técnicas moleculares para estudiar las relaciones de parentesco entre especies de peces, bajo el fundamento de que este ensamblaje de especies es un modelo que aporta pistas sobre la evolución de la vida.

Ante la necesidad de cuantificar la biodiversidad y compararla temporal (épocas del año) y espacialmente (tipos de ecosistema), los Capítulos 6, 7 y 8 abordan la composición y la estructura de comunidades productoras primarias, es decir, productoras de oxígeno: el fitoplancton y las macroalgas mientras que los Capítulos 9 y 10 tratan sobre organismos depredadores de arrecifes de coral. Estos estudios permiten conocer qué especies están presentes, qué patrones exhiben y qué factores influyen en su distribución (temperatura, nutrientes, etc.). Para comprender como es la circulación de nutrientes y energía en algunos sistemas acuáticos, se realizaron análisis tróficos con moluscos y peces.

La segunda parte del libro trata sobre la comprensión del rol de la biodiversidad en el funcionamiento de diversos ecosistemas costeros y su vulnerabilidad considerando la influencia ambiental y/o antropogénica. Así, tenemos como agentes de cambio: el encallamiento de un buque, el paso del huracán Juliette, los florecimientos algales, la instauración de arrecifes artificiales, la extracción de peces de ornato y la pesca comercial. Los Capítulos 17, 18, 19 y 21 tocan

temas como la situación específica de algunos recursos en arrecifes rocosos y coralinos tras el impacto del huracán; la relación entre productores de oxígeno y nutrientes generados por actividad humana en las costas y las necesidades futuras de investigación. También se ha integrado un estudio de caso para examinar los cambios en la comunidad de peces a través de comparaciones espaciales y temporales en tres sitios con diferente grado de impacto humano (Capítulo 22).

En los últimos años, la explotación de recursos se ha intensificado incidiendo en la biodiversidad de los ecosistemas. Los dos capítulos finales presentan algunas aplicaciones que ya integran conocimientos previos en materia de biodiversidad e impactos, en este caso, producidos por la actividad pesquera. En primera instancia, se propone un índice que expresa la fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante la pesca de arrastre. A continuación, la certificación, una herramienta de manejo pesquero reconocida internacionalmente cuyo objetivo es fomentar la pesca sustentable y el menor daño ambiental.

Suele aceptarse que sin investigación científica sobre la diversidad, que sin generar el conocimiento que permita comprender mejor la vulnerabilidad de los ecosistemas y, por ende, articular aproximaciones adecuadas e integrales a los mismos, toda explotación sustentable y la conservación misma serían inviables en el corto o mediano plazo. Es por ello que un libro como el presente, que comunica la investigación recientemente generada en el CIBNOR sobre esta temática, contribuirá a elucidar la respuesta de ecosistemas particulares ante el creciente aumento de la presión generada por las variaciones climáticas y el desarrollo humano.

Consideramos, pues, que el libro ha de ser de interés para todo aquél preocupado —y ocupado— en conocer, aprovechar y conservar la elevada biodiversidad costera de Baja California Sur.

Tutores participantes

Línea estratégica EP.3 CIBNOR y Proyecto SEP-CONACYT 83339

Bertha O. Arredondo Vega

Investigador Titular A del CIBNOR, trabaja el tema de metabolismo de ácidos grasos en fitoplancton marino y el papel que desempeñan como biomarcadores de cadena trófica (FATM, por sus siglas en inglés) en ecosistemas marinos costeros.
kitty04@cibnor.mx

Eduardo F. Balart Páez

Es biólogo por la Universidad Católica de Valparaíso, Maestro por la Universidad de Kyoto, y Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Su interés se ha centrado en el estudio de la biodiversidad, sistemática y ecología de los peces asociados a manglares, arrecifes, plataforma y talud continental; evaluación y biología de recursos pesqueros potenciales; así como en la ecología y restauración de arrecifes. Es autor de 60 publicaciones y en total ha dirigido 26 tesis de licenciatura hasta doctorado. Actualmente es Investigador Titular en el Programa de Ecología Pesquera, Curador de la Colección Ictiológica, y responsable del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes del CIBNOR. Es miembro del SNI Nivel I.
ebalart04@cibnor.mx

Liliana Hernández Olalde

Es Bióloga Marina (UABCS-2000), con Maestría en Manejo de Recursos Marinos (2003) y Doctorado en Ciencias Marinas (2008) otorgados por el CICIMAR-IPN; Estancia Posdoctoral CIBNOR (2011). Es candidata del SNI. Su investigación se enfoca en la reproducción de animales marinos, especialmente peces: determinación del sexo, maduración gonádica, comportamiento reproductivo y cuidado parental. Ha participado en diversos proyectos de investigación, publicado artículos en revistas especializadas y presentado trabajos en congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido y participado en tesis de licenciatura y posgrado. En el programa de licenciatura (Biología Marina-UABCS) ha impartido cursos sobre biología celular y reproducción.
lilianah@uabcs.mx

Norma Y. Hernández Saavedra

Es Bióloga egresada de la FES Iztacala (UNAM). Estudio la Maestría en Ecología Marina en el CICIMAR (IPN) y el Doctorado en uso, manejo y preservación de los recursos naturales, con especialidad en Biotecnología, en el CIBNOR. Ha realizado estancias de investigación en Universidad de Oviedo, España y en el IGBMC (Université Louis Pasteur), en Francia. Es miembro del SNI Nivel II e Investigador Titular en el CIBNOR, donde imparte cátedra en Microbiología, Biología Molecular y Celular e Ingeniería Genética. Sus intereses de investigación son la biotecnología y la aplicación de técnicas moleculares para el aprovechamiento y manejo de recursos naturales. Sus proyectos han sido financiados por diversas fuentes, resultando en la publicación de artículos en revistas internacionales indexadas y en la formación de recursos humanos de nivel licenciatura, maestría y doctorado.

nhernan04@cibnor.mx

Salvador E. Lluch-Cota

Es Biólogo Marino por la UABCS, Maestro en Ciencias por el CICIMAR-IPN y Doctor en Ciencias por el CIBNOR. Se ha desempeñado como coordinador de varios proyectos de investigación en las áreas de variabilidad climática y sus efectos en recursos marinos. Cuenta con más de 25 publicaciones científicas internacionales, diversos capítulos de libro e informes técnicos. Ha dirigido cinco tesis de Licenciatura, cuatro de Maestría y cuatro de Doctorado. En 2007 fue acreedor del Premio Nacional de Ciencia en la categoría Científico Joven. Es miembro fundador de la Sociedad Mexicana de Pesquerías e integrante del SNI Nivel II.

slluch@cibnor.mx

Alejandra Piñón Gimete

Realizó estudios de posgrado en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Durante el doctorado trabajó con florecimientos macroalgales y su relación con nutrientes de tipo antropogénico en lagunas costeras del estado de Sinaloa. Ha participado en varios proyectos y comités tutoriales como investigador asociado en el CIBNOR. Actualmente, se encuentra en el segundo año de estancia posdoctoral en el mismo centro, bajo la dirección de la Dra. Elisa Serviere, desarrollando investigación sobre florecimientos macroalgales de la Bahía de La Paz. Es Candidata del SNI.

apinon@cibnor.mx

Elisa Serviere Zaragoza

Realizó estudios de licenciatura, maestría y doctorado en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en la línea de Botánica Marina. Trabajó como Profesor Asociado en el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y actualmente es Investigador Titular del CIBNOR y miembro del SNI Nivel II. Sus líneas de investigación son Ecología Marina y Ecología Trófica. Cuenta con 48 publicaciones, 7 capítulos de libro y un Catálogo Onomástico (Nomenclátor) de las algas bentónicas marinas de México. Ha participado en la formación de alumnos de licenciatura (12) y de posgrado (14). Desde 2009, es Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR.
serviere04@cibnor.mx



De izquierda a derecha: Eduardo F. Balart Páez, Elisa Serviere Zaragoza, Norma Y. Hernández Saavedra, Salvador E. Lluch-Cota y Liliana Hernández Olalde

Formación de recursos humanos.

Capítulo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Grado	D	D	D	D	D	D	M	L	L	L	L	M	L	L	M	L	L	P	M	L	L	D	M	M	D	
Estatus	c	c	c	c	t	c	t	t	t	t	c	t	t	t	c	c	t	c	t	c	c	c	t	t	t	
Bertha O. Arredondo Vega											d															
Eduardo F. Balart Páez				d	d			d	d	d	d						a	d	d		d	a				
Liliana Hernández Olalde*																d										
Norma Y. Hernández Saavedra			d	d	d																					
Salvador E. Lluch Cota						a				a					d	a				a	d	d	d	d	d	
Alejandra Piñón Gimate*												a					a									
Elisa Serviere Zaragoza								d	d				d	d	a		d	d			a					
Tutores en CIBNOR**	3	3	4	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Tutores externos	1	1	3	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	0	1	0	0	1	1	0	2	2	1	3	

* = Investigadores posdoctorantes del proyecto; ** = no incluye a los investigadores del proyecto; L = licenciatura; M = maestría; D = doctorado; P = posdoctorado; c = tesis en curso; t = tesis terminada; d = director de tesis; a = asesor de tesis.

Capítulo 3

Respuesta del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y sub-crónica a *Prorocentrum lima* (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreicas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos

Reyna
R o m e r o

CIBNOR
Becaria CONACYT 95202

Resumen

Las floraciones algales nocivas (FAN) son fenómenos naturales que presentan diferentes tipos de afectaciones al medio acuático y a las redes tróficas, se ha dado énfasis a aquellas que afectan al humano por ser el consumidor principal de mariscos y por los efectos económicos que esto implica. Aunque se ha estudiado el efecto de la exposición de *Crassostrea gigas* a diversos contaminantes presentes en los cuerpos de agua, la respuesta molecular a la presencia de *Prorocentrum lima* en moluscos bivalvos es relativamente desconocida. En este estudio, se investigó la respuesta de *C. gigas* al dinoflagelado productor de toxinas diarreicas *P. lima* bajo condiciones experimentales, con énfasis en el análisis de perfil de expresión de genes relacionados con siete rutas metabólicas. Mediante RT-PCR se siguió la expresión de 25 genes potencialmente regulados en *C. gigas* bajo diferentes tratamientos (3×10^2 , 3×10^3 , y 3×10^4 cels/mL de *P. lima*) en diferentes tiempos (0, 3, 6, 12 y 24 h –exposición aguda– y 0, 24, 72, 168 y 336 h –exposición sub-crónica–). Los resultados mostraron dos puntos críticos en los niveles de expresión de los diferentes genes analizados: 1) una respuesta inmediata al tiempo 0h y 6h, posteriormente baja el nivel de expresión en las tres concentraciones de *P. lima* probadas y 2) una respuesta a mediano plazo donde el umbral de toxicidad en *C. gigas* se manifiesta a los 14 días expuesto a 3×10^4 cels/mL de *P. lima*, punto donde se observa un ataque de estado patológico con represión de expresión de genes, que resulta en un deterioro significativo de la integridad de los ostiones. La severidad del daño se observó en términos de densidad y duración de exposición.

Palabras clave: bivalvos, *Crassostrea gigas*, expresión, dinoflagelado

*Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) to acute and sub-chronic exposure to *Prorocentrum lima* (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, diarrheic-toxin producer, by monitoring the expression of specific genes*

Abstract

Harmful algal blooms (HABs) are natural phenomena that exhibit different kinds of affectations on aquatic environments as well as on food webs. From these phenomena, those that affect humans, who are the main seafood consumer and target of economic effects, have been considered highly important. Although exposure effects of *Crassostrea gigas* to various contaminants in water bodies have been studied, the molecular response to the presence of *Prorocentrum lima* in bivalve mollusks is relatively unknown. On this study we investigated the response of *C. gigas* exposed to *P. lima* (diarrheic-toxin producer) under experimental conditions, emphasizing on the gene expression profile associated to seven metabolic pathways. The expression of 25 genes potentially regulated in *C. gigas* under different treatments (3×10^2 , 3×10^3 , 3×10^4 cells/mL of *P. lima*) at different times (0, 3, 6, 12, and 24 h –acute exposure–; 0, 24, 72, 168, and 336 h –subchronic exposure–) was followed by RT-PCR. The results showed two major points in expression levels of the analyzed genes: (1) An immediate response to times 0h and 6h, and later a decrease on the expression levels at three *P. lima* tested concentrations and (2) A medium-term response where the threshold of toxicity in *C. gigas* was observed at 14 days of *P. lima* exposure with 3×10^4 cells/mL. This point represents a pathological state that inhibits gene expression (repression), resulting in a significant deterioration of the oysters' integrity; a direct relationship of damage severity was observed both in density and exposure duration.

Keywords: bivalves, *Crassostrea gigas*, expression, dinoflagellate

Introducción

Las mareas rojas o floraciones algales nocivas (FAN y/o HABs por sus siglas en inglés), son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de una serie de mecanismos oceanográficos. Las floraciones algales en aguas marinas o estuarinas pueden causar mortandades masivas de peces, contaminar los productos del mar con toxinas y alterar la estructura y función de los ecosistemas a través de las cadenas tróficas. El efecto de las FAN sobre la biota marina puede ser el resultado de tres diferentes mecanismos: a) depleción de oxígeno, b) daño mecánico de los órganos respiratorios (*p. ej.* branquias) y c) toxinas, actuando directamente o a través de la red trófica (Cortés-Altamirano & Sierra-Beltrán, 2008). De los organismos presentes en las FAN, los dinoflagelados se consideran el principal componente del fitoplancton toxigénico, seguido de las diatomeas que son fotosintéticos y producen toxinas como metabolito secundario.

Las toxinas producidas por dinoflagelados son bioacumuladas por organismos que se alimentan por filtración, entre ellos los bivalvos, que pueden acumular compuestos xenobióticos, organismos y/o sustancias tóxicas que los constituye como un riesgo potencial para la salud humana al ser consumidos (Lacoste *et al.*, 2002; Smayda, 2002; Saavedra & Bachére, 2006). Si bien algunas toxinas afectan al bivalvo, otras afectan solamente al consumidor, lo que de cualquier manera resulta en pérdidas económicas para las granjas y pesquerías debido a vedas impuestas a su extracción y consumo durante los eventos FAN (Gilbert & Pitcher, 2001). Se han reportado diferentes tipos de respuesta de *Crassostrea gigas* y otros moluscos bivalvos que dependen directamente del tipo de condición de estrés a la que son sometidos en ambientes experimentales. La expresión diferencial de patrones genéticos como una herramienta analítica para estudiar la respuesta a condiciones de hipoxia (David *et al.*, 2005), exposición a herbicidas (Tanguy *et al.*, 2005) e hidrocarburos y pesticidas; en este último caso, se identificó la expresión de cuatro clases de glutatión-S-transferasas tejido-específicas (Boutet *et al.*, 2004a). Farcy *et al.* (2008) evaluaron los niveles de expresión transcripcional de genes que participan en la respuesta celular a estrés térmico, sin embargo, los niveles de expresión encontrados aún están bajo discusión.

Los signos de respuesta que han sido identificados bajo estos efectos son: cierre diferencial de valvas (Gainey & Shumway, 1988; Hégaret *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2010); reducción en la actividad de filtración (Cognie *et al.*, 2001; Hégaret *et al.*, 2007); reducción del metabolismo (Bauder *et al.*, 2001); incremento en la producción de moco (Shumway & Cucci, 1987); activación de la respuesta del sistema inmune, tanto a dinoflagelados como a especies del género *Vibrio* y virus (Pipe & Coles, 1995; Tiscar & Mosca, 2004); disturbios mecánicos (Lacoste *et al.*, 2002); desarrollo reproductivo anómalo (De las Heras, 2009); cambios en el consumo de oxígeno y actividad cardíaca errática (Gainey & Shumway, 1988) y signos histopatológicos de daño (Pearce *et al.*, 2005). Las toxinas DSP son del tipo lipofílicas e incluyen compuestos poliéster de elevado peso molecular como el ácido okadaico (AO), la Dinofisistoxina 1 (DTX-1), la Dinofisistoxina 2 (DTX-2) y la Dinofisistoxina 3 (DTX-3), que pueden presentarse como una mezcla compleja de derivados ésteres, tanto en el plancton como en los moluscos bivalvos (Doucet *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el AO es un potente inhibidor de las serina/treonin fosfatasas tipo PP-1 y PP-2A, por lo que están relacionados en humanos con la inflamación del tracto intestinal y diarrea (Paul *et al.*, 2007). En bivalvos, las toxinas DSP suelen acumularse en glándula digestiva (76%), gónada (12%), branquias, manto y músculo (< 12%) (Bardovil *et al.*, 1993; Bauder & Cembella, 2000; Bauder *et al.*, 2001) provocando la formación de pseudoheces como patologías a nivel tisular y respuestas inmune sistémicas (Wikfors, 2005).

Bauder & Cembella (2000) han estudiado la viabilidad y el efecto tóxico de *P. lima* sobre *A. irradians* observándose que las células de *P. lima* fueron capaces de sobrevivir y de llevar a cabo división celular tras su paso por el intestino, identificándose la presencia de células viables en las heces. En estudios más detallados, se ha observado en *C. gigas* expuesto a *P. lima* que a nivel histológico existe una dilatación de túbulos intestinales, así como el desprendimiento de células del intestino, infiltración de hemocitos en manto, gónada y músculo (De las Heras, 2009). Estas observaciones resultan particularmente interesantes debido a que en los bivalvos que contienen la toxina no se observa alteración ninguna de sus características físicas como son color, olor, sabor, movimiento, tamaño o forma, es decir, en apariencia se ven normales y no generan sospechas

(Shumway & Cucci, 1987). La eliminación de la toxina es lenta, pudiendo permanecer en el tejido animal desde días hasta meses ya que los organismos reducen su metabolismo como estrategia de sobrevivencia (Bauder *et al.*, 2001).

Justificación

Un aspecto importante que debe considerarse en las investigaciones que se han realizado es que los efectos se han observado en organismos juveniles (60-80 mm) y adultos. No obstante, los ostiones en su ciclo de vida muestran al menos 3 estadios bien reconocidos: larva, juvenil y adulto; la mayoría de la información generada está más relacionada con signos fisiológicos. Sin embargo, el conocimiento sobre los procesos moleculares y rutas metabólicas involucrados en la respuesta celular a toxinas están lejos de estar bien entendidos. A pesar de los antecedentes, no se ha podido determinar exactamente el origen de las mortandades masivas de ostión y mucho menos correlacionarlos con eventos FAN. Complementario a esto y particularmente para enriquecer el conocimiento del transcriptoma de *C. gigas* en su interacción con *P. lima*, se estudiará el perfil de expresión de genes. Dichos estudios son fundamentales para el conocimiento a nivel molecular, del efecto de la presencia e ingestión de *P. lima* por el ostión, particularmente en los niveles de expresión de genes específicos que participan en diferentes procesos metabólicos como son: genes de respuesta a estrés, genes de cadena respiratoria; genes de citoesqueleto, genes de respuesta inmune y comunicación celular, genes de regulación de ácidos nucleicos, genes de regulación proteica y genes de metabolismo energético.

Considerando que se pueden presentar dos tipos de patrones de expresión de genes, adaptativa y compensatoria, de cada uno de los procesos metabólicos que ocurren durante la activación de la reacción de defensa de los organismos se puede distinguir la respuesta a dos niveles. Primero, las respuestas asociadas a inductor-receptor son alteración en el flujo de iones a través de la membrana plasmática, la fosforilación-defosforilación de proteínas específicas de la célula y la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a que es bien reconocido que la interacción de receptores celulares inicia la respuesta de defensa, que no requiere la

participación de productos obtenidos mediante activación transcripcional. Estos procesos tienen lugar dentro de los primeros 2-5 minutos de respuesta y se conoce como estrés oxidativo. Este proceso ha sido ampliamente investigado y se ha podido concluir que su actuación es la primera línea de defensa de los organismos (Manduzio *et al.*, 2005). Las EROs actúan como mensajeros secundarios activando la transcripción de genes específicos, probablemente, implicados en procesos de detoxificación y protección de daño celular causado por dicho estrés (Dahlhoff, 2004). Por tanto, se espera que la respuesta de defensa inmediata del ostión (aguda) se presente en la expresión de genes de respuesta a estrés y cadena respiratoria. El segundo momento de respuesta, sucedería a mediano plazo (exposición sub-crónica), en la que se identificará el perfil de expresión de genes involucrados en procesos de regulación de ácidos nucleicos, citoesqueleto, respuesta inmune y comunicación celular, así como de regulación proteica (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de genes analizados y características de los amplicones obtenidos. Entre paréntesis se indica el metabolismo. PE = proteínas de estrés; CR = cadena respiratoria; RAN = regulación de ácidos nucleicos; RI = respuesta inmune; C = citoesqueleto; RP = regulación proteica; ME = mantenimiento energético.

Nombre	No. acceso GenBank	Gen	Tamaño del amplicón (pb)
Glutamina sintetasa (PE)	AJ558239	cgGS	402
Glutación-S-transferasa (PE)	CB617406	cgGST	272
Proteína de estrés térmico 70 (PE)	AJ305325	cgHSP70	480
Proteína de estrés térmico 90 (PE)	EF687776	cgHSP90	491
Superóxido dismutasa CuZn (PE)	AJ496219	cgCuSOD	542
Peroxidasa melanogénica (PE)	CB617557	cgPOXM	450
ATP-sintetasa subunidad beta (CR)	CF369132	cgATPSb	416
Subunidad P2X4, canal iónico (CR)	CB617507	cgP2X4	400
Citocromo oxidasa I (CR)	AB033687	cgCOI	483
Proteína p21 (RAN)	CB617437	cgP21	640
Sub. 1 del ass-factor de p55cromatina (RAN)	CB617555	cgCHRAFP55	500
Factor de elongación 2 (RAN)	CB617558	cgFE2	455
Inmunoelectina B (RI)	CB617455	cgIMMLB	542
LPS y b-1,3 glucano (RI)	CB617438	cgLPSBP	455
Lectina hepática (RI)	CB617560	cgLH	620
b-timosina (C)	CB617380	cgTHYM	455
Actina GIA (C)	AF026063	cgACTN	582
Actina citoplasmática A3 (C)	CF369133	cgACTCA	364
Tubulina (C)	CB617442	cgTUB	393
Lisozima (RP)	CB617495	cgLIZ	415
Tripsina (RP)	CB617494	cgTRIP	278
Inhibidor de proteasas (Ser o Cys) (RP)	CB617554	cgINSERP	432
Fosfatasa alcalina (ME)	CB617556	cgALKP	351
Glucanasa b-1,3 (ME)	CB617548	cgGLNS	390
28S (CONTROL)	AY632555	cg28S	300

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Material y métodos

Organismos experimentales

Crassostrea gigas. Juveniles de *C. gigas* (3 a 5 mm) se obtuvieron del laboratorio de producción “Acuacultura Robles SPR de RI” ubicado en Bahía Magdalena Baja California Sur, México (25.29° N, 110.93° W). Los ostiones se aclimataron en el laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) durante 168 horas en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada (0.45 µm), con flujo de oxígeno, temperatura promedio de 21°C y salinidad controlada (35 ups). La dieta consistió de 1.5×10^5 cels/mL de *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

Microalgas. En este estudio se usó el dinoflagelado bentónico *P. lima* (cepa PRL-1), aislado de la Isla El Pardito (24.5° N, 110.4° W) ubicada en la Bahía de La Paz, en el Golfo de California, BCS (Heredia-Tapia *et al.*, 2002), cuyo contenido de toxinas (bajo condiciones estándar de cultivo) se ha caracterizado mediante LC/MS: AO = 2.041 pg/cel, DTX1 = 1.33 pg/cel y DTX2 = 0.09 pg/cel (Núñez-Vázquez *et al.*, 2003; González-Rivera, 2009). *P. lima* fue propagado en medio f/2+Se (Guillard & Ryther, 1975) preparado con agua de mar filtrada (0.45 µm), esterilizada con UV y esterilizada en autoclave a 121 lb de presión (Ajuzie, 2007). Los dinoflagelados se crecieron en volúmenes de 1000 mL en matraces Fernbach de policarbonato de 2.8 L, con un fotociclo de luz:oscuridad de 12:12 h (irradiancia 150mE m²/s) a 23°C (±1), hasta alcanzar la densidad de 3×10^4 cels/mL (fase exponencial tardía, día 18) (López-Cuevas, 2009). Como dieta no tóxica se suministró *I. galbana* (1.5×10^5 cels/mL) en el control (Gerdes, 1983; Bougrier *et al.*, 1997).

Diseño experimental: *C. gigas* expuesto con *P. lima*

Se formaron cuatro grupos de 40 juveniles de *C. gigas* de 3-5 mm que fueron colocados en recipientes de cristal estériles de 100 mL, con 20 mL de agua de mar estéril y flujo de oxígeno. Se probaron cuatro condiciones experimentales en un volumen final de 20 mL (Control = *I. galbana*, TR1 = *I. galbana* + *P. lima* a 3×10^2 , TR2 = *I. galbana* + *P. lima* a 3×10^3 , TR3 = *I. galbana* + *P. lima* 3×10^4 cels/mL) con tres replicas cada uno. Se realizaron siete muestreos: uno en la hora

cero del bioensayo, tres correspondientes a la exposición aguda (≤ 24 h: 3, 6 y 24 h) y tres correspondientes a la exposición sub-crónica (>48 h: 72, 168 y 336 h) (Bauder *et al.*, 2001; Galimany *et al.*, 2008). En cada muestreo se colectaron 5 organismos para la extracción de ARN total. Las microalgas se proporcionaron en una sola dosis diaria. Los organismos muestreados se enjuagaron con agua de mar estéril, eliminando el exceso de líquido sobre toallas adsorbentes. Las muestras se almacenaron a -80°C en 750 mL de TRIzol (TRIzol® Plus RNA Purification Kit, Invitrogen) hasta su posterior procesamiento y análisis.

Extracción de ARN y RT-PCR

Las muestras se descongelaron en baño de hielo y el ARN total se extrajo con TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En total, se procesaron 21 muestras control y 63 muestras experimentales ($n = 5$), en las que se verificó la ausencia de ADN genómico mediante PCR directo utilizando los cebadores para el gen 28S ribosomal que fue usado como control (Tabla 1). El ADNc se sintetizó a partir de 2.5 mg de RNA cuantificado espectrofotométricamente (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) con el Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit® (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación de los transcritos de los genes que codifican las 24 proteínas consideradas en este estudio (Tabla 1) contenían: 300 ng del ADNc sintetizado (en un volumen de 1 μL), 2.5 μL de cada oligo (10 pM), 1.5 μL de MgSO_4 (50 mM), 5 μL de amortiguador PCR 10X, 1 μL de dNTP's (10 mM), 1U de Platinum Taq polimerasa (1 U/ μL , Invitrogen) y agua mili-Q estéril para completar un volumen final de 50 μL . Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Corbett (Mod. CG1-96), el programa utilizado en las reacciones de amplificación consistió de: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento a 45°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min, y un periodo de extensión final a 72°C por 10 min.

La verificación cualitativa del ADN amplificado se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa-Synergel/TBE al 1% (Bioamerica, Inc.) preteñidos con bromuro de etidio (EtBr), cargando en cada línea 6 μL de cada reacción, en una cámara horizontal (Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70-80V durante 40-45 min.

Los geles se observaron bajo luz UV y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc (UVP, England) bajo las siguientes condiciones estandarizadas: foco 4, aumento 25X y brillo 0.400. La cuantificación de la señal de fluorescencia de cada amplicón se realizó usando el software UVIDOC V.97.

Análisis estadístico

Para observar la interacción entre los tratamientos (*I. galbana* y tres concentraciones de *P. lima*) proporcionados como alimento a *C. gigas* y el tiempo de exposición, los datos de fluorescencia (unidades relativas) se analizaron utilizando el análisis de varianza del modelo lineal general (ANOVA) (Statistic 7). Se realizaron análisis de varianza de dos vías para cada gene, tratamiento, tiempo de exposición y proceso metabólico, después de probar las suposiciones de distribución de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas para identificar los tratamientos responsables de las diferencias significativas, utilizando la prueba de comparación múltiple de Fisher (LDS). El valor de significancia estadística utilizado fue $p < 0.05$.

Resultados

Se confirmó tamaño de los amplicones obtenidos con los 25 juegos de cebadores o *primers*, se realizó el bioensayo con juveniles de 3 a 5 mm, para caracterizar la expresión de los 25 genes enlistados en la Tabla 1, como respuesta de la exposición de *C. gigas* a tres concentraciones de *P. lima* (3×10^2 , 3×10^3 y 3×10^4 cels/mL) a diferentes tiempos de exposición (0, 3, 6, 24, 72, 168 y 336 h). Cabe mencionar, que se realizaron recambios de agua del 100% cada 24 h, y que la toma de muestras siempre se realizó a la misma hora del día. Mediante el análisis estadístico (ANOVA) de los datos de intensidad relativa de la fluorescencia de los amplicones obtenidos (volumen de cada pico), se obtuvo un valor de significancia de $p < 0.05$, con lo que se demostró un patrón de expresión génica diferencial (incremento y decremento de la expresión, según el caso) tanto a las diferentes concentraciones de *P. lima* probadas como a los diferentes tiempos de exposición. El gen 28S no mostró variación significativa durante ambas condiciones experimentales, por tanto se consideró como gen control de la expresión.

Las diferencias en la expresión génica fueron más significativas cuando se comparó la respuesta con la interacción de los dos factores (tiempo y concentración). Los resultados de la expresión de los 25 genes estudiados se presentan de manera gráfica (Figuras 1-6), en grupos, de acuerdo a las rutas metabólicas determinadas previamente (Tabla 1). En el tratamiento control, a lo largo de los diferentes tiempos de muestreo, se identificó un comportamiento con alta variación individual. Un punto crítico en este trabajo se observó en el análisis de datos a las 6 h, ya que se presentó un incremento de la expresión de los organismos control y de los organismos expuestos a *P. lima*. Lo anterior es evidente en los registros de la expresión de ciertos genes como: ATP sintetasa, el canal iónico P2X4 y la citocromo oxidasa I (COI); únicamente en ese punto de muestreo (y en sus tres réplicas) su expresión fue observada por encima del control.

Los genes antes mencionados están relacionados con la cadena respiratoria, por lo que se deduce que en ese tiempo, se presentó una situación de estrés severo para todos los organismos no percibido ni controlado por nosotros (Figura 1). Además, ese punto (6 h de exposición) sólo se detectó la expresión del gen Inmunolectina B (que participa en la respuesta inmune innata), sin embargo, no es posible interpretar la expresión de este gen como respuesta específica de *P. lima*, debido a que en el grupo control se observó el mismo comportamiento (Figura 2). El mismo tipo de resultados se observó en el gen Glucanasa b-1,3 del metabolismo energético. Los organismos no exhibieron deterioro fisiológico aparente como respuesta al tiempo de exposición a *P. lima* en los tratamientos TR1 y TR2 (3×10^2 y 3×10^3 cels/mL, respectivamente), sin embargo, en los organismos expuestos a 3×10^4 cels/mL (TR3) la tasa de aclaramiento aparente fue más lenta y su aspecto físico externo fue más oscuro. En el experimento la mortalidad fue cero.

Al analizar los patrones de expresión de los genes, se pueden identificar aquellos que permiten analizar la expresión diferencial del ostión ante la exposición aguda y sub-crónica al dinoflagelado, como por ejemplo: *gst*, *h70*, *sod*, *atp*, *p2x₄*, *p21*, *chr*, *fe2*, *lps*, *acc* y *ins*, ya que todos ellos exhibieron variaciones significativas en sus niveles de expresión respecto al gen control (28S), al tiempo de exposición

(0, 3, 6, 24, 72, 168 y 336 h) y a los tratamientos con *P. lima* (3×10^2 , 3×10^3 y 3×10^4 cels/mL) (Figuras 1-6). Estos resultados permiten abordar el problema mediante técnicas cuantitativas como un análisis qPCR de los genes antes mencionado. Adicionalmente, se observó (y confirmó) que genes como el de Glutamina sintetasa (*gs*) (Figura 3); Actina (*act*) y Tubulina (*tub*) (Figura 5) y COI (Figura 1), presentaron una expresión fuertemente regulada, que puede considerarse como constitutiva, en los TR1 y TR2 (3×10^2 y 3×10^3 cels/mL, respectivamente), independientemente del tiempo de exposición.

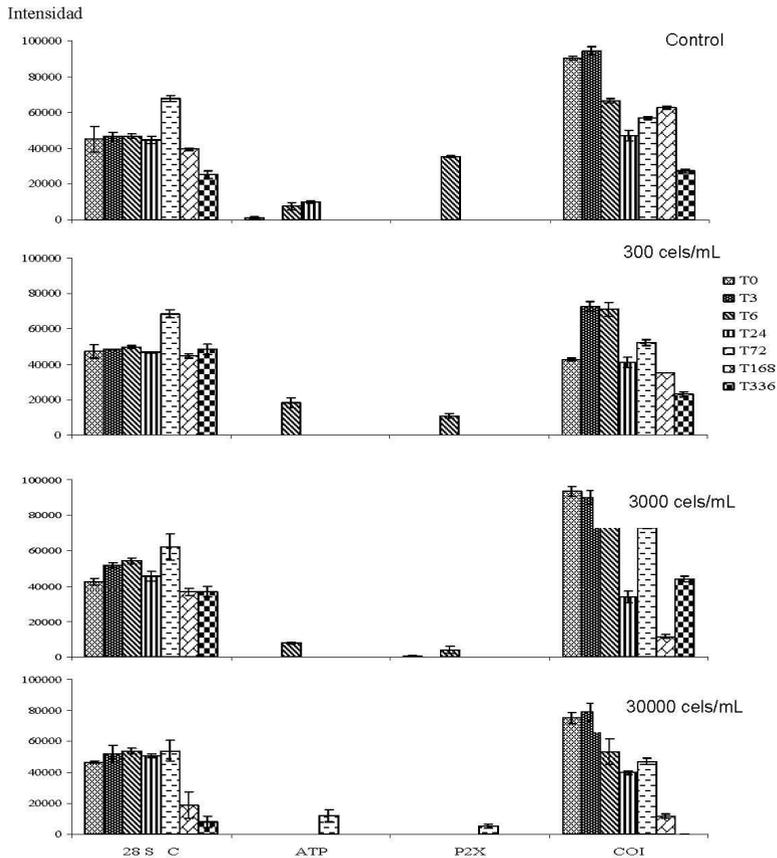


Figura 1. Genes indicadores de cadena respiratoria de *C. gigas* expuesto a *P. lima* PRL-1. ATP = ATP sintetasa sub. beta; P2X = Subunidad P2X4 canal iónico; COI = Citocromo oxidasa I; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

Por otro lado, el grado de afectación metabólica de ostiones expuestos al TR3 (3×10^4 cels/mL) durante 14 días es severo y letal (puede considerarse que los organismos estaban agonizando), ya que de los 25 genes monitoreados el patrón de bandeado de expresión se redujo únicamente a 3 genes: *tub*, *28s*, *gs* (con señal detectable y visible en geles de agarosa-BrEt), mientras que otros como el COI, *p21* y *fe2* la señal obtenida apenas fue perceptible. Estos resultados representan la primera evidencia de afectación metabólica resultado de la exposición dosis y tiempo-dependiente de *C. gigas* a *P. lima*.

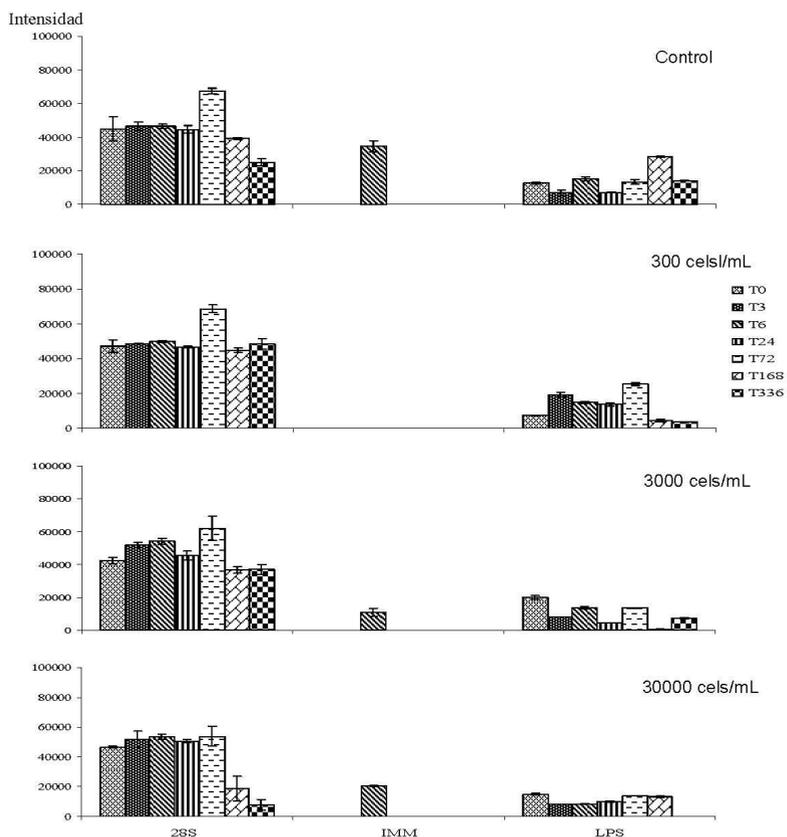


Figura 2. Genes indicadores de comunicación celular y respuesta inmune de *C. gigas* expuesto a *P. lima* PRL-1. IMM = Inmunolectina B; LPS = Proteína de unión LPS y b-1,3 glucano; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

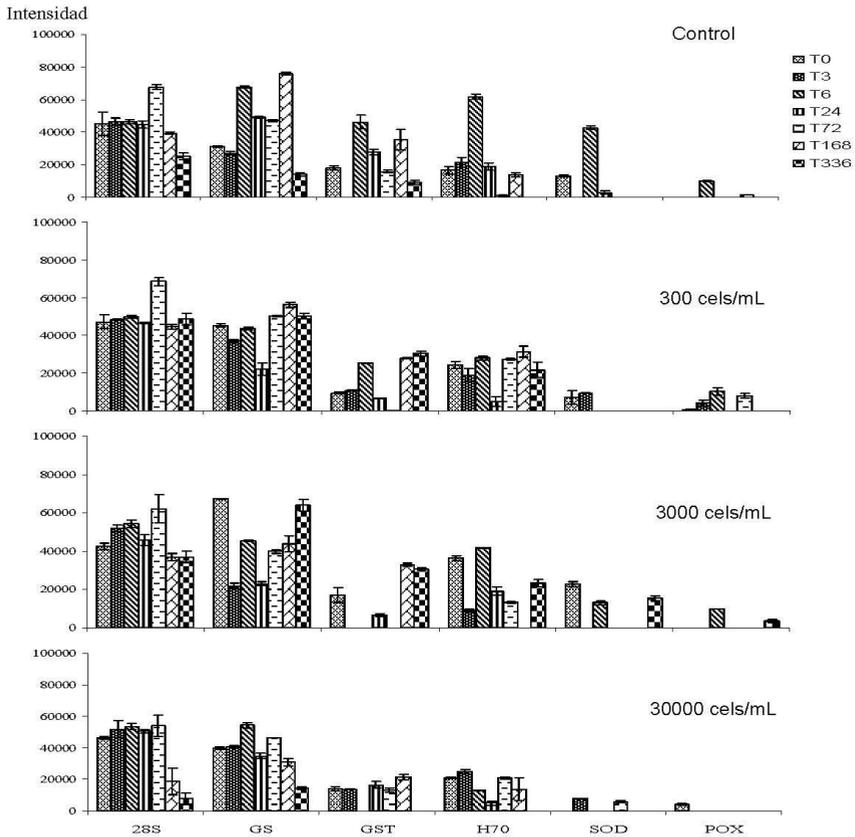


Figura 3. Genes indicadores de proteínas de estrés de *C. gigas* expuesto a *P. lima*. GS = Glutamina sintetasa; GST = Glutación S-transferasa; H70 = Proteína de shock térmico 70; SOD = Superóxido dismutasa CuZn; POX = Peroxidasa melanogénica; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

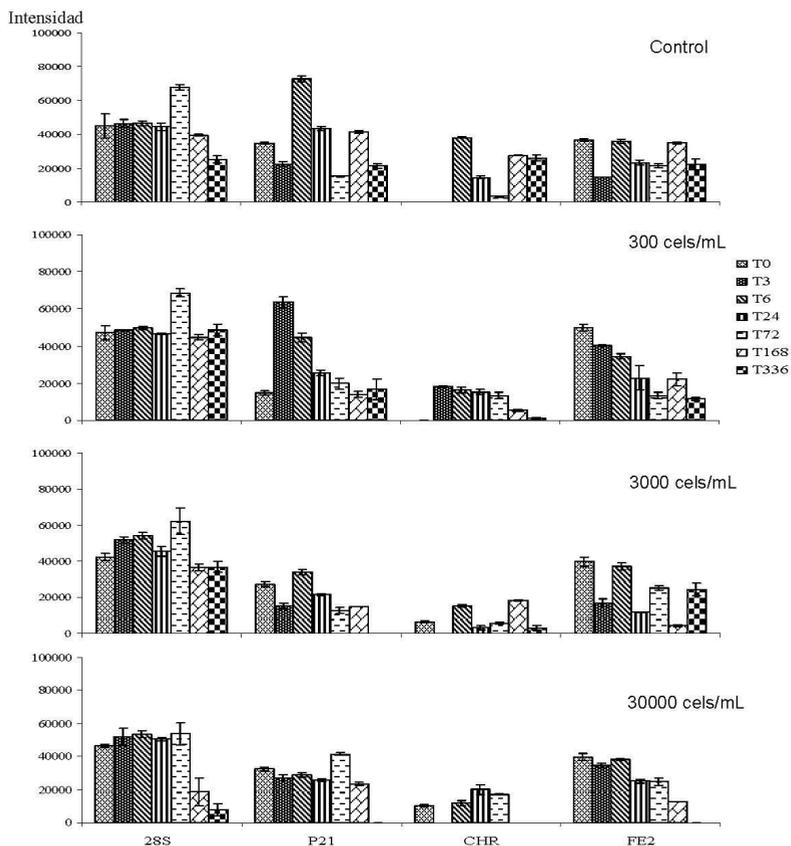


Figura 4. Genes indicadores de regulación de ácidos nucleicos de *C. gigas* expuesto a *P. lima* PRL-1. P21 = Proteína p21; CHR = Sub.1 dell factor de ensamblaje p55 de la cromatina; FE2 = Factor de elongación 2; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

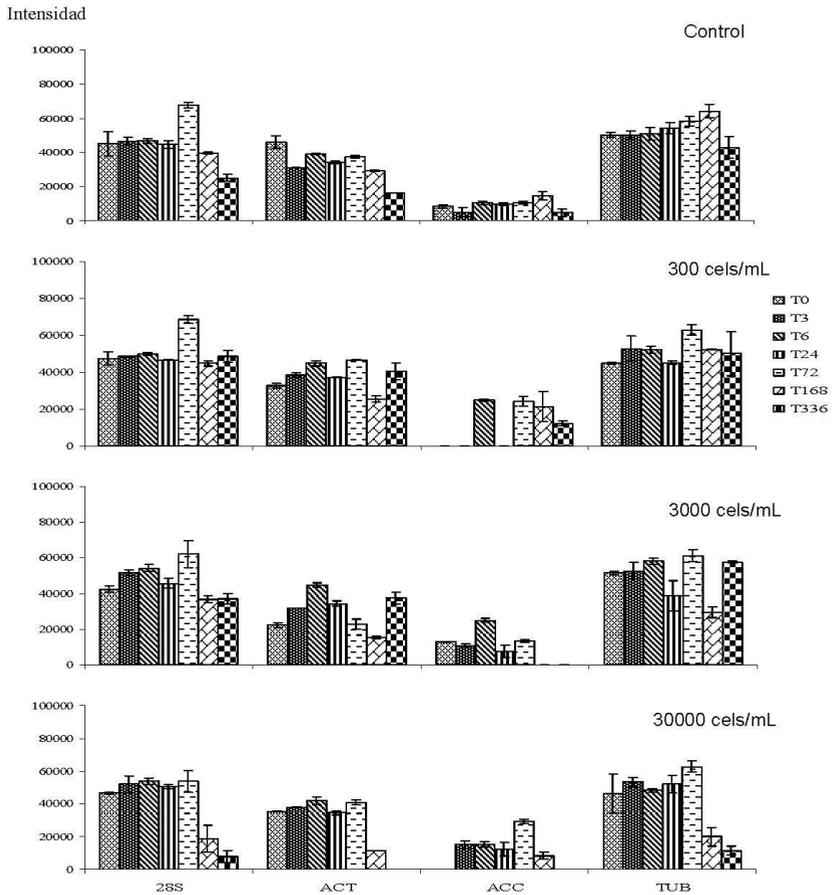


Figura 5. Genes indicadores de citoesqueleto de *C. gigas* expuesto a *P. lima* PRL-1. ACT = Actina GIA; ACC = Actina citoplasmática; TUB = Tubulina; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

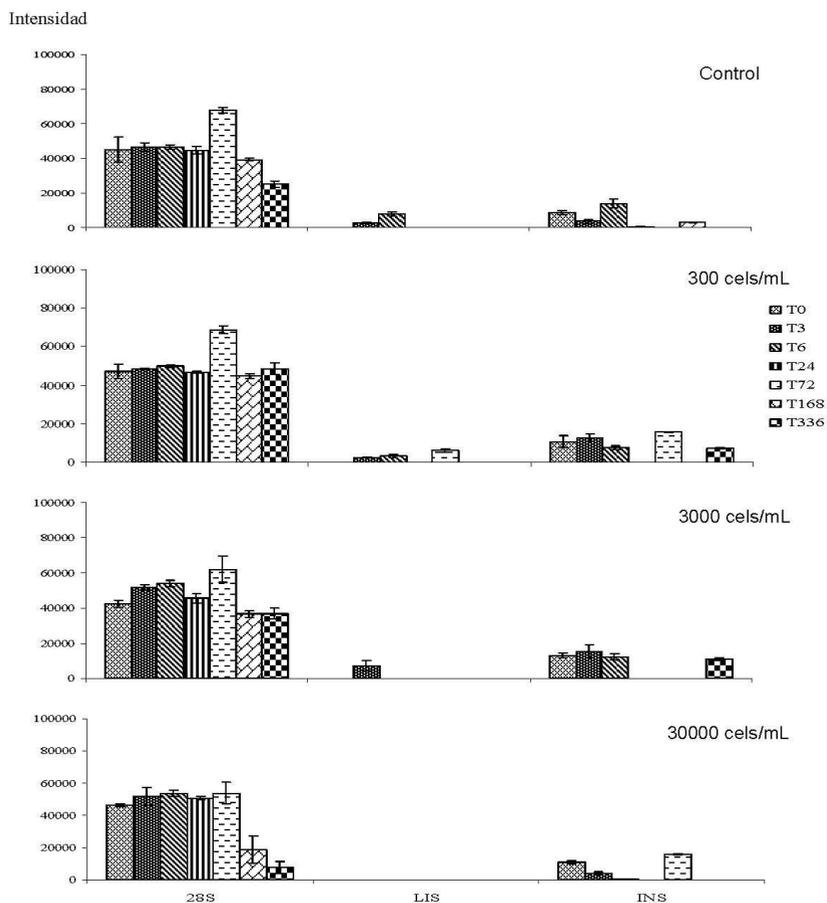


Figura 6. Genes indicadores de regulación proteica de *C. gigas* expuesto a *P. lima* PRL-1. LIS = Lisozima; INS = Inhibidor de proteinasas; 28S = subunidad del ARN ribosomal 28S.

Discusión

Mediante el análisis de los resultados de los niveles de expresión de 25 genes (bioensayo de exposición de ostiones de 3-5 mm), se pudo confirmar las observaciones de Manduzio *et al.* (2005), al encontrar que la primera barrera de defensa de los organismos está dada por proteínas de estrés: los genes seleccionados como indicadores de este proceso metabólico, presentaron una expresión mayor en comparación a la del resto de los genes monitoreados (Figura 3). Adicionalmente, se puede observar que los niveles de expresión alcanzados por estos genes son afectados tanto por el tiempo como por la densidad de microalgas a las que los organismos fueron expuestos.

Por otra parte, la expresión de SOD en los ostiones de 3 a 5 mm se detectó básicamente como respuesta temprana (experimento de exposición agudo, < 24h) (Figura 3), lo que coincide con lo reportado por Campa-Córdova *et al.* (2009) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *Nodipecten subnodosus* retados con 5,000 cels/mL de *P. lima* donde su actividad enzimática relativa se observó dentro las primeras 6 horas de exposición. En lo que se refiere a la Glutamina sintetasa (GS), se observó un aumento gradual en los niveles de expresión al incrementarse la concentración de *P. lima*. Al realizar el ANOVA, la expresión de la GS presentó diferencias significativas respecto a los controles cuando los ostiones se expusieron a los TR1 y TR3 (Figura 3). En otros trabajos, se ha demostrado que la expresión de la GS está asociada con la respuesta de *C. gigas* a pesticidas, a otros contaminantes hidrocarbonados y a infecciones con parásitos (Boutet *et al.*, 2004b; Tanguy *et al.*, 2005).

En *C. gigas*, el segundo proceso metabólico que presenta una respuesta inmediata en ambientes de estrés es la cadena respiratoria. Se ha demostrado que los organismos bajo condiciones de estrés reducen su tasa respiratoria y buscan alternativas para alimentarse (Dahlhoff, 2004; Tran *et al.*, 2010). La ATP sintetasa subunidad beta participa directamente en la síntesis de ATP. Por tanto, al identificar una baja señal de amplificación se deduce que la expresión de este gen disminuye bajo nuestras condiciones de exposición a *P. lima* (Figura 1). La expresión del gen COI fue detectada en todas las condiciones experimentales

probadas, sin embargo, presentó variaciones respecto al tiempo de exposición y a la concentración del dinoflagelado (Figura 1) y puede ser considerada como indicador de un desorden metabólico tardío; detectado en el TR3 a los 7 días de exposición (168 h). No obstante, a las 6 h de exposición con el TR2 el gen COI presentó alto nivel de expresión (aún por encima del tratamiento control), lo que indica gran actividad en la cadena respiratoria, probablemente para mantener en lo posible la homeostasis metabólica del organismo (Figura 1).

Si a lo anterior le sumamos la respuesta del canal iónico $P2X_4$ (purino-receptor) (Figura 1) que tiene mayor permeabilidad de calcio, la entrada de elevadas cantidades de este ión a través de los canales puede contribuir a una patología asociada con estos receptores, comúnmente provocada por ATP (Galindo & Flores, 2006), lo que confirma la presunción de que durante el bioensayo (a las 6 h de exposición) se presentó una situación crítica que no fue percibida ni controlada (datos en análisis). En el proceso de regulación de ácidos nucleicos (genes *p21*, *chr* y *fe2*) (Figura 4), se determinaron diferencias significativas entre la expresión de estos genes respecto al control, el tiempo de exposición y la densidad celular de *P. lima* probadas. Por lo tanto, puede decirse que los tres genes son excelentes indicadores de afectación, por lo que serán útiles en la realización de los análisis mediante qPCR. Cabe destacar que P21 produce alteraciones en la regulación del ciclo celular, deteniendo el proceso de división celular por inhibición de la replicación de DNA al actuar sobre las ciclin-quinasas (CDKs); frecuentemente se le relaciona con la recurrencia tumoral (Vallamanya *et al.*, 2006).

Sin embargo, se requieren más estudios para corroborar el impacto de *P. lima* PRL-1 en la inducción de la expresión de este gen, así como su participación en la formación de micronúcleos, que son estructuras nucleares observadas por Carvalho Pinto-Silva *et al.* (2005) en *Perna perna* (Bivalvia). La expresión de inmunoelectina B, se considera en *C. gigas* como un mecanismo de respuesta inmune mediada por los hemocitos y proteínas disueltas en la hemolinfa (aglutininas y lisina). Por tanto, la presencia del amplicón de inmunoelectina B, como respuesta temprana (6 h) tanto en los organismos control como en tratamientos, se suma a la incógnita de lo sucedido en el bioensayo a ese tiempo, y nos obliga a realizar un segundo bioensayo en fase aguda (24 h), con la recomendación de tomar más muestras a intervalos de tiempo menores (Figura 2).

La expresión del gen que codifica la proteína de unión a lipopolisacárido-b-1,3 glucano (LPS) presentó variación en los TR1 y TR3 (3×10^2 y 3×10^3 cels/mL, respectivamente), además del efecto por el factor tiempo, así como la interacción de ambos factores (tiempo-concentración) (Figura 2). Lo anterior permite inferir (de manera preliminar) que la síntesis de transcritos de LPS-b 1-3 glucano es parte de una respuesta de protección del ostión ante la presencia del dinoflagelado tóxico. De acuerdo con Tanguy *et al.* (2005) la proteína LPS-b 1-3 glucano forma un complejo de reconocimiento proteico (LGBP) que se ha demostrado activa la cascada profenoloxidasas y resulta ser una respuesta general de moluscos ante condiciones de estrés (independientemente de su naturaleza). En el bioensayo se observó oscurecimiento en la pigmentación de los organismos expuestos al TR3 (3×10^4 cels/mL) y la tasa de aclaramiento aparente fue menor.

La expresión constitutiva de ciertos genes permite aumentar los niveles de resistencia del organismo frente al dinoflagelado tóxico, así proteínas como la actina, actina citoplasmática y tubulina desempeñan un papel directo en el mantenimiento del estado de resistencia (Figura 5) (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2010). La expresión del gen que corresponde al inhibidor de proteasas, cuya participación metabólica está involucrada en regulación proteica en los organismos (funciona en la digestión y en la reducción de proteínas no deseadas), se observó como una respuesta temprana (o en fase aguda), ya que en la parte sub-crónica del experimento (> 24) prácticamente estuvo ausente su expresión (Figura 6). Lo mismo sucedió con los transcritos del gen que codifica la lisozima. Las observaciones confirman el estado de aletargamiento metabólico del ostión, sugiriendo que la fuente principal de energía para el sostenimiento metabólico, bajo estas condiciones de estrés, son proteínas y lípidos, lo que se refleja en disminución del desarrollo y de la tasa de crecimiento (Wikfors, 2005).

Hasta el momento, nuestros resultados permiten demostrar que el perfil de respuesta a nivel molecular respecto a expresión génica (inducción o supresión) en *C. gigas* es un proceso activo y controlado por múltiples genes, como respuesta a la exposición a un organismo toxigénico, productor de toxinas DSP. Además, la respuesta sistémica no está acompañada de formación de lesiones aparentes y representa, por tanto, la situación defensiva idónea, ya que como

C. gigas otros bivalvos tampoco presentan daño aparente a pesar de la ingesta (Hégaret *et al.*, 2007) y bioacumulación temporal de toxinas dada por la ingestión de organismos toxigénicos (Bauder & Cembella, 2000; Bauder *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2005).

Estos resultados generan mayor inquietud respecto a la respuesta molecular del ostión ante la exposición a un dinoflagelado tóxico productor de toxinas DSP, aún cuando se cuenta con un avance significativo con relación a la comprobación de la afectación de rutas metabólicas específicas involucradas tanto en una respuesta adaptativa como compensatoria. A la fecha, se realizó un segundo bioensayo con organismos juveniles de 40-60 mm, expuestos a dos tratamientos de *P. lima* (TR2 y TR3), para determinar la expresión tejido-específica (hemolinfa, músculo, branquia, gónada y glándula digestiva) tanto en fase aguda (0, 3, 6, 12 y 24 h) como sub-crónica (0, 1, 3, 7, 10 y 14 días), acortando los intervalos de muestreo durante la exposición con la finalidad de realizar un análisis más específico. Una vez que se analicen los resultados obtenidos en este bioensayo, se determinarán las condiciones experimentales que se establecerán para la elaboración de las librerías de hibridación sustractivas, a partir de ARN en hemocitos, glándula digestiva y branquia.

Referencias

- Ajuzie, C.C. 2007. Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. *J. Appl. Phycol.*, 19: 513–519.
- Baqueiro-Cárdenas, E.R., L. Borade, C.G. Goldaracena-Islas & J. Rodríguez-Navarro. 2007. Los moluscos y la contaminación: una revisión. *Rev. Mex. Biodivers.*, 78: 1–7.
- Bardovil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier & P. Lassus. 1993. Experimental study of the effect of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.*, 12: 417–422.
- Bauder, A.G. & A.D. Cembella. 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *J. Shellfish Res.*, 19: 321–324.

- Bauder, A.G., A.D. Cembella, V.M. Bricelj & M.A. Quilliam. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 213: 39–52.
- Bougrier, S., A.J.S Hawkins & M. Héral. 1997. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analyzed by flow cytometry. *Aquaculture*, 150: 123–134.
- Boutet, I., A. Tanguy & D. Moraga. 2004a. Characterization and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.*, 146: 53–64.
- Boutet, I., A. Tanguy & D. Moraga. 2004b. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, evolved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679: 29–36.
- Campa-Córdova, A.I, E.J. Núñez-Vázquez., A. Luna-González, M.J. Romero-Geraldo & F. Ascencio. 2009. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxin dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comp. Biochem. Phys. Part C*, 149: 317–322.
- Carvalho Pinto-Silva, C.R., EE. Creppy & W.G Matias. 2005. Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Toxicol.*, 79: 422–426.
- Cognie, B., L. Barillé & Y. Rincé. 2001. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. *Estuar. Coast*, 24: 126–131.
- Cortés-Altamirano, R. & A.P. Sierra-Beltrán. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algal bloom occurring in Mexico. *Toxin Review*, 27: 27–77.
- Dahlhoff, E.P. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Ann. Rev. Physiol.*, 66: 183–207.
- David, E., A. Tanguy, K. Pichavant & D. Moraga. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.*, 272: 5635–5652.
- De las Heras, S. 2009. *Efecto de dinoflagelados tóxicos del genero Prorocentrum (Dinophyceae) en el ostión japonés Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)*. Tesis

- de licenciatura. UABCS, La Paz, 75 p.
- Doucet, E., N. Ross & M.A. Quilliam. 2007. Enzymatic hydrolysis of esterified diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 335–342.
- Farcy, E., C. Voiseux, J.M. Lebel & B. Fiévet, B. 2008. Transcriptional expression level of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperon*, DOI 10.1007/s12192-008-00918.
- Gainey, L.F. & S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.*, 7(4): 623–628.
- Galimany, E., I. Sunila, H. Hégaret, G.H. Wikfors & M. Ramón. 2008. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae*, 7: 630–638.
- Galindo, F. & A. Flores. 2006. De la energética a la neurotransmisión de adenosin trifosfato y sus receptores. *Rev. Neurol.*, 43: 667–677.
- Gerdes, D. 1983. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Part I. Feeding behavior of larvae and adults. *Aquaculture*, 31: 195–219.
- Gilbert, P. & G. Pitcher. 2001. *GEOHAB: Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*. Science Plan P. SCOR y OIC, Baltimore, 86 p.
- González-Rivera, L. 2009. *Estudio de la capacidad hepatocarcinogénica del extracto de toxinas diarreicas (DSP) del dinoflagelado Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge, en el modelo del hepatocito resistente en la rata Fischer 344*. Tesis de licenciatura. UABCS, La Paz, 49 p.
- Guillard, R.L.L. & R.H. Ryther. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, 29–60. En: Smith, W.L. & M.M. Chalg (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, Nueva York.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors & S.E. Shumway. 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusk when exposed to three species of harmful algae. *J. Shellfish Res.*, 26(2): 549–559.
- Heredia-Tapia, A., B.O. Arredondo-Vega, E.J. Núñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Yasuda & J.L. Ochoa. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, México. *Toxicon*, 40: 1121–1127.
- Lacoste, A., S.K. Malham, F. Gelebart, A. Cueff & S.A. Poulet. 2002. Stress-induced

- immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 1–9.
- López-Cuevas, A. 2009. *Determinación de la cinética de crecimiento de Prorocentrum lima (PRL-1)*. Memoria de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de La Paz, 69 p.
- Manduzio, H., B. Rocher, F. Durand, C. Galap & F. Leboulenger. 2005. The point about oxidative stress in mollusks. *Invertebr. Survival J.*, 2: 91–104.
- Núñez-Vázquez, E., A. Heredia-Tapia, J. Pérez-Urbiola, R. Alonso-Rodríguez, J. Arellano-Blanco, A. Cordero-Tapia, J. Pérez-Linares & J.L. Ochoa. 2003. Evaluation of dinoflagellate toxicity implicated in recent HAB events in the Gulf of California, México, 64 p. En: Holland, P., L. Rhodes & L. Brown (Eds.) *Proceedings from HABTech 2003 Workshop, APEC Cawthron Report No. 906*. Nelson, Nueva Zelanda.
- Paul, V.J., K.E. Arthur, R. Ritson-Williams, C. Ross & K. Sharp. 2007. Chemical defenses: from compounds to communities. *Biol. Bull.*, 213: 226–251.
- Pearce, I., J.H. Handler & G.M. Hallegraeff. 2005. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae*, 4: 61–74.
- Pipe, R.K. & J.A. Coles. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immun.*, 5: 581–595.
- Saavedra, C. & E. Bachère. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1–14.
- Shumway, S.E. & T.L. Cucci. 1987. The effect of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.*, 10: 9–27.
- Smayda, T.J. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanography*, 58: 281–294.
- Tanguy, A., I. Boutet, J. Laroche & D. Moraga. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.*, 272: 390–403.
- Tiscar, P.G. & F. Mosca. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.*, 28: 57–62.
- Tran D., H. Haberkorn, P. Soudant, P. Ciret & J.C. Massabuau. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298(3-4): 338–345.

- Vallamanya, F.R., A. Laborda Rodríguez, J. Lloreta Trull, A.R. Cortadellas, J. Placer Santos & A. Gelabert Mas. 2006. Expresión inmunohistoquímica de p53, p21, p16 y ciclina DI en el cáncer de vejiga superficial. Estudio en un soporte de tissue microarray. *Actas Urol. Esp.*, 30: 754–762.
- Wikfors, G.H. 2005. A review and new analysis of trophic interactions between *Prorocentrum minimum* and clams, scallops and oysters. *Harmful Algae*, 4: 585–592.