

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**RESPUESTA AL ESTRÉS AMBIENTAL EN LAS COLONIAS DEL  
CORAL *Pocillopora* EN LA REGIÓN CENTRAL DEL PACÍFICO  
MEXICANO**

**TESIS**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
*Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera***

**PRESENTA**

***Alma Paola Rodríguez Troncoso.***

**Ensenada, Baja California, Julio del 2010**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

‘Respuesta al estrés ambiental en las colonias del coral *Pocillopora* en la región central  
del Pacífico Mexicano’

TESIS

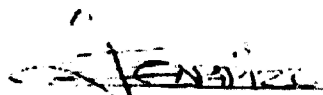
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Alma Paola Rodríguez Troncoso

Aprobada por:



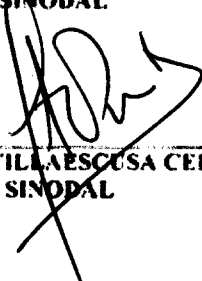
DR. EUGENIO DE JESÚS CARPIZO ITUARTE  
DIRECTOR




DR. AMILCAR L. CUPUL MAGAÑA  
SINODAL



DRA. ELIZABETH PONCE RIVAS  
SINODAL



DR. JULIO VILLASECA CELAYA  
SINODAL



DR. LUIS E. CALDERÓN AGUILERA  
SINODAL

## DEDICATORIA

A mis padres quienes siempre me han motivado a conseguir mis sueños

A mi hermano quien me ha dado el ejemplo de siempre seguir adelante

A Lum con quien compartí el final de este camino y ahora estamos trazando un nuevo  
camino juntos

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eugenio Carpizo quien me ha apoyado durante toda mi trayectoria y tenerme adoptada como su hija académica, me ha apoyado en mis locuras, y ayudado a madurar mis ideas para encontrar la manera de llevarlas a cabo.... al fin lo logramos!!!

Al Dr. Amilcar Cupul por que sus consejos fueron parte fundamental 'de mi formación', y por todo el tiempo que le dedicamos a este trabajo. Sin tu apoyo no hubiera sido posible.

A la Dra. Elizabeth Ponce por sus comentarios y aportaciones que me ayudaron mucho para comprender y mejorar la aproximación molecular del presente trabajo.

Al Dr. Julio Villaescua por las aportaciones que enriquecieron el presente trabajo.

Al Dr. Luis Calderón por el apoyo a la presente investigación; y espero que sigamos colaborando en proyectos futuros.

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo asociado al Instituto de Investigaciones Oceanológicas- Universidad Autónoma de Baja California, y en las instalaciones del Centro Universitario de la Costa (UdeG). Los recursos necesarios que me permitieron el desarrollo de esta investigación, fueron otorgados por el proyecto interno ECI IIO-UABC y la beca de doctorado CONACYT No. 188766, así como por:

- Proyecto ACM 'Implementación del programa de monitoreo ambiental marino de los Parques Nacionales Isla Isabel e Islas Marietas, Nayarit'
- Programa de movilidad estudiantil 2008-2 y 2009-1 así como fondos PIFI (2009-2) a cargo de la UABC-FCM-IIO
- Proyecto: LCA 'Vulnerabilidad de los arrecifes coralinos de las Costas Mexicanas por efecto del Cambio Global y posibles consecuencias socio ambientales'

A las autoridades y personal del Parque Nacional Islas Marietas por las facilidades otorgadas y al Biol. José Luis Jiménez por su ayuda las actividades de campo.

A mis amigos Polo, Miki, Raque, Linda, Eric, Zamo, Emiliano, Yuyus, Mariana, Santa y George con quienes he recorrido este largo camino juntos y quienes a pesar de la distancia seguirán siendo parte de mi familia.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Roberto, Rox, Dora, Luvia, Tatiana. A Maricruz y Ariel que me ayudaron con el procesamiento de muestras durante su semestre de ayudantía de investigación.

A Corin y Eleazib por su valiosa ayuda durante su periodo de servicio social. Así como, a Angie, Brenda, Vianney, Gisel, Daniel y Omar por su ayuda en la parte experimental durante su estancia en Vallarta por medio del programa Delfín del verano científico 2009.

A la Dra. Ruth Gates por admitirme en una estancia de investigación en el instituto de biología Marina en Honolulu y al Dr. Anderson Mayfield por las asesorías en el trabajo molecular otorgadas así como ayuda en los escritos resultantes del presente trabajo.

A las autoridades y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

**Y A TODOS AQUELLOS QUE POR FALTA DE MEMORIA, MÁS NO POR FALTA DE GANAS NO PUDE MENCIONAR.... MUCHAS GRACIAS...**

## I. ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. Índice General	I
II. Índice de Figuras	IV
III. Índice de tablas	VI
IV. Resumen	VII
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	5
✓ OBJETIVO GENERAL	5
✓ OBJETIVOS PARTICULARES	5
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	6
<b>HIPÓTESIS</b>	7
<b>CAPÍTULO 1.</b> Respuesta al incremento abrupto de temperatura (“choque térmico”) en el coral <i>Pocillopora verrucosa</i> en condiciones de laboratorio	
1.1 Introducción	8
1.2 Objetivo	9
1.3 Materiales y Métodos	10
1.3.1 Área de estudio y trabajo experimental	10
1.3.2 Trabajo de laboratorio	12
1.4 Resultados	14
1.5 Discusión	19
<b>CAPÍTULO 2.</b> Respuesta diferencial ante variaciones en la temperatura superficial del mar en colonias del género <i>Pocillopora</i> del Pacífico Central Mexicano	
2.1 Introducción	24
2.2 Objetivo	25
2.3 Materiales y Métodos	26
2.3.1 Trabajo de campo	26
2.3.2 Diseño experimental	27
2.3.3 Trabajo de laboratorio	29
2.3.3.1 Cuantificación de lípidos totales	29
2.3.3.2 Densidad de simbioses	29
2.3.4 Análisis estadístico	29
2.4 Resultados	30
2.4.1 Estrés térmico experimental	30
2.4.2 Variación anual en el área de estudio	33
2.5 Discusión	40

CONTINUACIÓN...	Pág.
<b>CAPÍTULO 3. Evaluación del estrés térmico en colonias de <i>P. verrucosa</i> utilizando dos biomarcadores moleculares: <i>CuZnSOD</i> y <i>hsp70</i></b>	
3.1 Introducción	46
3.2 Objetivo	49
3.3 Cuantificación de la actividad de la <i>CuZnSOD</i>	49
3.3.1 Materiales y métodos	49
3.3.2 Análisis estadístico	50
3.3.3 Resultados y discusión	51
3.4 Evaluación de los niveles de expresión de la <i>hsp70</i>	55
3.4.1 Materiales y métodos	55
3.4.1.1 Extracción de RNA total y evaluación de los niveles de <i>hsp70</i>	55
3.4.1.2 Obtención del gen somatolactina ( <i>sl</i> )	58
3.4.2 Resultados y discusión	59
3.4.2.1 Almacenamiento de las muestras y extracción del RNA total	59
3.4.2.2 Evaluación del gen <i>sl</i>	62
3.4.2.3 Evaluación del gen <i>hsp70</i>	68
<b>CAPÍTULO 4. La utilización de biomarcadores para la determinación de ‘áreas sensibles’ al blanqueamiento en comunidades coralinas del Parque Nacional Islas Marietas</b>	
4.1 Introducción	73
4.2 Temperatura como factor determinante de las actividades fisiológicas	74
4.3 Incorporación de biomarcadores para diagnóstico de estrés	76
4.4 Primeras aproximaciones utilizando <i>P. verrucosa</i> para la detección de áreas ‘más sensibles’ al blanqueamiento en el Pacífico Mexicano	76
4.5 Aplicación de los resultados como herramienta de manejo dentro del PNIM	79
<b>CONCLUSIONES</b>	83
<b>RECOMENDACIONES</b>	85
<b>LITERATURA CITADA</b>	87

CONTINUACIÓN...	Pág.
<b>ANEXO I. PROTOCOLOS DE LABORATORIO</b>	
1. Preparación de RNA <i>later</i>	97
2. Extracción de lípidos totales de tejido de coral	98
3. Extracción de RNA	100
4. Obtención del gen exógeno ( <i>sl</i> -somatolactina)	101
5. Extracción de la superóxido dismutasa (SOD)	102
<b>ANEXO II. CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL DE <i>P. verrucosa</i></b>	103

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1.</b> Localización geográfica del Parque Nacional Islas Marietas en Bahía de Banderas, Nayarit, México	11
<b>FIGURA 2.</b> Temperatura promedio ( $\pm$ error estándar) diaria registrada para los tres acuarios del experimento de cambio abrupto de temperatura en <i>Pocillopora verrucosa</i> en condiciones de laboratorio.	15
<b>FIGURA 3.</b> Contenido de lípidos totales en fragmentos de <i>Pocillopora verrucosa</i> expuestos al efecto de choque térmico en condiciones de laboratorio.	16
<b>FIGURA 4.</b> Variación en la densidad de simbiontes para el experimento de choque térmico en el coral <i>P. verrucosa</i> a partir de análisis de imágenes.	17
<b>FIGURA 5.</b> Micrografías del tejido de <i>Pocillopora verrucosa</i> expuesto a condiciones de “choque térmico” durante 72 horas.	18
<b>FIGURA 6.</b> Esquema de la distribución espacial de las colonias de <i>P. verrucosa</i> muestreadas en la Isla Redonda utilizadas para la aproximación <i>in situ</i> .	27
<b>FIGURA 7.</b> Registros de A) Temperatura, B) Salinidad y, C) Oxígeno disuelto durante el experimento de estrés térmico.	32
<b>FIGURA 8.</b> Concentración de lípidos (a) y densidad de simbiontes (b) en fragmentos de <i>Pocillopora verrucosa</i> durante el experimento de estrés térmico.	33
<b>FIGURA 9.</b> Cuantificación de lípidos totales (A) y densidad de simbiontes (B), obtenidos de los fragmentos de <i>Pocillopora verrucosa</i> localizados en el área Sur de la Isla Redonda.	37
<b>FIGURA 10.</b> Cuantificación de lípidos totales (A) y densidad de simbiontes (B), obtenidos de los fragmentos de <i>Pocillopora verrucosa</i> localizados en el área Norte de la Isla Redonda.	38
<b>FIGURA 11.</b> Temperatura registrada de julio del 2008 a julio del 2009 a 8 m de profundidad en la zona de estudio localizada en el frente norte de la Isla Redonda.	39

CONTINUACIÓN...	Pág.
<b>FIGURA 12.</b> Cuantificación de <i>CuZn</i> -superóxido dismutasa ( <i>CuZnSOD</i> ) en fragmentos del coral <i>Pocillopora verrucosa</i> en condiciones experimentales de estrés térmico.	51
<b>FIGURA 13</b> Ejemplo de la extracción de RNA total de fragmentos de <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico.	56
<b>FIGURA 14.</b> Amplificación de los genes <i>sl</i> y <i>hsp70</i> a partir del RNA total obtenido de fragmentos de la especie <i>P. verrucosa</i> .	57
<b>FIGURA 15.</b> Curva de fusión resultante de la amplificación por PCR tiempo real para el gen <i>sl</i> a partir de muestras de fragmentos del coral <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico experimental.	63
<b>FIGURA 16.</b> Amplificación del gen exógeno <i>sl</i> a partir del producto de PCR tiempo real.	64
<b>FIGURA 17.</b> Curvas de amplificación para el gen <i>sl</i> a partir de la extracción de RNA total de fragmentos del coral <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico experimental.	66
<b>FIGURA 18.</b> Curva de fusión resultante de la amplificación por PCR tiempo real para el gen <i>hsp70</i> a partir de muestras de fragmentos del coral <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico experimental.	68
<b>FIGURA 19.</b> Amplificación del gen <i>hsp70</i> a partir del producto de PCR tiempo real.	69
<b>FIGURA 20.</b> Curvas de amplificación para el gen <i>hsp70</i> a partir de la extracción de RNA total de fragmentos del coral <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico experimental.	70

### III. ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1</b> Resultados del ANOVA de dos vías de los datos de contenido de lípidos totales y densidad de simbiontes de los fragmentos de <i>P. verrucosa</i> sujetos a estrés térmico experimental.	31
<b>TABLA 2.</b> Resultados del ANOVA de tres vías de los datos de contenido de lípidos totales y densidad de simbiontes obtenidos de los fragmentos <i>in situ</i> de <i>P. verrucosa</i> .	35
<b>TABLA 3</b> Secuencia de los cebadores utilizados para el PCR punto final y PCR tiempo real.	58
<b>TABLA 4.</b> Cuantificación del RNA total a partir de fragmentos de <i>P. verrucosa</i> sometidos a estrés térmico experimental durante 198 horas	103

## RESPUESTA AL ESTRÉS AMBIENTAL EN LAS COLONIAS DEL CORAL *Pocillopora* EN LA REGIÓN CENTRAL DEL PACÍFICO MEXICANO

### IV. RESUMEN

La presente investigación, resume el esfuerzo realizado durante los últimos cuatro años, para tratar de entender la respuesta de las comunidades coralinas del Parque Nacional Islas Marietas, Nayarit, ante eventos de estrés térmico asociados a fenómenos ENSO (por sus siglas en inglés “El Niño Southern Oscillation) y variaciones locales en las condiciones oceanográficas que condicionan su respuesta al estrés. La estrategia general, incluyó observaciones en campo y experimentos en laboratorio, en donde se integraron marcadores fisiológicos (contenido de lípidos totales y densidad de *Symbiodinium*) y moleculares (actividad de la *CuZnSOD* y expresión de la *hsp70*) como elementos de evaluación que nos permitieran entender la respuesta de los organismos, más allá de la evidencia visual al momento del blanqueamiento.

En el capítulo 1, se evaluó la respuesta que producen cambios abruptos en la temperatura en la actividad metabólica del coral de la especie *Pocillopora verrucosa*, encontrando que se provoca un aumento de lípidos, acompañado de la expulsión de los simbiositos. En el capítulo 2 se documentó la respuesta de *P. verrucosa* en condiciones de estrés al incrementar gradualmente la temperatura, donde contrastantemente con la respuesta previamente documentada, se observó una disminución continua en la cantidad de lípidos y, en la densidad de simbiositos.

De manera complementaria, se documentó el comportamiento *in situ* de los organismos ante las fluctuaciones anuales en la temperatura superficial del mar (Capítulo 2), lo cual nos permitió conocer diferencias fisiológicas entre corales que se encuentran dentro de la misma área.

En el capítulo 3, se realizó una aproximación a nivel celular en la cual se documentó la respuesta del coral mediante la cuantificación del antioxidante *CuZn*-superóxido dismutasa y la expresión del RNA mensajero de la proteína de estrés térmico *hsp70*. Se observó un aumento en la actividad de la SOD en el hospedero como respuesta al estrés térmico. En el caso de la *hsp70*, aunque no se logró evaluar la respuesta de estrés, se desarrolló un protocolo detallado y las primeras aproximaciones utilizando PCR en tiempo real, lo cual, será una herramienta básica para futuros estudios moleculares en corales.

Los resultados obtenidos, representan la respuesta fisiológica generada por la exposición de los organismos a estrés térmico experimental con diferencias en el tiempo y tipo de exposición al estresor.

Finalmente, en el capítulo 4, se explora la utilidad de estas observaciones para ser integrados como herramientas de manejo en las comunidades coralinas. Se propone

que los marcadores fisiológico-moleculares utilizados durante el presente estudio sean integrados como parte de las herramientas actuales de manejo y conservación, basadas en el monitoreo de cobertura y biomasa de especies.

El presente trabajo, muestra los primeros resultados sobre la evaluación del efecto del estrés térmico (utilizando marcadores fisiológicos y moleculares) sobre la especie *P. verrucosa*, la cual, es una de las especies más abundantes en las comunidades coralinas del Pacífico Mexicano. Los datos presentados, demuestran que las repuestas metabólicas y celulares provocadas por un mismo factor de estrés, son diferentes dependiendo de la intensidad y del tiempo en el que el organismo esta expuesto. Los marcadores utilizados nos permitieron llevar un seguimiento de la capacidad de resistencia de los corales previo y durante el blanqueamiento. Asimismo, los resultados demostraron un efecto de aclimatación local, donde organismos distribuidos en la misma área pueden presentar una respuesta diferencial ante los cambios de temperatura, dependiendo de su zona de distribución.

Con los resultados de este estudio, los indicadores fisiológico-moleculares, muestran ser una herramienta de gran utilidad para complementar el seguimiento que actualmente se realiza en diversas comunidades de corales en el Pacífico Mexicano, permitiendo documentar la respuesta de los corales antes, durante y después de eventos de blanqueamiento. Además, permite detectar regiones de mayor sensibilidad a estos eventos y contar con información para implementar medidas de protección y manejo diferenciales, que se adapten en forma dinámica a las variaciones de meso y microescala que se presenten en las distintas comunidades coralinas de la región.

## INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Islas Marietas (PNIM) posee una de las comunidades arrecifales más importantes del Pacífico Mexicano compuesta principalmente de especies del género *Pocillopora*, a las cuales se le asocian una gran diversidad de peces e invertebrados marinos, así como comunidades de aves que dependen del arrecife para su subsistencia (CONANP, 2008). Actualmente, por el incremento gradual de la temperatura media de los océanos, debido al cambio climático, así como la ocurrencia de fenómenos ENSO (por sus siglas en inglés “El Niño Southern Oscillation”), las comunidades coralinas son continuamente expuestas a condiciones de estrés térmico. A esto, se le suma la influencia de otras condiciones ambientales de tipo local (ej. surgencias, ondas internas y turbidez) y actividades humanas, que condicionan aún más su respuesta al estrés. Dichos factores estresantes, pueden provocar eventos de blanqueamiento, como respuesta fisiológica externa presente en corales, donde se produce el rompimiento de la relación simbiótica entre el coral y el dinoflagelado endosimbionte (= *Symbiodinium*), provocando la liberación o inactivación (fotoinhibición) del simbionte y consecuentemente, la pérdida de color del coral y en situaciones extremas la muerte del tejido (Done, 1999; Fitt *et al.*, 2000; Douglas, 2003; Leichter *et al.*, 2006; Weis, 2008). Hasta el momento, la respuesta de estrés observada en el área se ha registrado hasta que el blanqueamiento es evidente (Carriquiry *et al.*, 1991; Reyes-Bonilla *et al.*, 2002), sin embargo, no se han utilizado otros marcadores que permitan evaluar una respuesta previa a estos eventos.

Antes de que ocurra el blanqueamiento, el coral sufre de alteraciones en sus actividades fisiológicas las cuales pueden detectarse mediante la evaluación de la

síntesis de moléculas que responden a condiciones de estrés, como son las proteínas de choque térmico, por ejemplo la HSP70, o antioxidantes como la *cobre-zinc* superóxido dismutasa, *CuZnSOD* (Parsel y Lindquist, 1993; Feder y Hofmann,; Black *et al.*, 1995; Sharp *et al.*, 1997; Downs, *et al.*, 2000; Choresh *et al.*, 2001; Downs, *et al.*, 2002; Downs, *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006; Vidal-Dupont *et al.*, 2010). Asimismo, cambios en la densidad de *Symbiodinium*, el contenido de lípidos totales y el daño estructural en el tejido del pólipo son indicadores de respuestas fisiológicas del organismo asociadas a condiciones de estrés (Glynn *et al.*, 1985; Szmant y Gassman, 1990; Grottoli *et al.*, 2004; Anthony y Connolly, 2007; Moya *et al.*, 2008).

Con el propósito de proporcionar marcadores fisiológicos y moleculares que permitan evaluar el estado de estrés de las comunidades coralinas de las Islas Marietas, en el presente estudio se hicieron evaluaciones *in situ* y experimentales para conocer la respuesta fisiológica y celular que producen cambios en la temperatura sobre las comunidades coralinas de la región central del Pacífico Mexicano. Para este estudio se utilizaron colonias de la especie *Pocillopora verrucosa* distribuidas en la Isla Redonda dentro del PNIM, y como biomarcadores fisiológicos la densidad de *Symbiodinium* y el contenido de lípidos totales, y como marcadores moleculares los niveles de expresión de la *hsp70* y la actividad de *CuZnSOD* del hospedero.

Para la parte experimental, las colonias de la especie *P. verrucosa* fueron sometidos a condiciones de estrés térmico, simulando diferentes eventos que pueden afectar las colonias de la región. En un primer trabajo experimental, se evaluó durante 72 horas el efecto que produce un evento de choque térmico (simulando condiciones de ondas internas regionales), y posteriormente en un segundo experimento las colonias

fueron sometidas durante 198 horas a un estrés térmico donde el incremento de la temperatura fue gradual, simulando las condiciones al as que se encuentran los organismos durante el inicio de un evento ENSO.

Asimismo, como una aproximación *in situ* el seguimiento del efecto diferencial que tienen las fluctuaciones anuales en la temperatura de la región sobre las colonias de *P. verrucosa* de la Isla Redonda utilizando los marcadores fisiológicos previamente mencionados.

En conjunto, con la información generada se buscó comprender cómo los corales responden naturalmente en el medio ante los cambios anuales en la temperatura superficial del mar (TSM), y sus diferencias cuando éstos mismos organismos están sometidos a diferentes condiciones de estrés. Además, poder utilizar estos marcadores para evaluar las comunidades antes y durante eventos de blanqueamiento.

Los resultados encontrados en este estudio, demuestran que existen respuestas diferenciales en el organismo ante el incremento en la temperatura, y esta respuesta depende de la intensidad y del tiempo al que se encuentren expuestos los organismos al elemento de estrés. Los cambios abruptos en la temperatura que ocurren en la región asociados a ondas internas principalmente durante el verano (Filonov *et al.*, 1996), provocaron en cuestión de horas, una respuesta de incremento en la actividad metabólica que se reflejó en un aumento en la cantidad de lípidos totales, lo que se interpreta como respuesta de mitigación de daños celulares.

De manera contrastante, ante condiciones de estrés térmico debido a eventos de El Niño (ENSO), donde el incremento en la temperatura es gradual y puede afectar una región durante varios días o meses, produce un decremento en la cantidad de lípidos, en

la densidad de simbioses y el aumento en la actividad de *CuZnSOD* (esto último sólo en el hospedero), hasta llegar al blanqueamiento.

Por otra parte, en la evaluación de los corales *in situ* se observaron respuestas diferentes, que dependen no solamente de los cambios anuales en la temperatura, sino de la distribución de la colonia dentro del área de estudio.

Finalmente, ya que las áreas de distribución coralina tienden a ser muy impactadas debido al uso turístico, lo que requiere de un cuidado especial en el uso de este recurso natural, se propone el uso de marcadores fisiológico-moleculares, como un elemento más de las herramientas de manejo en el área, que permita entender con mayor profundidad la respuesta de los corales ante los eventos de estrés a los que son continuamente sujetos, y con esto contribuir con el monitoreo de la salud de los corales antes, durante y después de eventos de blanqueamiento; ya que, esta información adicional, resulta de utilidad para determinar la existencia de áreas más sensibles que requieran medidas especiales de protección, con el fin de favorecer su conservación y manejo.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar los cambios espacio-temporales a nivel fisiológico y celular asociados a la respuesta por estrés térmico en colonias de la especie *Pocillopora verrucosa* en la región de Bahía Banderas, México en condiciones naturales y de laboratorio.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Documentar en condiciones de laboratorio el efecto que tienen los incrementos abruptos en la temperatura, en el contenido de lípidos totales, la densidad de simbiontes y la integridad del tejido en el coral *P. verrucosa* asociada a las comunidades coralinas de las Islas Marietas, México.
- Evaluar la respuesta fisiológica que presenta el coral *P. verrucosa*, ante las fluctuaciones anuales en la temperatura utilizando el contenido de lípidos totales y la densidad de *Symbiodinium* como biomarcadores.
- Evaluar en condiciones experimentales la respuesta metabólica (contenido de lípidos y densidad de *Symbiodinium*) del coral *P. verrucosa* asociada con el incremento en la temperatura, previo a la evidencia de blanqueamiento.
- Evaluar los cambios en niveles de expresión de la *hsp70* y de la proteína *CuZnSOD*, asociada a la respuesta al incremento en la temperatura, en colonias de *P. verrucosa* bajo condiciones de estrés térmico experimental en laboratorio.

## JUSTIFICACIÓN

Los corales responden de manera natural a los cambios anuales en la TSM, pero debido al Calentamiento Global la TSM va progresivamente incrementándose, lo que provoca condiciones estresantes para los corales. Esta respuesta, a nivel fisiológico se puede observar con las fluctuaciones en los niveles de lípidos y en la densidad de *Symbiodinium*, y a nivel celular, con fluctuaciones en la expresión de proteínas como la *hsp70* y antioxidantes como la *CuZnSOD* que les permite sobrellevar este estrés. Sin embargo, cuando el organismo rebasa su límite máximo de tolerancia a altas temperaturas ocurre el blanqueamiento. Por lo tanto, someter a las colonias de *Pocillopora verrucosa* a condiciones de estrés y choque térmico controlado nos permitirá conocer la respuestas metabólica que presenta la especie a niveles de hipertermia antes de que se produzca el blanqueamiento.

Además, se tienen registros de que *P. verrucosa* se distribuye a diferentes profundidades dentro de una misma área, y cuando se dan los mayores calentamientos, las colonias encontradas en la zona somera son las más afectadas por blanqueamiento. Debido a esto, una evaluación a micro escala, evaluando de manera separada las colonias de las diferentes profundidades, así como diferenciando las que se encuentran en la zona norte y sur de la isla, permitirá conocer la existencia de una respuesta diferencial en los marcadores fisiológicos (contenido de lípidos y densidad de *Symbiodinium*) dependiendo de la distribución que tengan las colonias de coral dentro de una misma área.

Con toda esta información, se busca conocer los límites de tolerancia de la especie ante los futuros incrementos en la temperatura que conduzcan a condiciones de estrés térmico que se puedan generar en próximos años en la región del Pacífico Mexicano.

## HIPÓTESIS

- ✓ Las colonias del coral *P. verrucosa* localizadas en el PNIM, al estar sujetas a incrementos en la temperatura del agua responderán a nivel fisiológico, con un decremento en la cantidad de lípidos totales y en la densidad de simbioses; y a nivel celular con un incremento en los niveles de *hsp70* y actividad de la *CuZnSOD*.
- ✓ Habrá una respuesta diferente de las colonias de coral, dependiendo de la intensidad del estrés (en este caso, el aumento en la temperatura) y del tiempo de exposición; por lo tanto, se espera una respuesta diferente ante eventos oceanográficos locales como son las ondas internas y eventos asociados con anomalías térmicas como son los eventos ENSO.
- ✓ Los cambios anuales en la temperatura, generarán una respuesta diferencial dependiendo de la distribución de la especie dentro del área de estudio, derivado de un proceso de aclimatación regional de la especie ante las condiciones oceanográficas locales.

## CAPÍTULO 1. RESPUESTA AL INCREMENTO ABRUPTO DE TEMPERATURA (“CHOQUE TÉRMICO”) EN EL CORAL *Pocillopora verrucosa* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Con el incremento gradual de la temperatura media de los océanos, producto del cambio climático, así como la ocurrencia de fenómenos ENSO (El Niño Southern Oscillation, por sus siglas en inglés), las comunidades coralinas constantemente están expuestas a condiciones térmicas no experimentadas en su historia reciente. En la región central del Pacífico Mexicano, se han registrado blanqueamientos masivos que han afectado a las especies coralinas de la región, principalmente a las pertenecientes al género *Pocillopora* (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002). Además del efecto de estos eventos periódicos, las comunidades coralinas son afectadas por variaciones térmicas diarias de temperatura de hasta 3°C, que provocan que los organismos de manera recurrente tengan que responder rápidamente y en forma continua a cambios térmicos (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Lo anterior, puede tener consecuencias directas en su termotolerancia y, en forma crónica y poco evidente, afectar su resistencia al blanqueamiento.

La importancia de esta relación simbiótica es que en condiciones normales, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, el simbiote provee más del 90% de sus requerimientos energéticos diarios al hospedero, que se utilizan principalmente para la respiración (Davies, 1984; Furla *et al.*, 2005; Yellowless *et al.*, 2008). El excedente de energía es transferida al hospedero en forma de carbono inorgánico, la cual es transformada y acumulada en forma de lípidos (Patton *et al.*, 1977; Davies, 1984). De esta manera, el organismo almacena productos energéticos para

soportar periodos donde las condiciones del medio ambiente no son las óptimas (Fitt *et al.*, 2000; Baird *et al.*, 2008).

Durante el blanqueamiento, el hospedero deja de recibir los nutrientes del *Symbiodinium*, por lo que requiere hacer uso de sus reservas energéticas acumuladas en forma de lípidos (Szmant y Gassman, 1990; Fitt *et al.*, 2000; Grottoli *et al.*, 2004; Rodrigues y Grottoli, 2007). Algunas especies, han desarrollado estrategias alternas, como el coral *Montipora capitata*, que durante periodos de blanqueamiento mantiene su cantidad de reservas energéticas alimentándose por medios heterótrofos (Rodrigues *et al.*, 2008) y mantienen sus actividades metabólicas normales a pesar de tener una baja densidad de simbioses asociados.

De la capacidad que tengan los corales de resistir y recuperarse de eventos de estrés o blanqueamiento, dependerá su subsistencia en el ecosistema. Conocer el efecto de los cambios abruptos en la temperatura diaria sobre los corales, proveerá información acerca de la capacidad de tolerancia térmica de las distintas especies ante los cambios abruptos en las condiciones térmicas de la TSM, como las asociadas con las ondas internas en la región central del Pacífico Mexicano. Asimismo, los resultados obtenidos nos permitirán evaluar las posibles consecuencias para la especie en escenarios futuros de cambio climático en la región.

## 1.2 OBJETIVO

Documentar en condiciones de laboratorio, el efecto que producen los incrementos abruptos de temperatura (choque térmico) en la especie *Pocillopora verrucosa*, presente en las comunidades coralinas asociadas a las Islas Marietas en la

región central del Pacífico Mexicano. Para esto, se evaluará la respuesta fisiológica de los organismos, por medio de la cuantificación de lípidos totales, densidad de simbiontes así como una aproximación del grado de estrés en base al daño en el tejido. Lo anterior con el fin de conocer las estrategias que utiliza la especie ante el efecto de las ondas internas a las que se encuentra sujeta.

### 1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.3.1 Área de estudio y trabajo experimental

El muestreo se llevó a cabo en la Isla Redonda, la cual forma parte del Parque Nacional Islas Marietas (PNIM), localizadas en la Bahía de Banderas ( 20° 40' 35" y 20° 41' 45" N, 105° 33' 30" y 105° 38' 10" O), Nayarit, en la región del Pacífico Central Mexicano (Fig. 1). La temperatura superficial en la región oscila entre los 22-29.5°C, y existen registros que durante periodos ENSO puede alcanzar hasta 31°C (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Durante el verano principalmente, se presentan oscilaciones de temperatura diarias que son determinadas por la fuerte influencia de ondas internas en la zona (Filonov *et al.*, 1996). Al momento del muestreo la temperatura superficial *in situ* registrada (a una profundidad aproximada de 2 m) fue de 24.3 °C.

Se colectó una porción de una colonia del coral *P. verrucosa* a una profundidad aproximada de 7 m. La colonia muestreada fue fragmentada en 21 piezas de 5 cm de largo, las cuales fueron colocadas en acuarios con agua de mar.

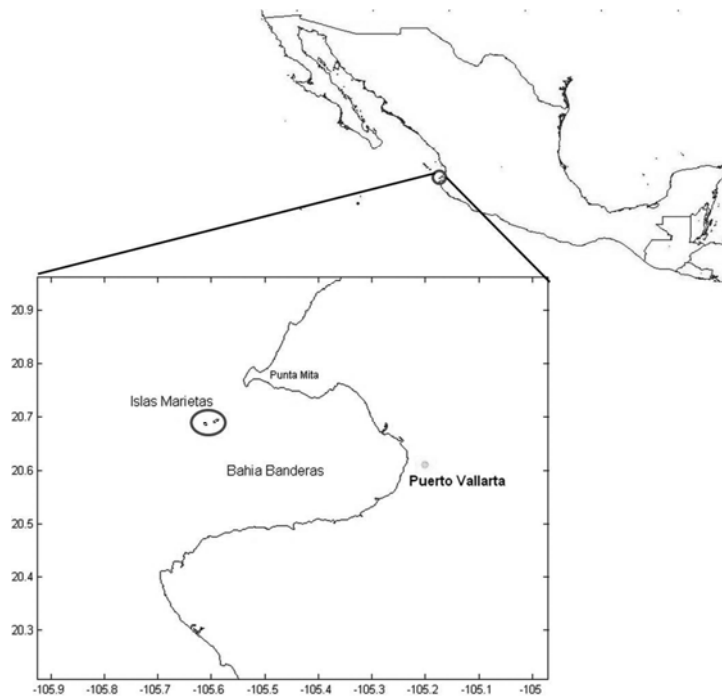


Fig. 1. Localización geográfica del Parque Nacional Islas Marietas en Bahía de Banderas, Nayarit, México

Cabe mencionar, que el agua en los acuarios fue previamente estabilizada a una temperatura de 27° C durante 8 días antes de introducir los fragmentos. Un acuario permaneció a esta temperatura durante todo el periodo experimental y fue considerado como el control del experimento (T1). Cuatro días antes de la experimentación se incrementó gradualmente la temperatura en los dos acuarios restantes estabilizándolos a 28.5 °C (temperatura considerada como no estresante) y 30.5 °C (temperatura considerada como estresante) antes de introducir los fragmentos de coral y comenzar el tiempo de experimentación. Los acuarios estuvieron expuestos a la luz natural (aproximadamente 10 horas de luz diariamente), con filtros de cascada circulando el agua del acuario las 24 horas del día y un termógrafo programado para registrar la temperatura cada 15 minutos.

Después del octavo día de aclimatación 14 fragmentos de coral, fueron transferidos a los dos acuarios con la temperatura del agua estable: 7 fragmentos al acuario de 28.5 °C y 7 fragmentos al acuario con temperatura de 30.5 °C para llevar a cabo la experimentación de choque térmico. Se hicieron siete evaluaciones: a las 0, 6, 12, 24, 30, 48 y 72 horas retirando un fragmento de cada tratamiento experimental y preservándolo en formaldehído al 10% con agua de mar. Previo a retirar el fragmento, en cada tiempo de evaluación, se realizaron las observaciones del estado físico de los fragmentos (coloración), para detectar el momento en que se iniciaba el proceso de blanqueamiento. Asimismo, durante el periodo experimental se elaboraron registros diariamente del estado físico de los fragmentos y cada hora se tomaron datos de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH.

### **1.3.2 Trabajo de laboratorio**

Para la extracción de lípidos totales, inicialmente se descalcificó cada fragmento con una solución de ácido acético al 10%, y el tejido obtenido fue enjuagado con agua destilada. El tejido se dividió en tres porciones y se colocó individualmente en un tubo plástico de 2.0 ml previamente pesado, para posteriormente secar el tejido en la estufa a 60°C durante 18 horas. Al sacarlo de la estufa, el tubo fue pesado para conocer la cantidad de tejido seco de cada muestra. La extracción de lípidos totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Folch *et al.* (1957). En resumen, se añadió 1 ml de una solución cloroformo:metanol (2:1) al tejido seco, se maceró y se mantuvo durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron 335 µl de KCl 0.8% y se agitó con ayuda de un vortex. Se dejó reposar por un par de minutos hasta que las fases se separaran completamente y se eliminó la fase superior (acuosa). El extracto se lavó

dos veces con 500  $\mu$ l de una solución metanol:agua (1:1) agitando con vortex y eliminando la fase superior. La solución resultante fue filtrada y transferida a un tubo plástico de 2.0 ml previamente pesado y etiquetado. Para evaporar la parte líquida y obtener los lípidos, la muestra se concentró por 45 min en una centrífuga CentriVap® a una temperatura constante de 50°C. Posteriormente, las muestras se secaron en la estufa a 60°C durante 12 horas, para posteriormente hacer el pesado final (Anexo I-2). De cada muestra se realizaron tres extracciones; los resultados corresponden a la media resultante y se expresan como gramos de lípidos totales por gramo de peso seco ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm$  error estándar).

Las observaciones del tejido se hicieron por medio de cortes histológicos. Para este fin, se utilizó la metodología descrita en Rodríguez-Troncoso (2006). El tejido se sumergió en solución Zenker durante 14 horas, con el fin de que fuera menos frágil y no sufriera daños durante la descalcificación. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente, se descalcificaron con una solución de HCl 10% y una solución amortiguadora (0.7 g EDTA, 0.14 g Tartrato de Sodio, 0.0008 Potasio de Sodio tetrahidratado). El tejido fue deshidratado utilizando una secuencia de diluciones de alcoholes (70, 80, 90 y 100%) y se aclararon con Hemo-De®, para ser posteriormente incluidos en Paraplast y cortados a un grosor de 6  $\mu$ m con ayuda de un microtomo de rotación marca American Optical® Modelo 820. Posteriormente, los cortes fueron desparafinados y teñidos con la técnica de Mallory Heidenhain. De cada muestra, se obtuvieron tres laminillas con 6 cortes cada una y cada laminilla representó una región diferente del tejido. Las

observaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio compuesto Axioscop motorizado (C. Zeiss®). Se tomaron de 10-15 registros fotográficos de cada laminilla.

La densidad de simbiontes fue obtenida a partir de los registros fotográficos de los cortes histológicos, utilizando el análisis de las imágenes del programa Axiovision Rel. 4.7 (C Zeiss®). Los cálculos finales de área y el conteo de células dentro de los cortes, se realizó con las herramientas del mismo programa. Los datos se presentan como número de células por unidad de área ( $\text{cél}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{error estándar}$ ).

#### 1.4 RESULTADOS

Una vez que se logra la estabilización térmica de los acuarios a las condiciones experimentales deseadas, no se registraron variaciones importantes en los parámetros básicos (Fig. 2). La salinidad fluctuó entre 33.6 y 35.1 ppm; el pH se mantuvo entre 8.3-8.4 y los valores de oxígeno disuelto fueron de 5.6 a 7.7  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  durante el periodo experimental.

Durante el periodo de aclimatación, no hubo cambios en la coloración o estado físico de los fragmentos de coral. Asimismo, se observó que en el acuario control y en el de 28.5 °C no hubo evidencia de blanqueamiento. Los cambios fueron observados en el tratamiento a 30.5°C, donde a las 24 horas el blanqueamiento comenzaba a ser evidente; a las 30 horas aproximadamente el 50% del fragmento se encontraba parcialmente blanqueado, y a las 72 horas el 90% del fragmento se encontraba blanqueado, pero con tejido adherido en todo el esqueleto.

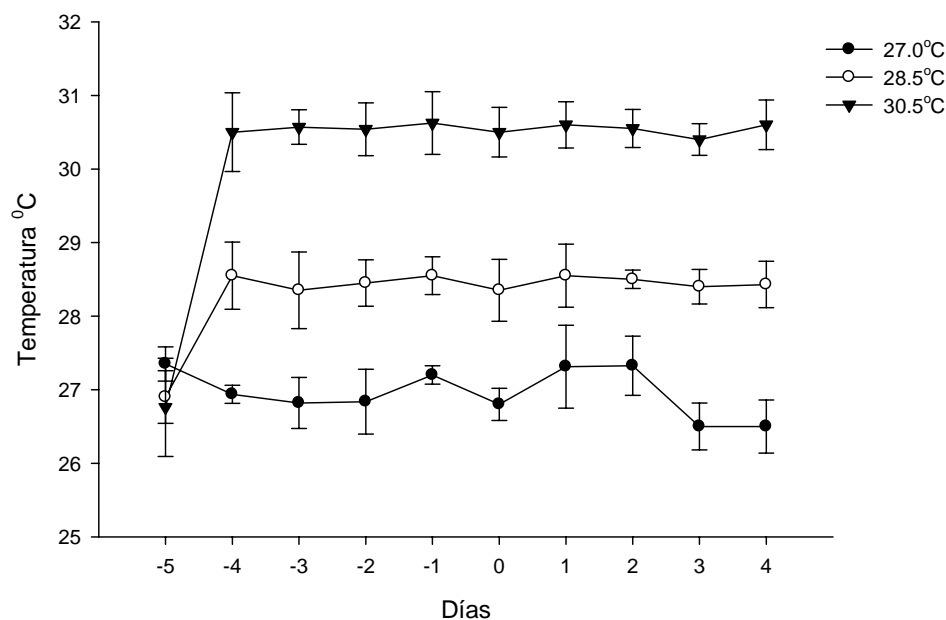


Figura 2. Temperatura promedio ( $\pm$  error estándar) diaria registrada para los tres acuarios del experimento de cambio abrupto de temperatura en *Pocillopora verrucosa* en condiciones de laboratorio. Los valores negativos en los días corresponden a los días previos a la experimentación, durante el periodo de estabilización térmica de los acuarios correspondientes al T2 = 28.5°C y T3 = 30.5°C. El acuario control se mantuvo a 27°C durante la aclimatación y periodo experimental. El periodo de experimentación de choque térmico se inició en el día cero

Se encontró un comportamiento similar en el contenido de lípidos totales entre los fragmentos de coral que se mantuvieron en el acuario control y el acuario a 28.5°C, con pocos cambios entre ellos. En contraste, el acuario con temperatura de 30.5°C se presentó un incremento gradual en la cantidad de lípidos de los corales, con valores iniciales de 0.11 g·gps<sup>-1</sup> ( $\pm$  0.0109) y alcanzando a un máximo de 0.305 g·gps<sup>-1</sup>, ( $\pm$  0.106) a las 30 horas, lo que coincidió con el tiempo un blanqueamiento aproximado del 50% del fragmento. Posterior a este máximo, el contenido de lípidos fue decayendo y

para las 72 horas los lípidos disminuyeron en un 44% ( $0.0501 \pm 0.0066 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ) comparado con el contenido inicial (Fig. 3).

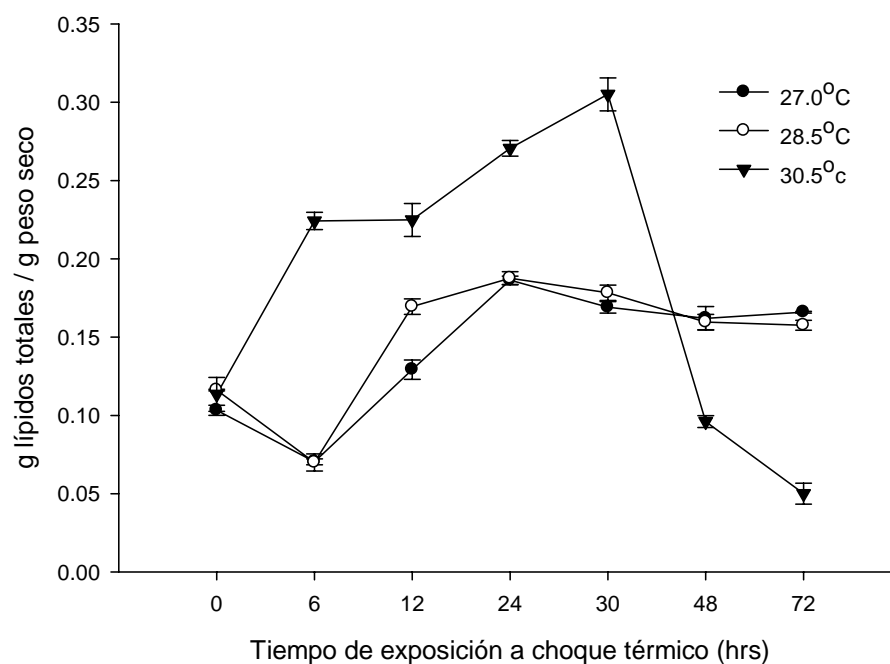


Figura 3. Contenido de lípidos totales en fragmentos de *Pocillopora verrucosa* expuestos al efecto de choque térmico en condiciones de laboratorio. Cada cuantificación está elaborada por triplicado. Los resultados se presentan como g lípidos totales·g peso seco<sup>-1</sup> ( $\pm$  error estándar). La temperatura control de 27°C representa la temperatura a la que se mantuvieron los fragmentos durante todo el periodo de aclimatación y experimental.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la densidad de simbioses durante el periodo de experimentación. La densidad inicial promedio de simbioses se estimó en  $2.0 \times 10^6 \pm 0.20 \text{ cél}\cdot\text{cm}^{-2}$  para el inicio del periodo experimental (tiempo cero). Después de 6 horas, la densidad disminuyó 12.5% en el acuario control y se mantuvo constante ( $1.81 \times 10^6 \pm 0.0065 \text{ cél}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) el resto del periodo de experimentación. Los fragmentos

expuestos a 28.5°C presentaron una respuesta de disminución del 20% de simbioses durante el tiempo de experimentación; de  $1.51 \times 10^6 \pm 0.041$  cél·cm<sup>-2</sup> a las 6 horas a  $1.20 \times 10^6 \pm 0.0054$  cél·cm<sup>-2</sup> al final del experimento. Al igual que con los lípidos totales, en el acuario con la temperatura de 30.5 °C se observó una disminución gradual en la cantidad de células, y en la evaluación final a las 72 horas, se calculó una pérdida del 84% ( $0.32 \times 10^6 \pm 0.0163$  cél·cm<sup>-2</sup>) de células simbioses. Lo anterior coincidió con el tiempo en el que el fragmento se consideraba blanqueado.

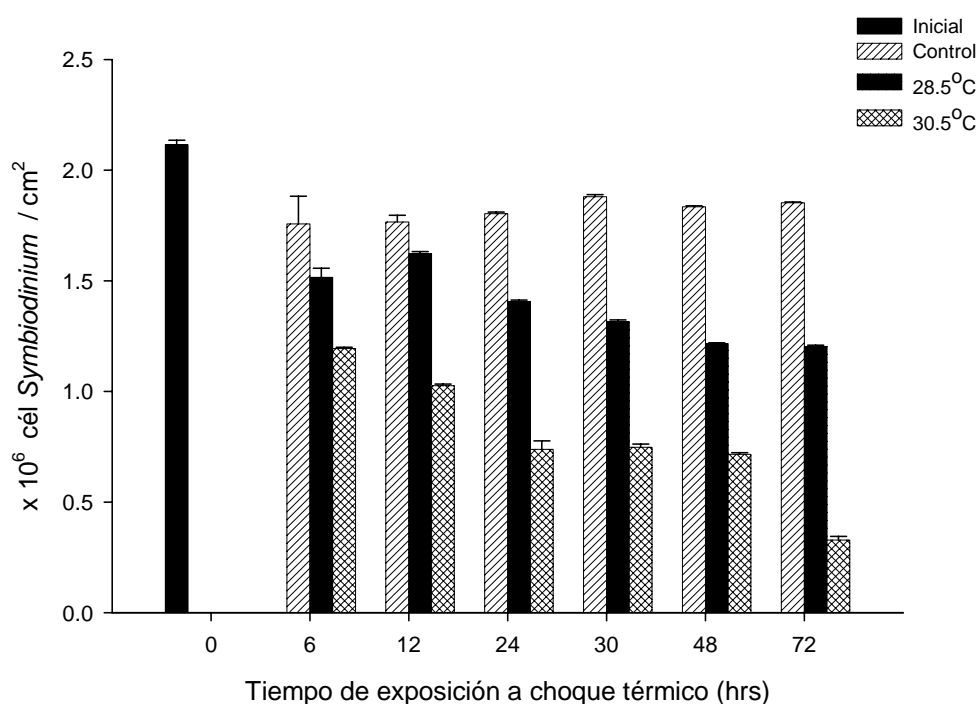


Figura 4. Variación en la densidad de simbioses para el experimento de choque térmico en el coral *P. verrucosa* a partir de análisis de imágenes. Cada cuantificación se estimó por duplicado con ocho conteos por cada muestra. Los resultados se presentan como número de células de *Symbiodinium*  $\times 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $\pm$  error estándar).

Los daños en el tejido debido al incremento en la temperatura fueron evidentes sólo en las muestras que se sometieron al tratamiento de temperatura más elevada (30.5°C). La secuencia del efecto de la temperatura sobre el tejido se observa en las micrografías presentadas en la figura 5.

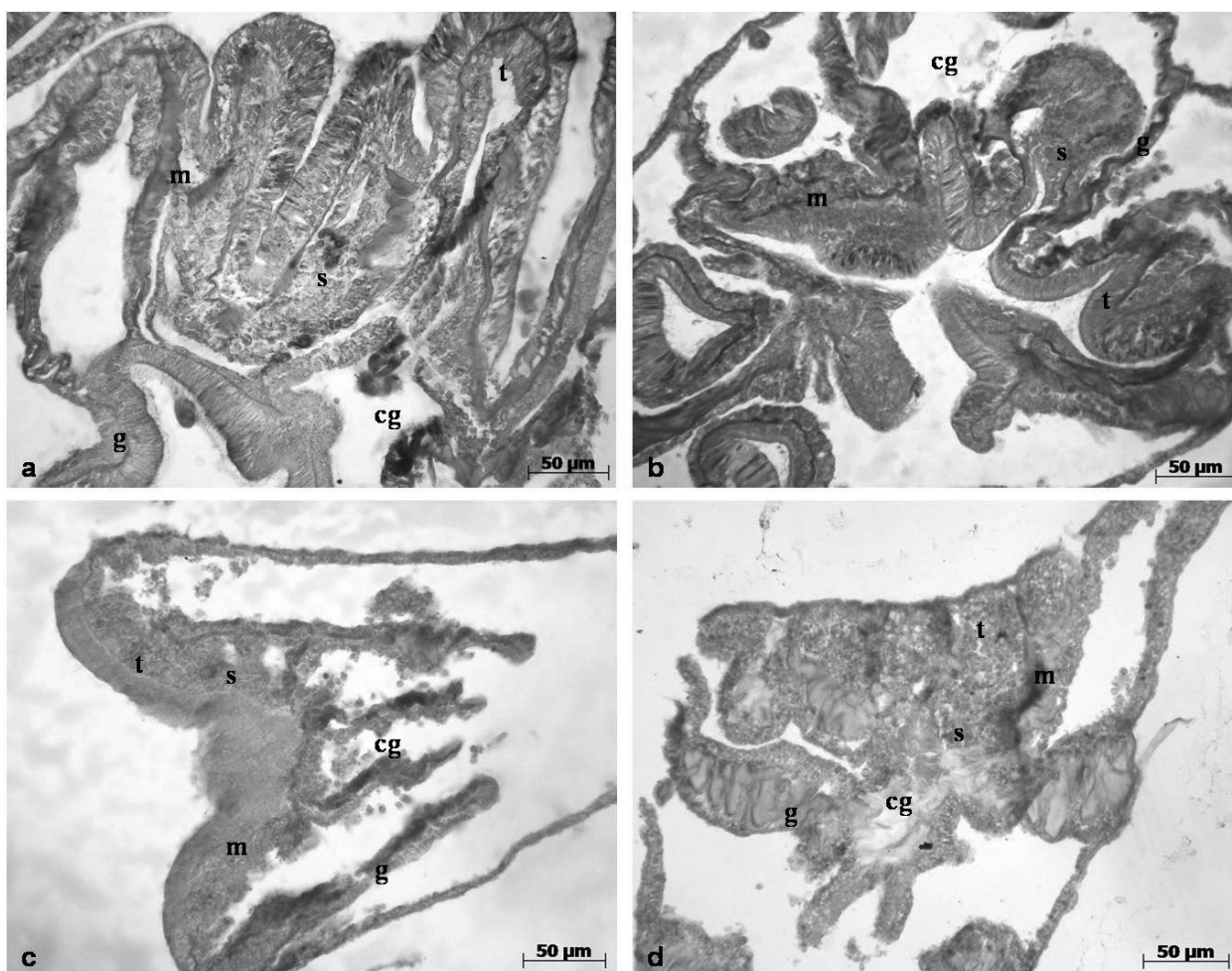


Figura 5. Micrografías del tejido de *Pocillopora verrucosa* expuesto a condiciones de “choque térmico” durante 72 horas. a) 6 h; b) 30 h; c) 48 h; d) 72 h. cg: cavidad gástrica; g: gastrodermis; s: simbiote; t: tentáculo; m: mesenterio. Todas las imágenes fueron tomadas a 20x

Inicialmente, el organismo muestra el tejido entero y con simbioses asociados principalmente a la región de los tentáculos (Fig. 5a); con el transcurso del tiempo experimental, el tejido del pólipo presentó evidencia del daño, el cual se evidenció principalmente por un adelgazamiento del mesenterio y de la gastrodermis. A las 48 horas, estructuras como la cavidad gástrica no habían perdido su forma pero resultó evidente una disminución en la presencia de simbioses (Fig. 5c) y a las 72 horas, debido a la exposición del tejido a la alta temperatura, el mesenterio se observó totalmente “degradado”, debido al daño provocado por la temperatura y por la expulsión de simbioses; además las estructuras del pólipo estaban tan dañadas que los tentáculos se observaron ‘fusionados’ y, debido a que el pólipo perdió su forma estructural característica, no se observa con claridad la cavidad gástrica (Fig. 5d).

## 1.5 DISCUSIÓN

Los resultados generados en este estudio, son una primera aproximación experimental de la respuesta fisiológica inmediata (utilizando la densidad de simbioses y la cantidad del lípidos totales), ante el efecto del choque térmico en las colonias de la especie *P. verrucosa*, perteneciente a la comunidad coralina del PNIM en el Pacífico Central Mexicano. La razón para generar esta aproximación experimental, es que una de las características del área de estudio es la presencia de ondas internas de gran amplitud que provocan cambios repentinos en la temperatura (Filonov *et al.*, 1996), que de acuerdo a registros obtenidos *in situ*, pueden generar cambios de temperatura de hasta 3°C (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Estos cambios abruptos, le podrían

provocar una respuesta de choque térmico al organismo y su respuesta ante este estrés, debe de ser inmediata.

El género *Pocillopora* es uno de los más estudiados debido a la amplia distribución que presenta a nivel mundial. Sin embargo, la respuesta fisiológica de ésta especie varía dependiendo de las condiciones ambientales a las que se encuentre sujeto. Nuestros resultados muestran que el contenido de lípidos totales varió de 11% (en relación al peso seco de la muestra) hasta un 35%, en un periodo de 30 horas ante condiciones de estrés térmico experimental. Ambos valores han sido previamente reportados para este género (Patton *et al.*, 1977; Harland *et al.*, 1993), sin embargo, cabe resaltar que son datos puntuales de un sólo muestreo, y no representan, como en el caso del presente estudio, una respuesta ante un factor de estrés.

Las primeras variaciones estacionales en el contenido de lípidos debido a las fluctuaciones anuales en la temperatura fueron estimadas por Stimson (1977) encontrado variaciones del orden de 31 a 41%. Sin embargo, las variaciones del contenido de lípidos totales encontradas en el presente estudio son los primeros registros de una respuesta inmediata, en una escala temporal de horas y no de meses, y representan el comportamiento fisiológico del coral, disparado por un evento oceanográfico local (ondas internas) al cual están continuamente sujetas las colonias coralinas de la región central del Pacífico Mexicano.

El experimento de choque térmico en fragmentos de *P. verrucosa* mantenidos en condiciones de laboratorio, presentaron como primera respuesta un incremento en la cantidad de lípidos, y al mismo tiempo una pérdida en la densidad de simbiontes. Se conoce que el simbionte genera tanto los lípidos necesarios para llevar a cabo

actividades diarias de todo el organismo, como un excedente que son almacenados y utilizados como reserva energética para el hospedero, quien además, simultáneamente sintetiza lípidos propios los cuales son principalmente integrados a sus membranas celulares (Patton *et al.*, 1977; Muscatine, *et al.*, 1981; Davies, 1984; Baird *et al.*, 2007). El aumento en los lípidos debido al choque térmico es inicialmente resultado del aumento en la actividad metabólica tanto del hospedero como del *Symbiodinium*. Sin embargo, al seguir bajo condiciones de estrés, que provocan la expulsión del simbiote, el hospedero pierde su fuente principal de reservas energéticas, y consecuentemente al no tenerla energía provista por el simbiote, la síntesis de lípidos en el hospedero se detiene y sus niveles dentro del organismo decaen.

El decremento en el contenido de lípidos resultado de blanqueamiento ha sido previamente documentado en otras especies de coral (Glynn *et al.*, 1985; Anthony y Connolly, 2007; Borell *et al.*, 2008). Sin embargo en contraste con nuestros resultados, en otras especies como *Porites compressa* la pérdida de lípidos no está asociado al periodo de estrés sino al de recuperación después del blanqueamiento (Grottoli *et al.*, 2004), o inclusive hay especies en donde a pesar de estar en condiciones de estrés térmico, no cambia su contenido de lípidos totales (Grottoli *et al.*, 2004; Fitt *et al.*, 2009).

Igualmente, la densidad de simbioses es variable entre especies y dentro de la misma especie, dependiendo de la región y de las condiciones a la que este siendo sujeta (ver Fitt *et al.*, 2000; Rodrigues y Grottoli, 2007; Moya *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Stat *et al.*, 2008; Fitt *et al.*, 2009). En el presente estudio, se encontró que por efecto de choque térmico la densidad de células decayó un 84% a las 72 horas de

experimentación. La pérdida de simbiontes por estrés térmico ha sido ampliamente documentada en varias especies de corales hermatípicos (Rodrigues y Grottoli, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Fitt *et al.*, 2009), así como su capacidad de recuperación cuando se restablecen las condiciones favorables para su desarrollo (Jones y Yellowless, 1997). Por lo tanto, aunque la densidad de simbiontes disminuya por el efecto del estrés, el coral eventualmente se puede recuperar y acumular nuevamente reservas energéticas para futuros eventos de estrés.

Asimismo, los resultados obtenidos pueden ser utilizados como una herramienta que ayude a comprender cambios en la distribución y abundancia de las especies de manera regional. Dar seguimiento al trabajo experimental en condiciones de choque térmico en las diferentes especies de coral y en las distintas regiones del Pacífico Mexicano permitirá explicar de manera parcial, cambios de estructura en el ecosistema. Esto es porque, especies como *P. verrucosa* que están ampliamente distribuidas en esta región, deben estar aclimatados a las condiciones sub-óptimas a las que se encuentran constantemente sujetos en su ambiente y, deben poseer la capacidad de responder y tolerar los incrementos abruptos en la temperatura, sin alcanzar el blanqueamiento. Y, por lo tanto, es muy posible que sean más resistentes y presenten una mayor recuperación ante incrementos graduales en la temperatura que se generen por futuros fenómenos ENSO o por el efecto del cambio climático y, eventualmente se conviertan en una especie dominante en el Pacífico Mexicano.

De la capacidad que tengan las comunidades coralinas de adaptarse o aclimatarse a periodos de incremento de temperatura, dependerá su éxito y supervivencia. Los datos obtenidos en el primer capítulo representan la primera evaluación sobre la respuesta

inmediata del efecto de choque térmico al que pueden estar sometidos durante varios días los corales de la región del Pacífico Mexicano, debido a la influencia de ondas internas. La respuesta de mitigación de daños asociada al incremento en el contenido de lípidos, es un efecto de aclimatación que les permite mantener la homeostasis del sistema, a pesar de las condiciones de estrés que les provocan los cambios abruptos de temperatura.

Finalmente, resultaría importante evaluar en un futuro, cómo afectan diferencialmente oscilaciones térmicas de corta duración, y anomalías térmicas de mayor persistencia, para poder establecer la capacidad de respuesta térmica de los corales en la región del Pacífico Mexicano.

## CAPÍTULO 2. RESPUESTA DIFERENCIAL ANTE VARIACIONES EN LA TEMPERATURA SUPERFICIAL DEL MAR EN COLONIAS DEL GÉNERO *Pocillopora* DEL PACÍFICO CENTRAL MEXICANO

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente, en el Pacífico Mexicano se han presentado eventos de blanqueamiento los cuales, se han asociado principalmente a la exposición de las comunidades coralinas a incrementos de temperatura durante los eventos ENSO (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el blanqueamiento también se encuentra asociado a decrementos en la temperatura (Saxby *et al.*, 2003; Edmunds, 2009), como el registrado en la región de Baja California (LaJeunesse *et al.*, 2007) y en la zona norte de las Islas Marietas, Nayarit (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). El grado de afectación que produzca el estresor sobre la comunidad coralina varía de factores como la duración del evento, la especie afectada y su localización geográfica. Inclusive, la respuesta puede diferir a nivel de micro escala, donde la misma especie puede ser diferencial y que además influyen otros factores locales como son las surgencias (D’Croz y Maté, 2004), periodos de luz y turbidez (Richier *et al.*, 2008).

En el presente capítulo, se evaluaron los cambios en la respuesta fisiológica de la misma especie ante las fluctuaciones anuales en la temperatura del mar, dependiendo de su distribución espacial dentro de la misma área (zona norte y sur) así como su distribución con respecto a la profundidad (colonias someras y profundas). El considerar el parámetro temporal y espacial es importante, ya que se ha encontrado que una misma especie puede tener diferente contenido de lípidos dependiendo de su distribución

espacial dentro del área (Brown *et al.*, 2002) y de su distribución global (Harland *et al.*, 1993). Por ejemplo, se ha encontrado que el contenido de lípidos de algunas especies Caribe se incrementa durante el invierno-primavera y disminuyen durante el verano (Fitt *et al.*, 2000); mientras que algunos corales de la región del Pacífico tienen un comportamiento contrario (Stimson, 1997). Adicionalmente, se debe tomar en cuenta la historia de vida de la colonia, ya que la exposición a eventos de estrés anteriores puede influenciar fuertemente su capacidad de respuesta ante eventos futuros de estrés.

Los resultados obtenidos representan la respuesta fisiológica generada por la exposición de los organismos a condiciones de estrés térmico experimental, así como al comportamiento *in situ* de los organismos ante las fluctuaciones anuales en la temperatura superficial del mar dependiendo de su distribución a micro escala. Esto, nos permitió conocer diferencias fisiológicas entre corales que se encuentran dentro de la misma área.

## 2.2 OBJETIVO

Describir el efecto que tienen el estrés térmico, en condiciones experimentales, previo al blanqueamiento en colonias de la especie *Pocillopora verrucosa* ubicada en el Pacífico Central Mexicano utilizando dos parámetros fisiológicos: el contenido de lípidos totales y la densidad de simbioses.

Además, evaluar los cambios de estos dos parámetros en función de la ubicación espacial de las colonias de esta misma región, como respuesta a los cambios anuales en la temperatura superficial del mar.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron fragmentos de colonias de la especie *Pocillopora verrucosa* que habitan en la Isla Redonda dentro del PNIM (Fig. 1). Para el experimento de estrés térmico, los muestreos se hicieron durante julio del 2008 y para la variación estacional se colectaron fragmentos de 12 colonias marcadas en tres periodos, septiembre del 2008, marzo y junio del 2009.

### 2.3.1 Trabajo de campo

Para el experimento de estrés térmico se colectaron 3 colonias de coral de la especie *Pocillopora verrucosa*, que tuvieran de 25-30 ramas de 10 cm de largo, como mínimo. La recolecta se realizó a una profundidad de 3.5 m aproximadamente. La temperatura registrada *in situ* fue de 29 °C, la salinidad de 31.2 ppm y 5.88 de oxígeno disuelto. Las muestras fueron transportadas en una hielera con agua de mar a las instalaciones del Centro Universitario de la Costa (Puerto Vallarta, Jalisco), donde fueron fragmentadas con el fin de obtener 90 piezas que fueron colocadas al azar en 9 acuarios (10 fragmentos en cada acuario). Cada acuario contenía agua de mar y contaban con filtros de cascada trabajando las 24 horas, calentador de titanio, termógrafo y luz artificial con focos Hamilton ( $\lambda=420-460\text{nm}$ ) para el mantenimiento de los fragmentos durante la aclimatación y el periodo de experimentación.

Para la aproximación *in situ*, en el mes de septiembre del 2008 se etiquetaron 12 colonias de la especie *P. verrucosa* distribuidas en la Isla Redonda (Fig. 1). La zona de distribución de la especie se dividió en dos: área norte y sur (Fig. 6), y del total de colonias marcadas, 6 corresponden al área norte (colonias 1 a 6) y 6 al área sur (colonias 7 a 11). En cada área (norte y sur) se marcaron 3 colonias de la región somera (3-5 m) y

3 de la región profunda (7-11m). En cada uno de los tres muestreos, se tomó un fragmento de 5 cm aproximadamente de cada una de las 12 colonias.

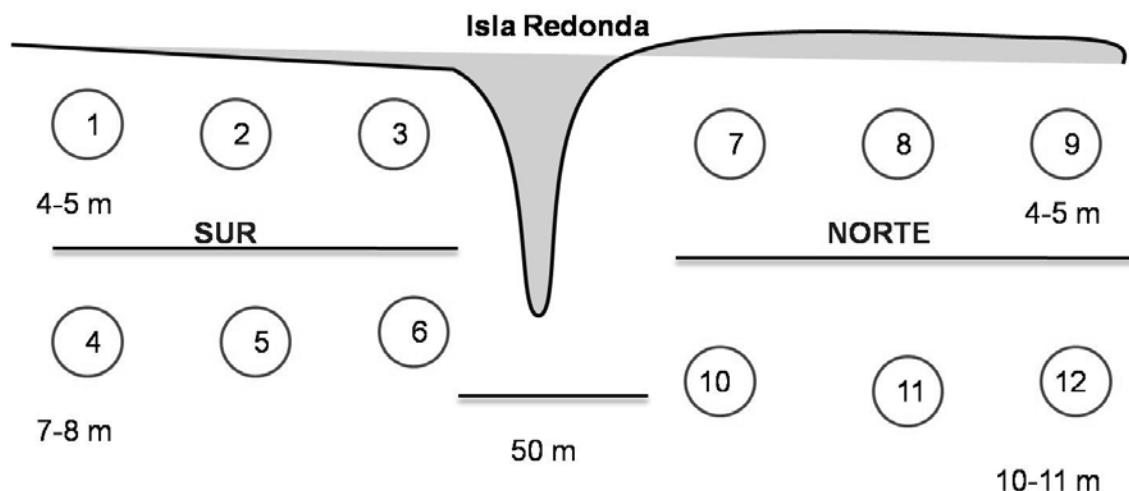


Figura 6. Esquema de la distribución espacial de las colonias de *P. verrucosa* muestreadas en la Isla Redonda utilizadas para la aproximación *in situ*. La distancia entre cada colonia de la misma área y profundidad fue de aproximadamente 5 m y la profundidad fue estimada durante un periodo de marea alta.

Además, se obtuvieron datos de temperatura *in situ* colocando un termógrafo (HOBO agua Temp Pro) a una profundidad de 8 m programado para tomar registros cada 15 minutos. El total de los datos obtenidos fue de julio del 2008 a junio del 2009.

### 2.3.2 Diseño experimental

Los fragmentos de coral fueron colocados en los acuarios 10 días previos al experimento para su aclimatación. Durante éste periodo, todos los fragmentos fueron evaluados diariamente en forma visual, y además se tomaron registros cada hora de temperatura, salinidad, oxígeno y pH con una sonda multi-paramétrica modelo YSI 85.

De manera adicional, al final del experimento se obtuvieron los registros de temperatura del termógrafo colocado dentro de cada acuario.

Después de 10 días de aclimatación, los fragmentos fueron expuestos a condiciones de estrés térmico experimental. El diseño experimental consistió en tres tratamientos con 3 repeticiones (3 temperaturas diferentes con 3 acuarios cada una). El primer tratamiento permaneció como control (T1) sin modificar la temperatura del agua (27°C), el segundo se elevó la temperatura a 28°C (T2) y en el último tratamiento la temperatura se incrementó a 31°C (T3, temperatura la cual se tiene registrada como disparadora de blanqueamiento). A diferencia del experimento descrito en el capítulo 1, en este caso el aumento de la temperatura se realizó de manera gradual durante 6 horas en los tanques del T2 y 8 horas en los tanques del T3. Además, en este segundo experimento, los corales permanecieron tanto durante la aclimatación como durante el periodo de experimentación dentro de los mismos acuarios, por lo que, las condiciones experimentales fueron en este caso, de ‘estrés térmico gradual’, simulando las condiciones térmicas a las que los organismos se encuentran sujetos durante periodos con anomalías térmicas como son los periodos ENSO, en vez de ‘choque térmico abrupto’, que son condiciones generadas por la presencia de ondas internas en la región y que fueron evaluadas en el capítulo 1. Por lo tanto, se espera que las diferencias en los diseños experimentales sean reflejadas en el tipo y tiempo de respuesta.

Al momento de estabilizar la temperatura se comenzó a contar el tiempo de evaluación. Se realizaron las evaluaciones en los siguientes periodos de tiempo: 0 (correspondiente al inicio del periodo experimental), 6, 18, 30, 48, 72, 96, 166 y 198 horas. Para cada evaluación se tomó un fragmento de coral de cada uno de los acuarios y

se fragmentaron en 3 piezas de las cuales 2 fueron fijadas en formaldehído con agua de mar al 10%, etiquetadas individualmente y se almacenaron a temperatura ambiente para ser transportadas al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas en las instalaciones de la UABC donde se llevó a cabo el análisis de las muestras.

### **2.3.3 Trabajo de laboratorio**

#### **2.3.3.1 Cuantificación de lípidos totales**

Para la cuantificación de lípidos totales se utilizó la metodología descrita en el Capítulo 1 (Folch *et al.*, 1957). Los resultados son expresados en gramos de lípidos totales por gramo de peso seco ( $\text{g}\cdot\text{gps}^{-1} \pm \text{error estándar}$ ).

#### **2.3.3.2 Densidad de simbioses**

Para la determinación de la densidad de simbioses se utilizó el tejido descalcificado para la cuantificación de lípidos. Del total de tejido, se retiró  $1 \text{ cm}^2$  y se homogeneizó en 2.0 ml de agua de mar filtrada pasada por UV. Se hicieron 8 conteos de células por cada muestra utilizando un hematocitómetro. Los resultados se expresan como número de células por centímetro cuadrado ( $\text{cél}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{error estándar}$ ).

### **2.3.4 Análisis estadístico**

Los cálculos estadísticos se hicieron utilizando el programa Sigma Plot V. 11.0 para Windows. Inicialmente, se determinó la normalidad y homocedasticidad de los datos. Posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de manera independiente para los datos de cuantificación de lípidos totales y de densidad de simbioses.

Primeramente, se analizaron los datos obtenidos en la experimentación utilizando una ANOVA de dos vías, donde se compararon entre los tratamientos (3 temperaturas) y tiempo de exposición al estrés térmico (0, 6, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 166, 198 horas). Posteriormente aplicando una ANOVA de tres vías se analizaron los datos obtenidos en campo, los cuales fueron comparados entre las variables: profundidad (somero vs profundo), sitio de muestreo (norte vs sur) y época de muestreo (septiembre, marzo y julio). Para ambos análisis, se empleó la prueba a posteriori de Tukey para determinar diferencias significativas entre las medias.

## **2.4 RESULTADOS**

### **2.4.1 Estrés térmico experimental**

Durante el periodo de aclimatación, todos los fragmentos fueron revisados diariamente y no se observaron evidencias de estrés físico. La evaluación se basó en observaciones visuales donde, los cambios o pérdida de coloración eran indicadores de estrés por expulsión de simbiontes. Después del periodo de aclimatación, la temperatura en el T1 se mantuvo constante (27°C) y, en los acuarios del T2 y T3 fue incrementada de manera gradual y se mantuvo estable durante el periodo de experimentación (Fig. 7A). Asimismo se muestran los valores de Salinidad (Fig. 7B) y oxígeno disuelto (Fig. 7C) para todo el periodo experimental.

El análisis del contenido de lípidos totales mostró poca variación en los organismos del tratamiento control (T1=27°C) y en el tratamiento T2 (28 °C), donde aunque el contenido de lípidos disminuyó de  $0.12 \pm 0.0084$  a  $0.07 \pm 0.0019$  g·gps<sup>-1</sup> no se encontró ninguna diferencia significativa entre T1 y T2 a lo largo del tiempo de

experimentación ( $p > 0.05$ ) (Fig. 8a). La pérdida de simbiontes en los acuarios correspondientes al control (T1) fue de 15.10 % y para T2 fue de 38.07 %, aunque sin diferencias estadísticas significativas en ninguno de los dos tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Fig. 8b). Los datos detallados correspondientes al ANOVA de dos vías con los datos del experimento de estrés térmico se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del ANOVA de dos vías de los datos de contenido de lípidos totales y densidad de simbiontes de los fragmentos de *P. verrucosa* sujetos a estrés térmico experimental. Las variables comparadas son: tratamiento (control, 28.5°C y 30.5°C) y tiempo de estrés (0, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 166 y 198 h. \*\*  $P \leq 0.001$ . GL=grados de libertad, SCM= suma de cuadrados medios.

Fuente de variación	GL	SCM	F	P
<b>Contenido de lípidos</b>				
Tratamiento	2	0.00454	3.825	**
Tiempo de estrés	9	0.00797	164.808	**
Tratamiento x tiempo	18	0.00106	21.902	**
Residual	60	0.0000484		
<b>Densidad de simbiontes</b>				
Tratamiento	2	2.344	14.416	**
Tiempo de estrés	9	11.327	69.651	**
Tratamiento x tiempo	18	1.697	10.438	**
Residual	60	0.163		

Al contrario de los dos tratamientos descritos previamente, los fragmentos expuestos a 31°C mostraron un decremento tanto en la cantidad de lípidos totales (ANOVA efecto del tiempo,  $F=164.8$ ,  $p < 0.001$ ), así como en la densidad de simbiontes (ANOVA efecto del tiempo,  $F=69.651$ ,  $p < 0.001$ ) con respecto al tiempo de experimentación. El contenido de lípidos varió de  $0.1531 \pm 0.001 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$  al inicio del experimento hasta  $0.0157 \pm 0.0023 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$ , en la última evaluación (Fig. 8a), mientras

que la densidad de *Symbiodinium* disminuyó en un 82.07%, alcanzando un valor mínimo de  $1.02 \times 10^6 \pm 0.41$  cél·cm<sup>-2</sup> a las 198 horas, tiempo en el cual el blanqueo (pérdida del color) de los fragmentos por estrés térmico fue evidente (Fig. 8b).

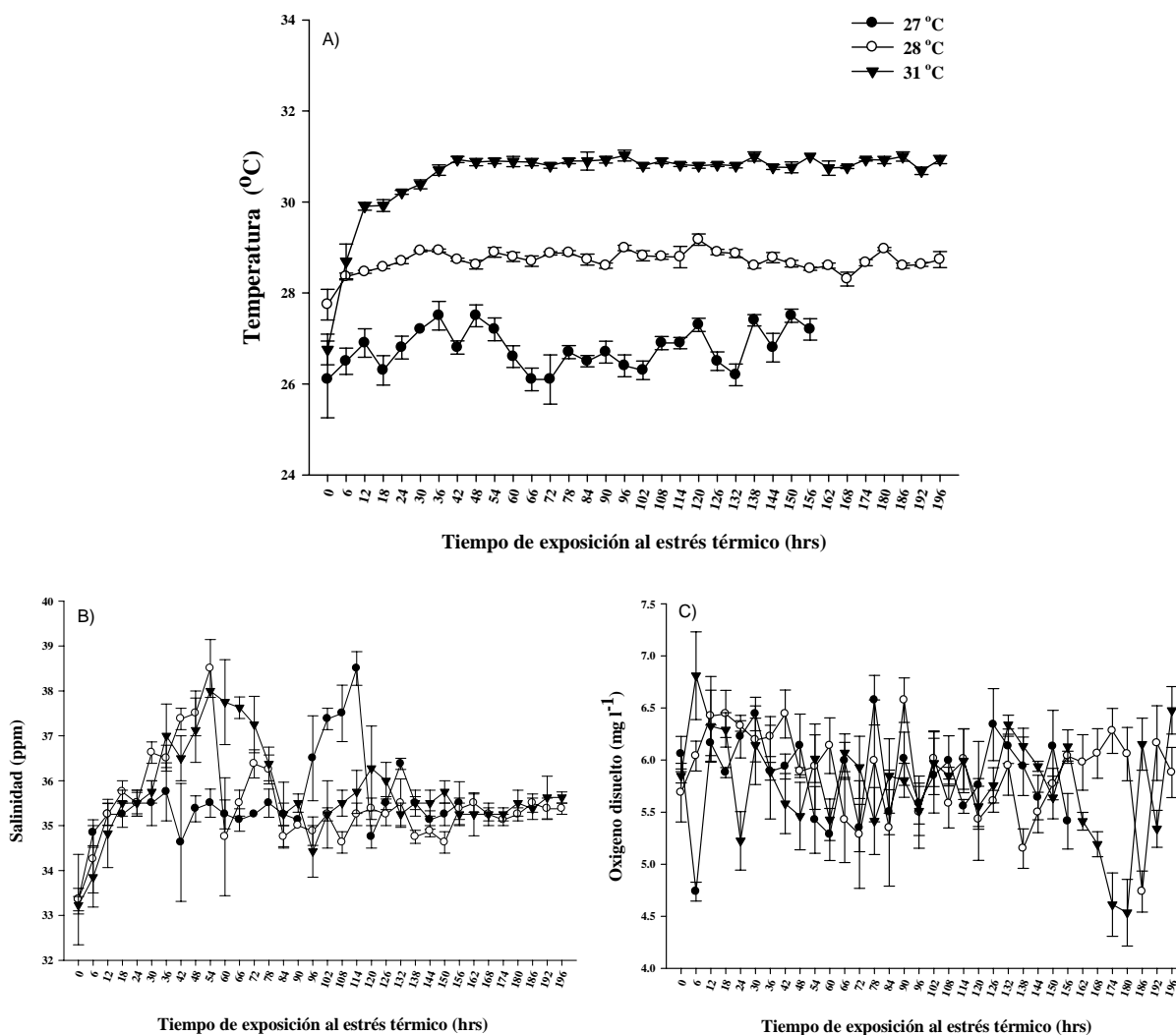


Figura 7. Registros de A) Temperatura, B) Salinidad y, C) Oxígeno disuelto durante el experimento de estrés térmico. Los registros fueron tomados dentro de los acuarios cada 15 minutos; cada valor corresponde a la media de seis horas ( $\pm$  error estándar); este valor fue obtenido promediando los registros de los tres acuarios correspondientes a cada tratamiento. (T1) 27°C, (T2) 28°C y (T3) 31°C.

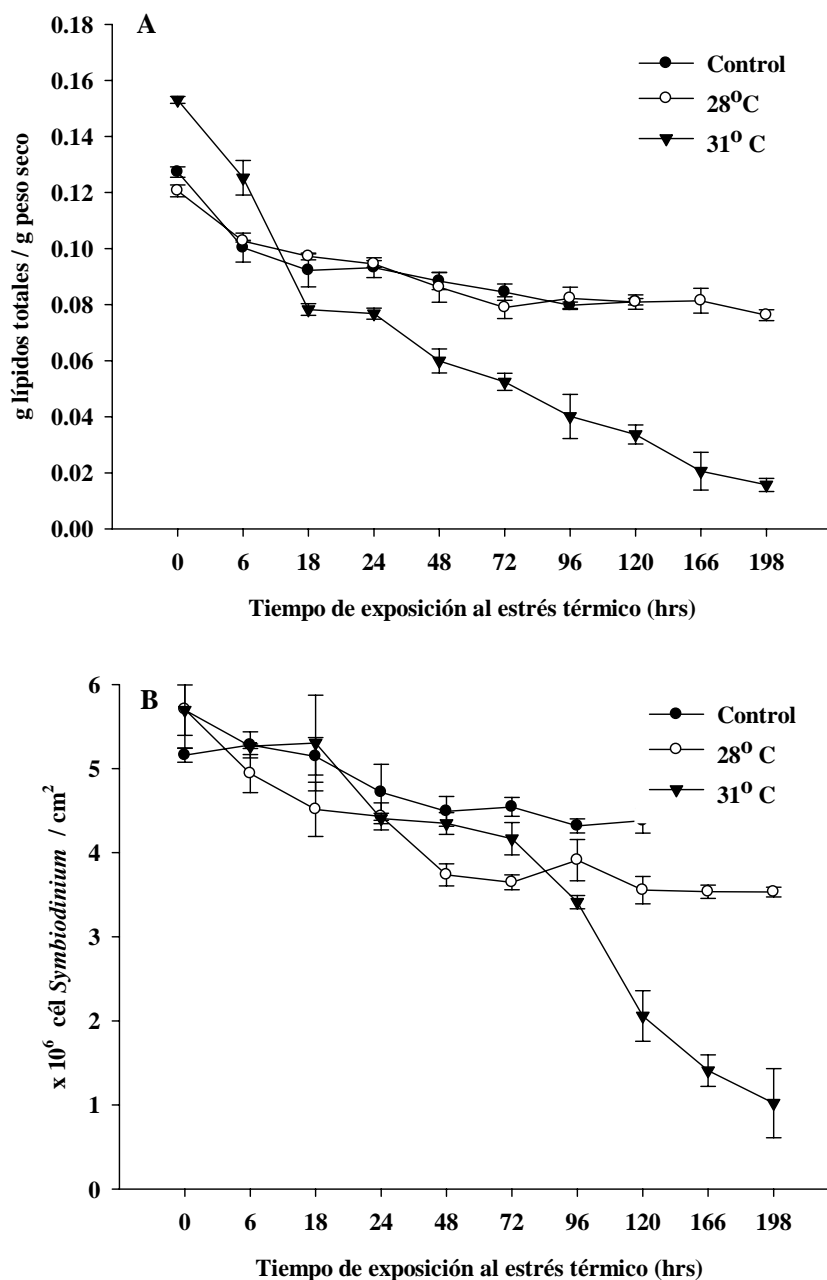


Fig. 8. Concentración de lípidos (A) y densidad de simbioses (B) en fragmentos de *Pocillopora verrucosa* durante el experimento de estrés térmico. Se muestran los tres tratamientos (control, 28°C y 30°C) y las 9 evaluaciones (0, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 166 y 198 horas). El tamaño de muestra  $n=3$ . Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar.

#### 2.4.2 Variación anual en el área de estudio

Los datos obtenidos en campo, mostraron diferencias espaciales a micro escala dentro de la misma localidad, entre la ubicación Sur (Fig. 9) y Norte (Fig. 10), así como entre profundidades y estacionalidad (Tabla 2). De manera general, en el área de estudio se encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos (ANOVA, efecto del sitio,  $F=638.07$   $p<0.001$ ) donde los máximos valores corresponden a las colonias de la zona Sur muestreadas durante el mes de septiembre ( $0.18 \pm 0.0049$   $\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ) y la mínima en marzo en las colonias someras de la zona Norte ( $0.04 \pm 0.0034$   $\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ). Además, se encontró que anualmente, el contenido de lípidos presentó menos variaciones en la zona sur con respecto a la zona norte.

De la misma manera, los datos obtenidos para densidad de simbioses indicaron diferencias significativas entre las zonas norte y sur (Tabla 2, ANOVA efecto del sitio,  $F=10.620$ ,  $p=0.001$ ), con los valores máximos durante el mes de septiembre variando de  $2.5 \times 10^6 \pm 0.09$  a  $7.35 \times 10^6 \pm 0.11$   $\text{cél}\cdot\text{cm}^{-2}$  y una disminución en el mes de julio, donde se calcularon densidades de  $2.21 \times 10^6 \pm 0.03$  a  $3.37 \times 10^6 \pm 0.06$   $\text{cél}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

A nivel de micro escala, dentro de la zona sur, no hubo diferencias significativas en el contenido de lípidos totales entre colonias someras y profundas (Fig. 9a). Sin embargo, existieron diferencias estacionales donde las colonias muestreadas durante marzo y julio mostraron niveles de lípidos significativamente inferiores de  $0.13 \pm 0.002$  a  $0.15 \pm 0.0008$   $\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}$  en comparación con las colonias muestreadas en septiembre, que presentaron valores entre  $0.16 \pm 0.004$  a  $0.18 \pm 0.004$   $\text{g}\cdot\text{gps}^{-1}$  (Tukey,  $p<0.001$ ).

Tabla 2. Resultados del ANOVA de tres vías de los datos de contenido de lípidos totales y densidad de simbiontes obtenidos de los fragmentos *in situ* de *P. verrucosa*. Las variables comparadas fueron: sitio (norte vs sur), profundidad (somero vs profundo) y mes (septiembre, marzo y Julio). \*\*P  $\leq$  0.001; NS= no significativo GL= grados de libertad, SCM= suma de cuadrados medios.

Fuente de Variación	GL	SCM	F	P
<b>Contenido de lípidos</b>				
Profundidad (Prof)	1	0.0000728	0.429	NS
Mes	2	0.0159	93811	**
Sitio	1	0.108	638.073	**
Prof x mes	2	0.000679	3.999	NS
Prof x sitio	1	0.000209	1.232	NS
Mes x sitio	2	0.00240	14.112	**
Prof x mes x sitio	2	0.00121	7.107	***
Residual	96	0.00017		
<b>Densidad de simbiontes</b>				
Profundidad (prof)	2	32.610	154.04	**
Mes	2	30.136	142.35	**
Sitio	1	2.248	10.620	**
Prof x mes	4	2.456	11.601	**
Prof x sitio	2	51.281	242.23	**
Mes x sitio	2	2.229	110.53	**
Prof x mes x sitio	4	2.016	113.44	**
Residual	270	0.212		

La densidad de *Symbiodinium*, en colonias de la zona sur, no se encontraron diferencias significativas entre las colonias someras y profundas (Fig. 9b); pero al igual que en el contenido de lípidos, las diferencias entre meses fueron significativas (Tabla 2, ANOVA efecto de época de muestreo, F = 142.35, p < 0.001), donde se observó una densidad de simbiontes significativamente menor en las colonias durante el mes de julio ( $2.2$  a  $2.6 \times 10^6$  cél·cm<sup>-2</sup>) en relación a septiembre y marzo ( $4.1 \pm 0.22$  a  $4.9 \pm 0.13 \times 10^6$

cél·cm<sup>-2</sup>), que fueron los meses que presentaron las mayores densidades y no presentaron diferencias estadísticas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

En la zona norte, la cantidad de lípidos totales mostró una interacción positiva entre la profundidad (someras vs profundas) y estacionalidad (septiembre vs marzo vs julio) (Fig. 10a). El contenido de lípidos más bajo se obtuvo para el mes de marzo ( $0.047 \pm 0.003 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ) y el más alto para julio ( $0.107 \pm 0.019 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ). Con respecto a la profundidad, las diferencias se encontraron solamente en las colonias del mes de septiembre, donde los corales someros presentaron niveles más altos de lípidos totales ( $0.129 \pm 0.004 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$ ) con respecto a los encontrados en la zona profunda, con valores de  $0.104 \pm 0.004 \text{ g}\cdot\text{gps}^{-1}$  (Tukey  $p < 0.05$ ).

Igualmente para la zona norte, los datos de la densidad de simbioses indicaron diferencias entre profundidades. Las colonias someras de marzo presentaron valores mayores a septiembre y julio, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.001$ ). Sin embargo, las colonias recolectadas de la zona profunda durante marzo ( $4.45 \pm 0.18 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y julio ( $3.36 \pm 0.06 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) mostraron una densidad de simbioses significativamente más baja en comparación con las muestreadas en septiembre (Tukey,  $p > 0.05$ ). De hecho, fue durante septiembre cuando se presentó la densidad de células de *Symbiodinium* más alta registrada para todo el periodo de muestreo, con valores estimados de  $6.4 \pm 0.32$  a  $7.18 \pm 0.13 \times 10^6 \text{ cél}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Fig. 10b).

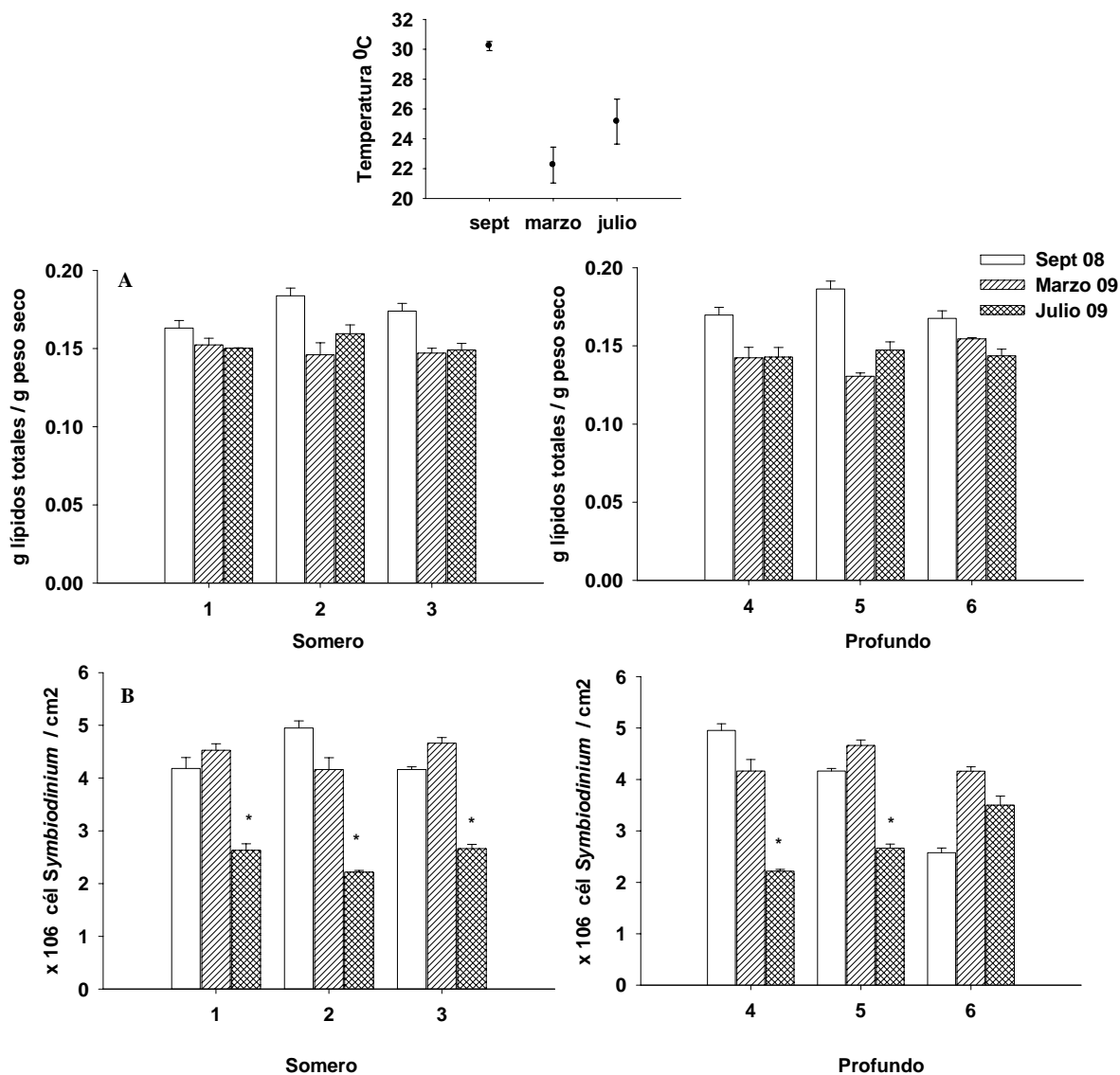


Figura 9. Cuantificación de lípidos totales (A) y densidad de simbioses (B), obtenidos de los fragmentos de *Pocillopora verrucosa* localizados en el área Sur de la Isla Redonda. Las colonias (1-3) corresponden a la zona somera; (4-6) corresponden a las colonias de la zona profunda. Asimismo, se muestran los datos de temperatura promedio correspondiente al mes de cada muestreo. Todas las medias se muestran con  $\pm$  error estándar. (\*) indica las diferencias significativas de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

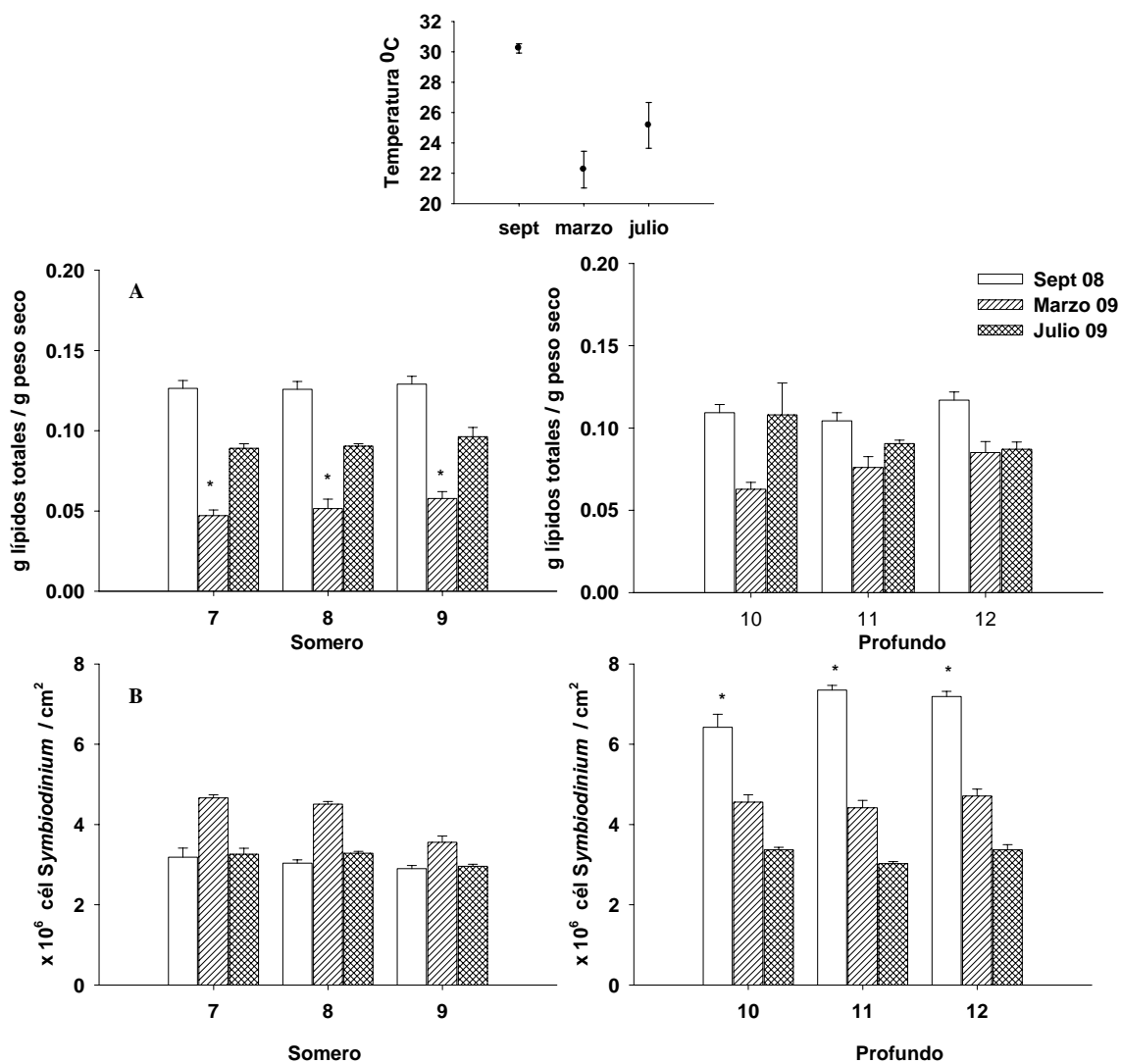


Figura 10. Cuantificación de lípidos totales (A) y densidad de simbiontes (B), obtenidos de los fragmentos de *Pocillopora verrucosa* localizados en el área Norte de la Isla Redonda. Las colonias (1-3) corresponden a la zona somera; (4-6) corresponden a las colonias de la zona profunda. Asimismo, se muestran los datos de temperatura promedio correspondiente al mes de cada muestreo. Todas las medias se muestran con  $\pm$  error estándar. (\*) indica las diferencias significativas de acuerdo a la prueba *a posteriori* de Tukey.

Los datos de temperatura obtenidos *in situ* indican la variación anual en la región (Fig. 11). La temperatura más baja se registró durante el mes de abril del 2009, con una temperatura promedio de 19.7 °C y el valor máximo correspondió a septiembre del 2008 con una temperatura promedio de 30.22 °C. Las mayores fluctuaciones de temperatura se registraron en dos períodos diferentes; primero durante julio y agosto de 2008, y posteriormente en abril y mayo de 2009 donde se registró un incremento abrupto de temperatura de 19 °C a 24 °C.

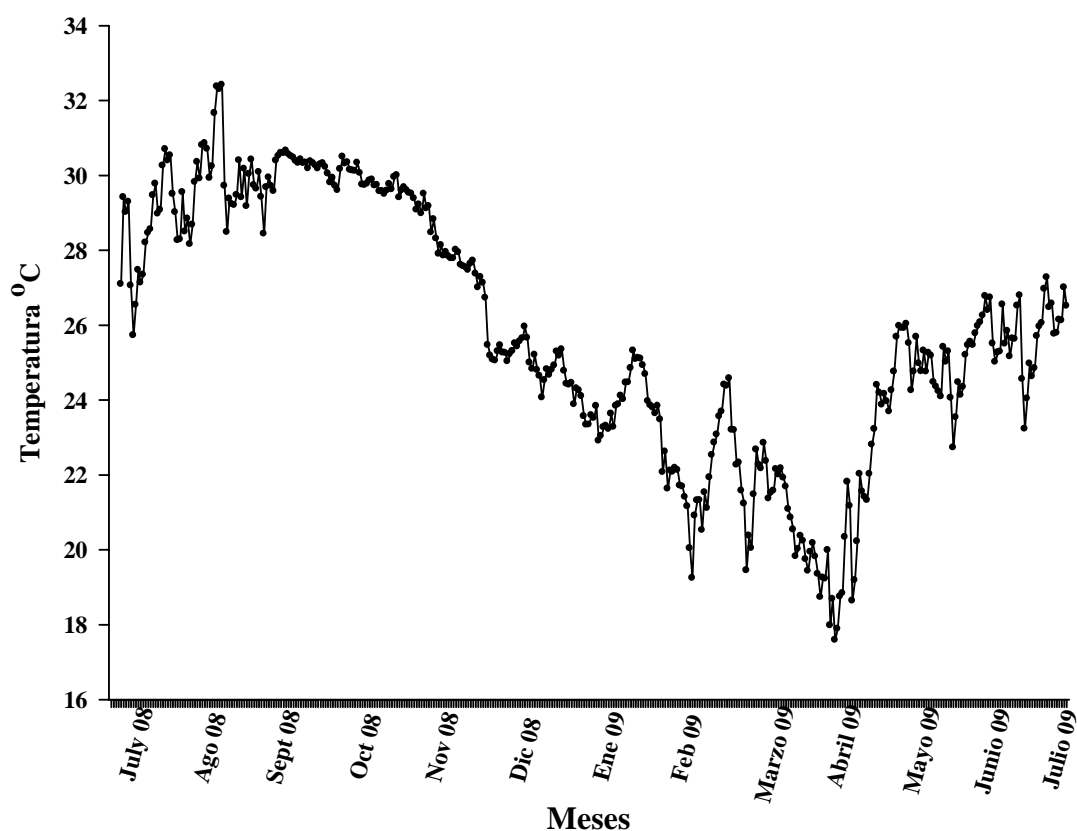


Figura 11. Temperatura registrada de julio del 2008 a julio del 2009 a 8 m de profundidad en la zona de estudio localizada en el frente norte de la Isla Redonda. El registro se llevó a cabo cada 15 minutos y cada dato corresponde al promedio diario.

## 2.5 DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo, son el primer estudio en la región que utiliza simultáneamente, la cuantificación de lípidos totales y la densidad de *Symbiodinium*, para evaluar la respuesta de *P. verrucosa* a estrés térmico experimental, así como la habilidad de la especie para aclimatarse a las fluctuaciones estacionales de la temperatura superficial del mar dentro de un marco espacio temporal a nivel de micro escala.

Los datos experimentales demuestran que la exposición de los organismos a estrés térmico (31 °C) durante varios días, produce como resultado un decremento en la cantidad de lípidos totales y la densidad de simbioses, que llevan finalmente al blanqueamiento del coral. La disminución en la cantidad de *Symbiodinium* es una respuesta del hospedero ante el estrés térmico. Durante condiciones de estrés por aumento de temperatura el simbionte produce una mayor cantidad de ‘especies reactivas de oxígeno’ (por sus siglas en inglés, ROS), las cuales son altamente tóxicas y al ser transferidas al hospedero, éste responde produciendo antioxidantes (Downs *et al.*, 2002; Downs *et al.*, 2005). Cuando las condiciones de estrés son prolongadas, el hospedero como respuesta de defensa ‘expulsa’ al *Symbiodinium* con el fin de no recibir más ROS producidas por el endosimbionte (Weiss, 2008). Debido a que en estas condiciones el coral deja de recibir nutrientes por parte del simbionte, el hospedero utiliza los lípidos almacenados como su fuente energética para su recuperación (Ver. Fitt *et al.*, 2000; Baird, 2008; Fitt *et al.*, 2009) y, en caso de que el estrés continúe, el organismo puede llegar a la muerte.

Los mayores niveles de lípidos en ambas zonas, se obtuvieron durante el mes de septiembre, cuando se registró una temperatura de 30°C. Estos resultados contrastan a lo encontrado en otros estudios donde el contenido de lípidos es mayor durante épocas con baja temperatura del agua (Fitt *et al.*, 2000). Sin embargo, debido a que el desarrollo de gametos es un proceso fisiológico que provoca un incremento en la producción de lípidos (Szmant y Gassman, 1990; Ward, 1995), que de acuerdo a lo reportado en la región esto ocurre de Mayo a Septiembre (Carpizo-Ituarte, *et al.*, 2010), se asume que el incremento de lípidos, es resultante del inicio de la actividad reproductiva en el organismo.

La variación a nivel de micro escala observada en el área puede atribuirse a un proceso de aclimatación local de las colonias, en respuesta a los cambios continuos en las condiciones ambientales de la región. La región del Pacífico Central Mexicano está influenciada por ondas internas las cuales provoca cambios en la temperatura del agua, con mayor intensidad durante el verano y en menor medida durante primavera y otoño (Filonov *et al.*, 1996). Durante el periodo de Julio-Agosto del 2008 y posteriormente a finales del muestreo (Marzo-Abril del 2009), se registraron cambios diarios de temperatura entre 4 hasta 5 °C los cuales fueron atribuidos a la presencia de ondas internas. Por lo tanto, los corales de esta región deben poseer la habilidad de aclimatarse y responder rápidamente a estos incrementos cortos pero abruptos de temperatura que ocurren durante estos periodos.

El proceso de aclimatación les ha permitido a los corales vivir en condiciones que se pueden definir como sub-óptimas. Un ejemplo de la respuesta inmediata generada por estas cambios en las condiciones ambientales se reporta en el capítulo 1 del presente

trabajo y está documentado por Rodríguez-Troncoso *et al.* (2010). Los resultados muestran que *P. verrucosa* tiene la habilidad de responder con un incremento considerable de lípidos en pocas horas, esto posiblemente con el fin de reparar y mitigar los daños celulares. Contrario a los resultados iniciales de “choque térmico en condiciones de laboratorio, la concentración de lípidos más baja fue calculada en marzo y julio del 2009, periodo en el cual se registraron condiciones de cambios abruptos en la temperatura, los cuales pueden estar asociados con las ondas internas. Sin embargo, las fluctuaciones diarias en la temperatura registradas en Marzo (de 1.64 a 5.81 °C por día) y Julio (0.85 a 5.02 °C por día) fueron mayores a las utilizadas durante la investigación previa. Por lo tanto, la baja cantidad de lípidos encontrados en los corales muestreados pudo deberse a que los cambios diarios de temperatura rebasaron el umbral de termotolerancia, lo cual conlleva al uso de lípidos de almacenaje (reserva energética) para mantener el metabolismo en lugar de utilizar esos recursos energéticos en producir lípidos estructurales que reparen la estructura celular.

Los corales de la zona norte contenían aproximadamente 40% menos cantidad de lípidos en relación con los de la zona sur. Durante el mes de mayo del 2008 se registró un decremento inusual en la temperatura superficial del mar, lo que provocó un evento de blanqueamiento que fue más evidente en las colonias encontradas entre los 8-11 m de profundidad (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Debido a que bajo condiciones de blanqueamiento, los lípidos de almacenamiento son utilizados y los niveles de *Symbiodinium* decaen (Fitt *et al.*, 2000; Baird, 2008; Fitt *et al.*, 2009), es probable que los corales, dependiendo de su capacidad de recuperación, tarden más tiempo en sintetizar sus nuevas reservas aún dentro de la misma región. Por lo tanto, los niveles de

lípidos post-blanqueamiento y su comportamiento durante los siguientes meses, sirven como información que indica las diferentes capacidades o tasas de recuperación que se observarán en el área después de eventos de estrés.

Aunque la zona norte corresponde al área más afectada por el blanqueamiento por frío, es la zona donde se obtuvieron los datos de la densidad más alta de *Symbiodinium* (durante el mes de septiembre en las colonias distribuidas a mayor profundidad). El blanqueamiento por frío asociado a un decremento anormal en la temperatura, es consecuencia de un proceso de fotoinhibición del *Symbiodinium*, lo que conlleva a una degradación del pigmento fotosintético generando una deficiencia en la cantidad de carbono fijado, disponible para el holobionte (Saxby *et al.*, 2003; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Es posible que una situación como la descrita, pudiera ser la causa de lo observado en los corales de la zona norte.

Además, a diferencia de los eventos de estrés térmico por alta temperatura, donde los dinoflagelados endosimbiontes son expulsados del hospedero vía exocitosis (Gates *et al.*, 1992), durante el blanqueamiento por frío, las células de *Symbiodinium* pueden ser degradadas *in situ* o pueden morir vía apoptosis (Weis, 2008). Esto es debido a que después de prolongados periodos de fotoinhibición del simbiote, el hospedero se deshará de aquellas células que no le provean de nutrientes. Por lo que aunque se tienen datos de elevadas densidades de *Symbiodinium* en las colonias profundas de la zona norte, es muy probable que las células se encuentren fotoinhibidas y sin capacidad fijar carbono fotosintético, lo que provocó una reducción en la cantidad de lípidos almacenados en el coral. Por lo tanto, el bajo contenido refleja el estado poco saludable de las colonias, aunque presente una alta densidad de simbiotes.

A pesar de que las colonias del género *Pocillopora* del Pacífico Central Mexicano han sido severamente afectadas por eventos de blanqueamiento (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002; Cupul-Magaña *et al.*, 2000; Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008), en la mayoría de los casos éstas se han recuperado (Cupul-Magaña, 2008). La tasa de recuperación depende de la severidad del daño en el tejido, así como del tamaño de la colonia, y existen registros de que el hospedero puede recuperarse en un periodo de un año, aún cuando el coral pierda hasta el 90% de las células simbiotas (Jones, 2008), esto siempre y cuando no ocurran otros eventos de estrés que los afectan durante ese periodo.

En los últimos años, las colonias coralinas de la región estudiada han sido continuamente afectadas por eventos de estrés térmico; los eventos ENSO se han vuelto más intensos y además, a esto se le suma el efecto de la acidificación del océano (Kleypass *et al.*, 2001; Feeley *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2005; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007; Veron *et al.*, 2009; Pelejero *et al.*, 2010). Todos estos eventos de estrés producen una ‘memoria’ sobre los organismos, cambiando la susceptibilidad y rango de tolerancia de los corales expuestos (Somero 2005; Middlebrook *et al.*, 2008). Si los eventos de estrés se presentan de manera recurrente, sin que los organismos tengan el tiempo de generar resistencia para su supervivencia, es probable que durante los próximos años los corales no tengan suficiente tiempo para recuperarse y almacenar reservas energéticas entre cada evento de estrés térmico que les produzca blanqueamiento.

Este capítulo destaca la importancia de evaluar las comunidades coralinas a micro escala, ya que denota la flexibilidad de la respuesta que puede tener una

comunidad coralina de acuerdo a su distribución espacial dentro de una misma área. en la región estudiada, dependiendo de su localización y profundidad presentan diferentes respuestas resultado de una aclimatación local, lo cual les puede proveer una mayor capacidad de supervivencia ante las continuas condiciones subóptima a las que son sometidas. Esto en un futuro determinará su habilidad de resistir ante los eventos de estrés sin llegar al blanqueamiento o bien dándoles una mayor resiliencia que les permita su permanencia en la región.

Finalmente, los resultados presentados servirán como datos iniciales para llevar a cabo un proceso de monitoreo constante de las colonias coralinas no solamente del área de estudio presentada, sino en general de las comunidades coralinas del Pacífico Mexicano. De esta manera, se podrá conocer con más detalle el estado de salud de los corales, y llevar un seguimiento previo, durante y post-blanqueamiento.

### CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS TÉRMICO EN COLONIAS DE *P. verrucosa* UTILIZANDO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES: *CuZnSOD* y *hsp70*<sup>(1)</sup>.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en capítulos anteriores, el blanqueamiento es una respuesta fisiológica externa observada en los corales, como respuesta ante condiciones de estrés. Actualmente, se están estudiando los mecanismos celulares y moleculares que se desencadenan por efecto de estrés, para evaluar al organismo antes de que el blanqueamiento sea evidente y, además en condiciones ‘normales’ estimar el estado de ‘salud’ de las poblaciones.

Con el incremento mundial de los eventos de blanqueamiento en los arrecifes coralinos, recientemente se han integrado aproximaciones bioquímicas y moleculares para entender el efecto del aumento en la temperatura sobre la biosíntesis y desnaturalización proteínica por estrés térmico en organismos pertenecientes al Phylum Cnidaria. Comúnmente, se ha utilizado la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70<sup>(1)</sup> (Heat Shock Protein por sus siglas en inglés) la cual, permite al organismo mantener un rango de termo-tolerancia sin que exista un aparente daño permanente en sus funciones celulares (Black *et al.*, 1995; Hayes y King, 1995; Lee-Shing *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1997; Choresh *et al.*, 2001; Downs *et al.*, 2005). Además son biomarcadores útiles debido a que su inducción es mucho más sensible al estrés que algunos índices fisiológicos como la inhibición el crecimiento (Feder y Hofmann, 1999).

---

(1) Los nombres de las proteínas se escriben con mayúsculas, mientras que los nombres de sus respectivos genes se escriben en minúsculas e itálicas.

La HSP70 pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico (HSP), las cuales son proteínas que, aunque se expresa de manera constitutiva (es decir, funciona dentro de la célula durante condiciones normales), presentan una mayor expresión cuando la célula es sometida a una condición de estrés (Parsel y Lindquist, 1993; Welch, 1993). La HSP70, actúa como un ‘chaperón molecular’, evitando la desnaturalización de proteínas funcionales afectadas por estrés térmico, reconociendo cambios en su estructura y ayudando a que éstos cambios no desencadenen la desnaturalización de las mismas (Coles y Brown, 1993; Feder y Hofmann, 1999; Hochacka y Somero, 2002; Bijlsm y Loeschket, 2005).

Aunque la expresión de la HSP70 es un factor favorable, su síntesis consume altos niveles de energía, lo que puede provocar que otras biomoléculas esenciales para el organismo no se sinteticen (Barua y Heckathorn, 1993; Krebs *et al.*, 1998; Feder y Hofmann, 1999; Somero, 2005). El nivel de expresión de la HSP70 y sus límites depende de cada especie y varía en función de su distribución biogeográfica (Feder, 1999; Hochacka y Somero, 2002; Hofmann, 2005; Osovitz y Hofmann, 2005).

Para la detección de los niveles de expresión de la HSP70 se pueden utilizar diferentes técnicas moleculares. En el caso de varias especies de corales hermatípicos se han utilizado diversas técnicas como PCR de punto final (Downs *et al.*, 2000), ‘Western Blot’ (Hayes y King, 1995; Choresh *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2006; Bromage *et al.*, 2009; Fitt *et al.*, 2009), ELISA (Brown *et al.*, 2002), microarreglos (Desalvo *et al.*, 2008) e hibridación *in situ* (Edge *et al.*, 2008). Recientemente, con el fin de tener una aproximación más exacta de la cantidad de RNA mensajeros que están regulando la síntesis de la proteína se ha comenzado utilizar la técnica de PCR-tiempo real (Mayfield

*et al.*, 2009), la cual ha sido exitosamente utilizada para evaluar el efecto de estrés térmico en otros invertebrados marinos como son el erizo morado, *Stongylocentrotus purpuratus* (Osovitz y Hofmann 2005; O'Donnell *et al.*, 2009) y el mejillón, *Mytilus californianus* (Place *et al.*, 2008). Sin embargo, no se han realizado estudios utilizando PCR tiempo real para estudiar la respuesta térmica en corales del género *Pocillopora*.

Además de las HSP existen otras enzimas y antioxidantes que se han utilizado como indicadores de daño celular. Se conoce que la superóxido dismutasa (SOD) es la primera respuesta de defensa enzimática por estrés oxidativo (Zelko *et al.*, 2002). En corales, existen tres tipos de SOD, de las cuales se ha encontrado que la *CuZnSOD* tiene actividad solamente en el hospedero (Richier *et al.*, 2003; Furla *et al.*, 2005). Así, los cambios en los niveles de SOD permiten evaluar la respuesta del organismo por efecto de estrés térmico (Downs *et al.*, 2000; Hawkdridge *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2002; Downs *et al.*, 2002, 2005; Richier *et al.*, 2003; Yakovleva *et al.*, 2004; Flores-Ramírez y Liñán-Cabello, 2007).

La habilidad de los corales para llevar a cabo una efectiva regulación de las proteínas, y la actividad de los antioxidantes, refleja la gran flexibilidad biológica que tienen estos organismos con respecto a su ambiente (Gates y Edmunds, 1999). Por lo tanto, la determinación de los cambios en los niveles de expresión proteica de la HSP70 y de antioxidantes como la *CuZnSOD*, nos permitirá evaluar la capacidad de termo tolerancia de la especie *Pocillopora verrucosa* distribuida en la región central del Pacífico Mexicano.

Sin embargo, a pesar de que las técnicas moleculares han resultado de gran utilidad en otros estudios, en el presente trabajo sólo se obtuvieron resultados parciales

con *CuZnSOD* y no fue posible obtener resultados confiables de la expresión de la *hsp70*. El presente capítulo resume la experiencia lograda en la utilización de estas técnicas moleculares, resaltando los resultados positivos encontrados durante la evaluación de la actividad de la *CuZnSOD* y, por lo otro lado, describe las complicaciones y sugerencias con la utilización de la técnica de PCR tiempo real para futuros estudios.

### **3.2 OBJETIVO**

El objetivo del presente capítulo es evaluar mediante la medición de los cambios en los niveles de expresión de la *hsp70* y de síntesis del antioxidante *CuZnSOD* en corales de la especie *Pocillopora verrucosa* sometida a condiciones de estrés experimental por aumento en la temperatura del agua.

### **3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA *CuZnSOD***

#### **3.3.1 Materiales y Métodos**

A partir del experimento de estrés térmico descrito previamente en el Capítulo 2, se obtuvo un fragmento de cada tratamiento (tres acuarios) con sus diez diferentes evaluaciones. En este caso, los fragmentos de coral fueron preservados con *RNAlater*® (Anexo I-1) a temperatura ambiente y al terminar el experimento fueron transportados al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo donde fueron almacenados a -20 °C, hasta su análisis.

La concentración de *CuZnSOD* se determinó utilizando el kit Biosytech ® SOD-525 para la cuantificación de la actividad de la SOD. Para la obtención del tejido, las

muestras previamente preservadas en RNAlater® fueron fragmentadas y maceradas con una solución de NaCl al 0.9%. Se tomaron 250 µl de muestra macerada y se le añadieron 400 µl de etanol:cloroformo (6.25:37.5), se agitó con vortex y se centrifugó a 3000 g por 5 min a 4 °C. Posteriormente se determinó la absorbancia a 525 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec 3000 (Anexo I-5). Se realizaron 4 lecturas de blanco y dos lecturas por cada muestra. La actividad de la proteína fue calculada mediante la fórmula:

$$U/ml = 0.93 \times [(V_s/V_c) - 1] / 1.073 - [0.073 \times (V_c/V_s)]$$

Donde:

$V_s$  = lectura de muestra (n=2)

$V_c$  = lectura de blanco (n=4)

Los resultados están expresados en unidades de *CuZnSOD* por volumen  $U \cdot ml^{-1} \pm$  error estándar.

### 3.3.2 Análisis Estadístico

Los cálculos estadísticos para los resultados de la actividad de la *CuZnSOD*, se hicieron utilizando el software Sigma Plot V. 11.0 para Windows. Inicialmente, todos los datos fueron probados para la prueba de normalidad y homocedasticidad. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se utilizó la prueba de Tukey para comparaciones *a posteriori*.

Debido a la falta de algunos datos en la cuantificación de los niveles de *CuZnSOD* no se pudo evaluar la interacción de la temperatura con el tiempo de exposición al estrés térmico.

### 3.3.3 Resultados y discusión

Los resultados mostraron diferencias en los niveles de *CuZnSOD* entre tratamientos (ANOVA efecto del tratamiento,  $F=132.03$   $p < 0.001$ ), ya que la temperatura de 31 °C provocó un incremento continuo a medida que los organismos se sometieron a estrés térmico. En contraste, en el tratamiento a la temperatura de 28°C no se observaron cambios significativos en los niveles del antioxidante (Fig. 12).

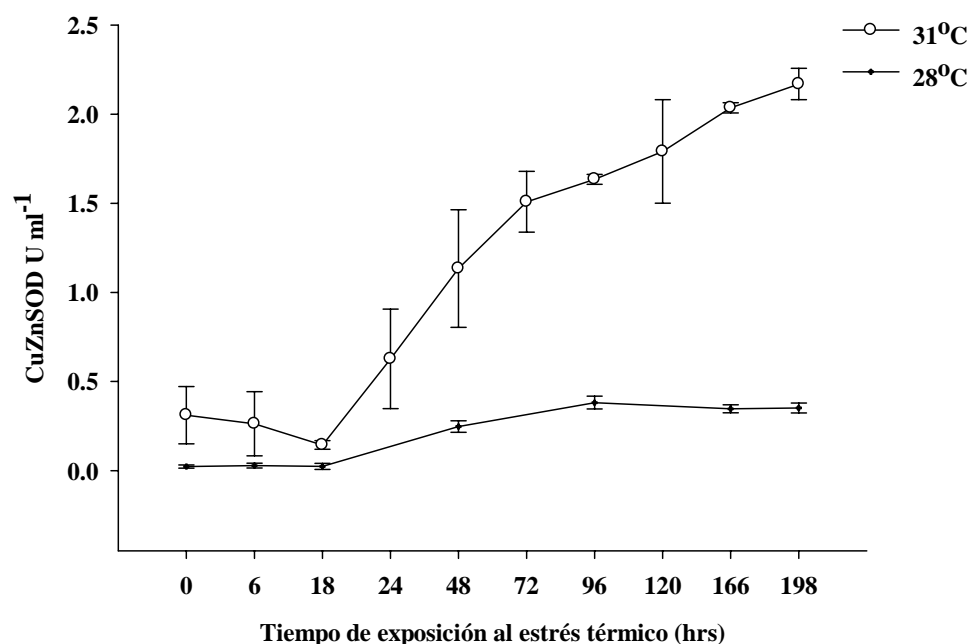


Figura 12. Cuantificación de *CuZn*-superóxido dismutasa (*CuZnSOD*) en fragmentos del coral *P. verrucosa* en condiciones experimentales de estrés térmico. Los datos están expresados en unidades de SOD por ml  $\pm$  error estándar.

La cuantificación de la actividad de la SOD, es un marcador celular muy útil para evaluar el estrés térmico ya que la superóxido dismutasa es una de las primeras proteínas sintetizadas para mitigación del estrés oxidativo (Pal Yu, 1994; Furla *et al.*, 2005). Esto es debido a que dismuta el radical superóxido ( $O_2^-$ ) y no produce radicales libres los

cuales son altamente tóxicos para el organismo. Además, su síntesis produce como efecto cascada la síntesis de los antioxidantes que seguirán las reacciones para eliminar otros ROS del organismo (Logan *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos al medir los niveles de *CuZnSOD* en el coral, muestran la respuesta de termo-tolerancia generada solamente por el hospedero sin mezclar las SOD producidas por el simbiote. En la mayoría de los organismos, la SOD está presente en dos isoformas dentro de la célula: la *CuZnSOD* que se encuentra localizada en el citoplasma y la *MnSOD* que está asociada con la mitocondria (Pal Yu, 1994; Zelko *et al.*, 2002; Furla *et al.*, 2005) y, solamente en células vegetales y en procariotes se ha encontrado la *FeSOD* (Furla *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2006). En los cnidarios simbióticos la isoforma inactiva de *CuZnSOD* se asocia con el simbiote (Richier *et al.*, 2003; Furla *et al.*, 2005). Por lo tanto, los cambios/aumentos en los niveles de *CuZnSOD* son respuesta del hospedero ya que el simbiote no sintetiza esta isoforma como respuesta al estrés oxidativo.

Aunque el aumento en la cantidad de antioxidante registrado en el tratamiento a 31 °C es una respuesta del hospedero, esto es resultado del estrés térmico que sufrió el simbiote ante el incremento en la temperatura. Existen registros previos que indican que el estrés térmico produce un incremento en la actividad metabólica del hospedero y de la tasa fotosintética del *Symbiodinium* produciendo una mayor cantidad de ROS (Downs *et al.*, 2000; Yakovleva *et al.*, 2004; Lesser 2006; Desalvo *et al.*, 2008; Vidal-Dupiol *et al.*, 2010). A través del simbiosoma, el hospedero y el *Symbiodinium* tienen un intercambio continuo de diferentes moléculas (Furla *et al.*, 2005; Mayfields y Gates, 2007; Yellowlees *et al.*, 2008), por lo que el exceso de ROS producidas por el simbiote

es fácilmente traslocado al hospedero. Este último, generalmente responde produciendo proteínas, enzimas y antioxidantes de bajo peso molecular, que evitan desordenes intracelulares como pueden ser: daños en las membranas celulares, inactivación enzimática, la aparición de mutaciones, pérdida de funcionalidad en los organelos celulares, reducción en la eficiencia metabólica y fijación de carbono (Szmant y Gassman, 1990; Lee-Shing *et al.*, 1997; Downs *et al.*, 2002; Downs *et al.*, 2005; Yakovleva *et al.*, 2004). La producción de SOD en el hospedero aumenta, pero al llegar a su máximo de tolerancia con el fin de evitar la traslocación de ROS, expulsa a los simbiontes como respuesta de defensa (Capítulo 2) lo que conlleva al blanqueamiento del coral.

El incremento en la actividad de la *CuZnSOD* por estrés térmico experimental fue registrado después de las 18 horas de exposición. Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando la especie *Pocillopora verrucosa*, concuerdan con resultados similares obtenidos para otras especies de coral (Downs *et al.*, 2000; Yakovleva *et al.*, 2004; Lesser 2006; Desalvo *et al.*, 2008; Vidal-Dupiol *et al.*, 2010); sin embargo, previos en *Pocillopora capitata* distribuida en el Pacífico Mexicano, no mostraron un aumento en la actividad de la SOD por estrés térmico inducido, a una temperatura de 32 °C (Flores-Ramírez *et al.*, 2008). Las diferencias entre ambos estudios pueden deberse a que el tiempo de respuesta puede cambiar entre especies inclusive en colonias de la misma región (Yakovleva *et al.*, 2004).

Pero además, es importante mencionar que en el experimento de Flores-Ramírez *et al.* (2008) no aclimataron a los organismos antes de estresarlos. Los corales son organismos altamente sensibles, que responden rápidamente ante cambios en su

ambiente. Es probable, que no se hayan registrado cambios en la actividad de la SOD debido a que estaban previamente estresados por el transporte y manipulación previa al experimento; y por lo tanto, no fue detectable el efecto del estrés térmico. De aquí la importancia de aclimatar los organismos previamente, como fue hecho en el presente estudio, antes de ser llevados a una condición de estrés experimental.

Además, como se mencionó en capítulos anteriores, las colonias de esta región se encuentran constantemente afectadas por incrementos abruptos en la temperatura por influencia de ondas internas (Filonov *et al.*, 1996). Estos, son eventos de corta duración, a los cuales están aclimatados, y por lo tanto, es de esperarse que cambios anuales no produzcan como respuesta una mayor síntesis de SOD como ha sido reportado en regiones cercanas a nuestra área de estudio (Liñán-Cabello *et al.*, 2009). Por otra parte, es importante considerar otras condiciones que fluctúan anualmente como la intensidad lumínica, que en combinación con el aumento o disminución anormal en la temperatura, ha demostrado que pueden inducir la producción de SOD y afectar diferencialmente a las colonias de la misma especie dentro de una misma región (Brown *et al.*, 2002; Downs *et al.*, 2002; Saxby *et al.*, 2003; Richier *et al.*, 2008; Liñán-Cabello *et al.*, 2010).

Por lo anterior, la cuantificación de la SOD es un marcador importante que nos permite evaluar el efecto que tienen factores de estrés (en este caso la temperatura) sobre las comunidades coralinas del Pacífico Central Mexicano. Un monitoreo continuo de las colonias utilizando los niveles de *CuZnSOD* como biomarcador nos permitirá contar con elementos a nivel bioquímico-molecular, para estimar el estado de salud de los corales, así como su respuesta celular ante eventos de estrés que se presenten en la región. Sería conveniente por lo tanto, validar estos indicadores bioquímico-moleculares en otras

especies de coral, así como en otros organismos que conforman las comunidades arrecifales.

### **3.4 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA *hsp70***

#### **3.4.1 Materiales y métodos**

##### **3.4.1.1 Extracción de RNA total y evaluación de los niveles de *hsp70***

Para la extracción de RNA total, se utilizaron los mismos fragmentos de coral que los utilizados para la evaluación de la *CuZnSOD*, empleando el método de fijación y almacenaje descrito anteriormente.

La expresión de la *hsp70* fue evaluada a partir del RNA total (Fig. 13). Para su obtención se extrajo el tejido del coral, macerándolo con 500  $\mu$ l de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) en un mortero de porcelana. Se añadieron 500  $\mu$ l de TRIzol<sup>®</sup> y 5  $\mu$ l del gen de somatolactina (*sl*), el cual fue utilizado como gen exógeno (su obtención se describe en el punto 3.4.1.2). La extracción de RNA total se hizo de acuerdo al protocolo del proveedor (Anexo I-3), se trató con DNasa y se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND<sup>®</sup>1000 (Anexo II). Posteriormente, 500 ng de RNA total de cada muestra fueron transformados a DNA complementario (cDNA), por medio de la enzima transcriptasa reversa del kit utilizando Superscript III<sup>®</sup> (Invitrogen).

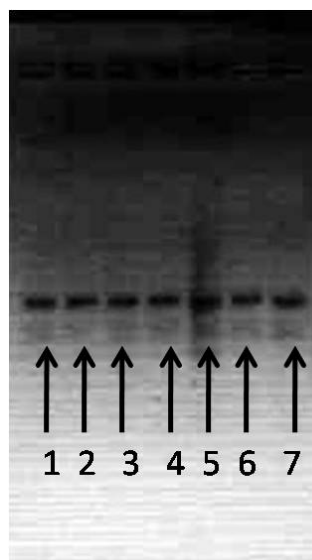


Figura. 13. Ejemplo de la extracción de RNA total de fragmentos de *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico. El gel contiene muestras del acuario 6 (carriles 1 a 4) con tiempos 0, 6, 18, 24 horas respectivamente y muestras del acuario 7 (carriles 5 a 7) con tiempos 18, 24, 48 horas. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%.

Finalmente, por medio de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) de punto final se probó la eficiencia de los cebadores (Tabla 3) para amplificar los genes deseados, *hsp70* y *sl* (Fig. 14). La mezcla de reacción de PCR consistió en 13  $\mu$ l de MangoMix® (Bioline), 1  $\mu$ l de cebadores 10 mM (0.5  $\mu$ l de sentido y 0.5  $\mu$ l de antisentido) y 1  $\mu$ l de cDNA. El protocolo de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 15 seg a 95°C, de 60 seg a: 63 °C para el gen *hsp70* y 58 °C para el gen *sl*, y 45 seg a 72 °C, así como 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C. Cabe mencionar, que las temperaturas de alineamiento para ambos genes fueron previamente probadas mediante un PCR en gradiente: para *hsp70*, la temperatura óptima de alineamiento fue de 63 °C, y para el

gen *sl*, la temperatura de óptimo alineamiento fue de 58 °C coincidiendo con lo previamente probado en otro estudio (Mayfileld *et al.*, 2009).

La electroforesis de los fragmentos se realizó utilizando 10 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2.5 % durante 90 minutos a 40 Volts. Para la visualización de las bandas se utilizó SYBR® Green I (Invitrogen) con una concentración de 1x. Como se puede observar en la figura 14 se obtuvieron los productos esperados tanto para *sl* (102 pb) como para *hsp70* (88 pb).

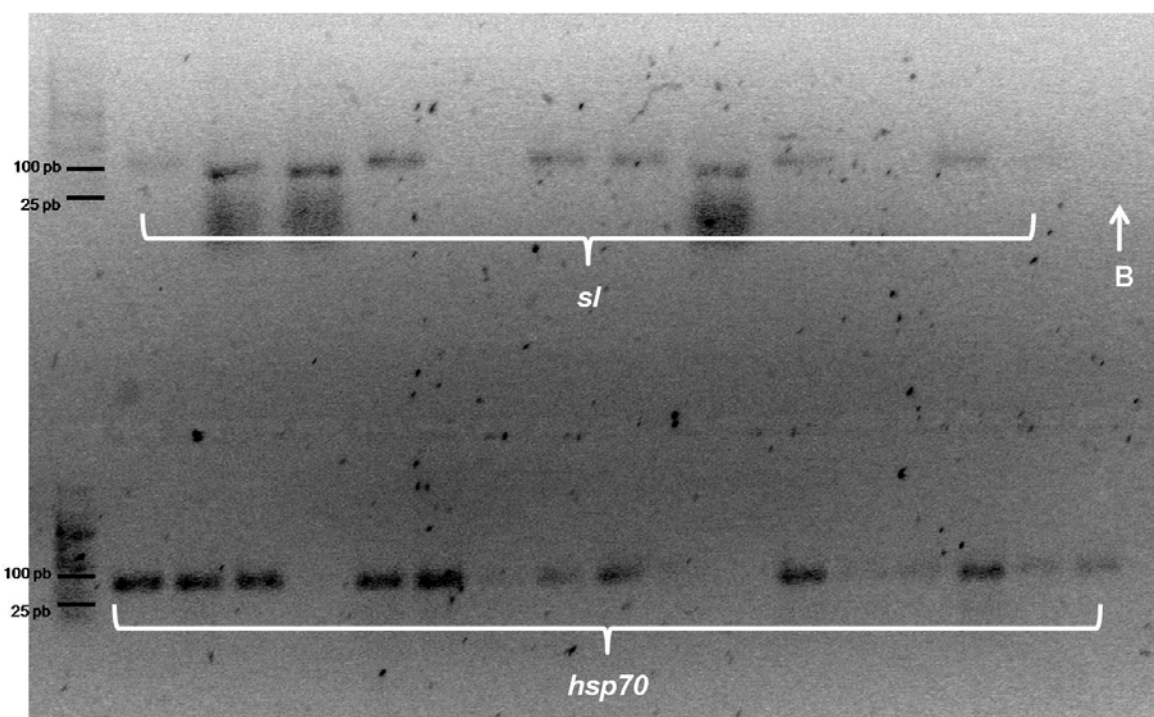


Figura 14. Amplificación de los genes *sl* (parte superior) y *hsp70* (parte inferior) a partir del RNA total obtenido de fragmentos de la especie *P. verrucosa*. Los genes fueron observados en un gel de agarosa al 2.5%

Los niveles de *hsp70* se evaluaron mediante una cuantificación relativa utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Para este fin, siguiendo el protocolo para PCR Tiempo-Real de Applied Biosystems® se prepararon reacciones de 10 µl utilizando productos del kit SYBR® Green para tiempo real. La mezcla consistió en 1 µl de SYBR Green 10x, 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.8 µl de mezcla de dNTP, 0.05µl de enzima Amplitaq gold polimerasa® (Applied Biosystems), 0.1 µl de AmpErase® Uracil N-glycosylasa, 1 µl cDNA y 0.4 µl de cebadores 10 mM (0.2 µl de sentido y 0.2 µl de antisentido). Las secuencias de los cebadores utilizados se presentan en la Tabla 3. El protocolo de amplificación utilizado fue el sugerido por el proveedor: 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 64 °C por 1 min, así como 95 °C por 15 seg y 64°C durante 1 min para la curva de fusión.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para el PCR punto final y PCR tiempo real. S: sentido, A: antisentido

Gen	Origen	T°C alineamiento	Secuencia	Fuente
<i>sl</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	58 °C	S: 5' GGCTGGCTTTGCATGTATCA 3' A: 3' AGTGGAGCAACCATTATCAGATATCT 5'	Mayfield et al. (2009)
<i>hsp70</i>	<i>Pocillopora</i> sp.	63 °C	S: 5'ATCCAGGCAGCGGTCTTGT 3' A: 3' TCGAGCAGCAGGATATCACTGA 5'	Presente estudio

#### 3.4.1.2 Obtención del gen somatolactina (*sl*)

Debido a que por efecto del estrés térmico, todos los genes constitutivos descritos hasta el momento para corales sufren de cambios en su expresión, no fue posible utilizarlos como control basal, por lo que se decidió ‘inyectar’ un gen exógeno durante la extracción de RNA en cada muestra, de acuerdo con la metodología descrita por Mayfield *et al.* (2009). Para sintetizar el gen exógeno se siguió la metodología descrita

por el autor, utilizando el gen de somatolactina (*sl*) secuenciado a partir del pez Tilapia (*Oreochromis* sp.). El gen fue clonado en un vector pGEM-T® (Promega) y digerido con la enzima de restricción Spe1® (Promega). El fragmento de DNA obtenido se transcribió con el kit T7 (Bioline) que contiene la secuencia del promotor específico para el vector utilizado. Una vez obtenido el fragmento de RNA se trató con DNAsa (Ambion) incubando a 37°C durante 20 minutos y se purificó incubándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente con 2 µl de Pellet Paint® (Novagen), 5 µl de Acetato de Sodio (3M, 5.2 pH) y 125 µl de Isopropanol. Se centrifugó por 10 minutos a 4 °C a una velocidad de 12,000 g. Posteriormente se hicieron dos lavados con etanol al 75%, centrifugando a 7,400 g durante 5 min a 4°C. El RNA fue resuspendido en 20 µl de agua inyectable (Anexo I-4).

Para estabilizar el RNA y evitar la degradación del gen *sl* se añadieron nucleótidos al extremo 3' utilizando el kit Poly(A)® (Ambion). Nuevamente se purificó el producto utilizando el kit de extracción de RNA aqueous® (Ambion) libre de fenol, obteniendo un volumen final de 40 µl. La calidad del RNA fue cuantificada utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND®1000. Se hicieron diluciones para obtener una concentración final de 5 pg·µl<sup>-1</sup> y se almacenó a -80°C hasta su adición en cada una de las muestras, al momento de comenzar la extracción de RNA total de los fragmentos de coral.

### **3.4.2 Resultados y discusión**

#### **3.4.2.1 Almacenamiento de las muestras y extracción del RNA total**

En el caso de esta evaluación, se presentaron varios problemas durante el procesamiento de las muestras. Por lo tanto, los resultados mostrados son

aproximaciones metodológicas que se fueron implementando con el fin de generar un protocolo que pueda ser utilizado en futuras investigaciones, tomando en cuenta la experiencia generada durante el presente trabajo.

Debido a la distancia geográfica entre el sitio de experimentación y el sitio de procesamiento de las muestras, los fragmentos fueron fijados en *RNAlater*® para evitar la degradación del RNA. Esta solución, se utiliza comercialmente para estabilizar y proteger el RNA eliminando la necesidad de que las muestras sean congeladas inmediatamente. El *RNAlater*® está mayoritariamente constituido por sulfato de amonio, lo que produce una solución hiper-osmótica. Los corales son organismos osmoconformadores, es decir, igualan su salinidad interna con la del medio. Al sumergirlos abruptamente en un medio hiper-osmótico los corales responden secretando mucus para formar una barrera que evite la pérdida de iones y un desequilibrio osmótico que comprometa su estructura celular (Mayfield y Gates, 2007). Debido a esto, la penetración de la solución en el tejido es limitada, lo que disminuye la eficiencia de la solución y la degradación del RNA.

De acuerdo con el protocolo del proveedor, para un óptimo mantenimiento de la muestra después de almacenarla en *RNAlater*® se debe mantener a 4 °C por 12-24 horas y después a -20 °C, para posteriormente ser descongelado hasta el momento que sea procesado. Las muestras fueron obtenidas en Puerto Vallarta donde se dejaron a temperatura ambiente y posteriormente, se transportaron y almacenaron a -20 °C hasta su llegada a Ensenada con el fin de evitar descongelamientos continuos durante su transporte. Debido a que pasaron varios días a temperatura ambiente, al momento de descongelarlo por primera vez se utilizó todo el tejido, ya que no se tenía certeza de que

al volverlo a congelar se mantuviera en buen estado la muestra. Y además, al descongelarlos aunque fueron enjuagados con agua de mar esterilizada debido a la alta cantidad de sales que contiene, es posible que hayan quedado residuos de los cristales de sal que pudieran haber sido acarreados y hayan interferido durante la extracción del RNA con el Trizol®. Por la experiencia obtenida, en caso de que se requiera transportar muestras se sugiere macerarlas inmediatamente con Trizol® y transportarlas en hielo ( $\sim 4$  °C) al laboratorio donde serán analizadas.

Como se mencionó en la metodología, para la extracción del RNA total se utilizó Trizol®, que de acuerdo al protocolo para tener una extracción óptima, se debe de utilizar un máximo de 100 mg de tejido por cada ml de solución. Para obtener el tejido, durante el proceso se maceró el fragmento de coral completo, es decir, el esqueleto junto con el tejido y, aunque se trató de que los fragmentos usados para cada extracción fueran de tamaño y peso similar, no fue posible determinar la proporción precisa de tejido/esqueleto. Las variaciones en la cantidad de tejido se reflejaron en que, a pesar de tener dos extracciones del mismo fragmento de coral, la cantidad de RNA total obtenido fue diferente. Los datos de cuantificación se muestran en el Anexo II con concentraciones que variaron entre 30 y 2400  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

Asimismo, se obtuvieron los valores de la proporción 260/280 y 260/230. Estas proporciones son índices que ayudan a determinar la 'pureza' del RNA obtenido y de los ácidos nucleicos respectivamente. Una proporción 260/280 igual a 2.0 indica un RNA totalmente puro, sin embargo, para el PCR tiempo real valores de 1.8 se toman como aceptables; por otro lado, la proporción 260/230 indica la pureza de los ácidos nucleídos, y los valores esperados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2 (Fleige y Pfaffl, 2006;

NanoDrop Technologies, 2007). Los valores obtenidos a partir de las muestras de fragmentos de coral para la proporción 260/280 fueron de 1.5 a 1.9. Los bajos valores de la relación 260/280 pueden estar asociados con residuos de fenol (proveniente del Trizol®), proteínas u otros contaminantes como residuos inorgánicos de carbonato y pigmentos fotosintéticos provenientes del *Symbiodinium*. De hecho, se ha encontrado que la calidad del RNA es menor en muestras que poseen pigmentos (Wan-Heng *et al.*, 2001).

Los valores de la proporción 260/230 se encontraron en el rango de 0.4 a 1.1. En este caso, los valores bajos de 260/230 se asocian directamente a residuos del TRIzol®, ya que se conoce que absorbe a 230 y ~270 nm (NanoDrop Technologies, 2007). En este caso, se recomendaría para la extracción del RNA total, el uso de reactivos libres de fenol e implementar un protocolo con el cual se puedan eliminar los pigmentos fotosintéticos del *Symbiodinium* y el exceso de carbonato de calcio, con el fin de obtener una mejor calidad de RNA y consecuentemente la del cDNA.

#### **3.4.2.2 Evaluación del gen *sl***

En la figura 15 se presenta la curva de fusión obtenida para el gen *sl*, el cual es considerado como el gen control del experimento. En el gráfico, se que el gen de interés presenta una temperatura de desnaturalización a los 77°C; pero además, se pudo observar un segundo producto de amplificación con una temperatura de desnaturalización de 72°C.

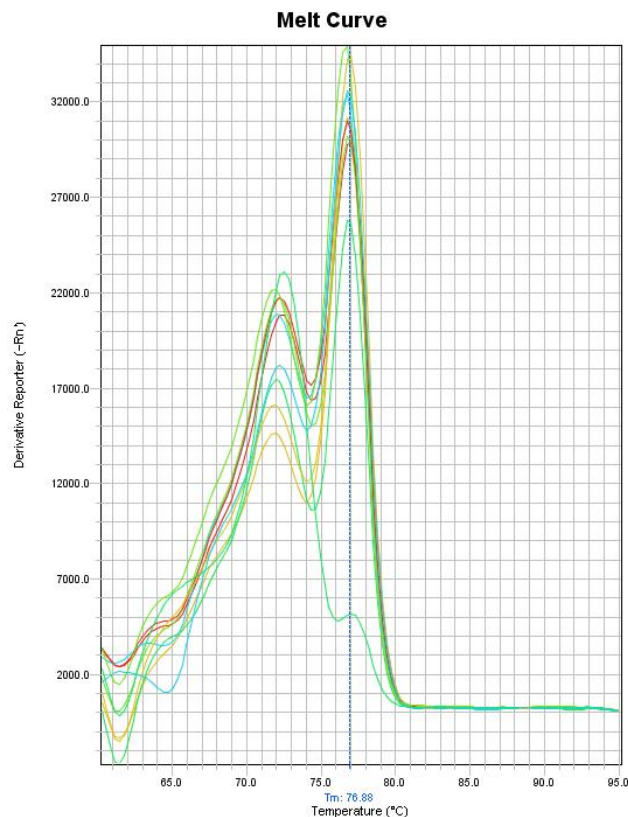


Figura 15. Curva de fusión resultante de la amplificación por PCR tiempo real para el gen *sl* incluido como gen exógeno durante el análisis de las muestras de fragmentos del coral *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico experimental. En la curva se puede observar la presencia de dos productos. El gen de interés asociado a una temperatura de desnaturalización igual a 77°C y un segundo producto con una temperatura de 72°C.

Debido a que el análisis de la curva de fusión es análogo a una electroforesis en gel de agarosa (Giglio *et al.*, 2003), las muestras fueron observadas en un gel de agarosa al 2.5% (Fig. 16). En este, se observaron los dos productos encontrados en la curva de fusión. Un primer producto con un tamaño de >100 pb que corresponde al gen *sl*, y que presenta una banda muy intensa, y un segundo producto con una banda de menor intensidad y un tamaño de ~ 50 pb, el cual se observó tanto en las muestras obtenidas en el experimento de estrés térmico, como en el control sin cDNA; el cual, probablemente

es el producto que corresponde al segundo pico de amplificación ( $\sim 72^{\circ}\text{C}$ ) visualizado en la curva de fusión (Fig. 15). La explicación más probable, es la existencia de contaminación en los cebadores, por lo que se recomienda, a partir de cebadores nuevos volver a amplificar la muestra en un PCR de punto final y que en el gel se observe una sola banda, para asegurarse de que sólo haya evidencia de amplificación del *sl*.

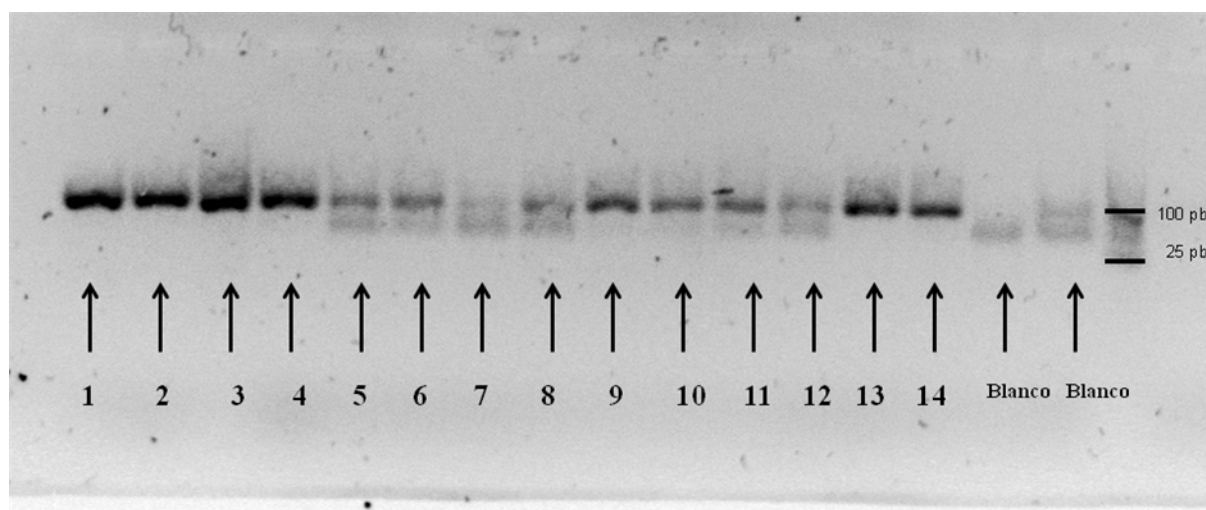


Figura 16. Amplificación del gen exógeno *sl* (102 pb) a partir del producto de PCR tiempo real. En el gel se observan diferentes muestras inyectadas con el gen exógeno (carriles 1 a 14), que presentan diferencias en la intensidad de bandas, así como la amplificación de un segundo producto de de menor tamaño ( $\sim 50$  pb) presente en los carriles 5 al 12 y también en los dos carriles correspondientes al control sin cDNA (blanco).

Las curvas de la amplificación del gen *sl* obtenidas se ejemplifican en la figura 17. Los gráficos A-D representan los resultados de un tratamiento (una sola temperatura), en solo un tiempo de evaluación (hora), con las tres réplicas experimentales. Los acuarios 5, 6 y 7 pertenecen al tratamiento a  $28^{\circ}\text{C}$  y los acuarios 8, 9 y 10 pertenecen al tratamiento a  $31^{\circ}\text{C}$ . Además, se incluyen los gráficos E y F con los

resultados del control negativo (Blanco- sin templete) y el control de no-retrotranscripción (adicionando RNA total).

El gen *sl* presentó un Ct (Umbral del Ciclo, por sus siglas en inglés) variable desde el ciclo 14 hasta el 33 (Figs. 17A y B). Estos resultados indican que cada muestra presenta diferentes niveles de expresión del gen. Este resultado no era esperado, ya que al considerarse un gen exógeno proveniente del pez tilapia, debería presentar los mismos niveles de expresión, ya que su expresión no estaba en función de la dinámica a la que fueron sometidos los corales. De esta forma, la constancia en su expresión nos hubiera permitido utilizarlo en forma equivalente a la de un gen constitutivo (Figs. 17A-D).

La variación encontrada en los niveles de *sl*, pudiera asociarse a diferencias en la eficiencia de la extracción utilizando el protocolo del Trizol®, por lo que, para asegurar que en cada extracción se tenga la misma concentración de gen exógeno, se recomienda en un futuro que el gen exógeno sea inyectado durante la resuspensión del pellet, de RNA, cuando se tenga el producto final de la extracción.

La presencia del producto de amplificación observado en la curva de fusión con una temperatura de desnaturalización a los 72 °C se evidenció en la muestra control con un Ct al ciclo 32 (Fig. 17E). En este caso, se especula que el resultado de la amplificación no pertenece al gen *sl*, sino a un producto de contaminación de los cebadores, ya que a la reacción en vez de adicionar templete, se le agregó agua inyectable y por lo tanto, no debió de generar producto.

Finalmente, como era de esperarse el control de no retro-transcripción no presentó amplificación (Fig. 17F). Es importante mencionar que el control previamente descrito nunca debe de presentar amplificación, ya que el RNA del gen exógeno es

‘sintetizado’ en el laboratorio y no puede haber presencia de DNA genómico de tilapia (*Oreochromis sp.*) (Anexo I-5).

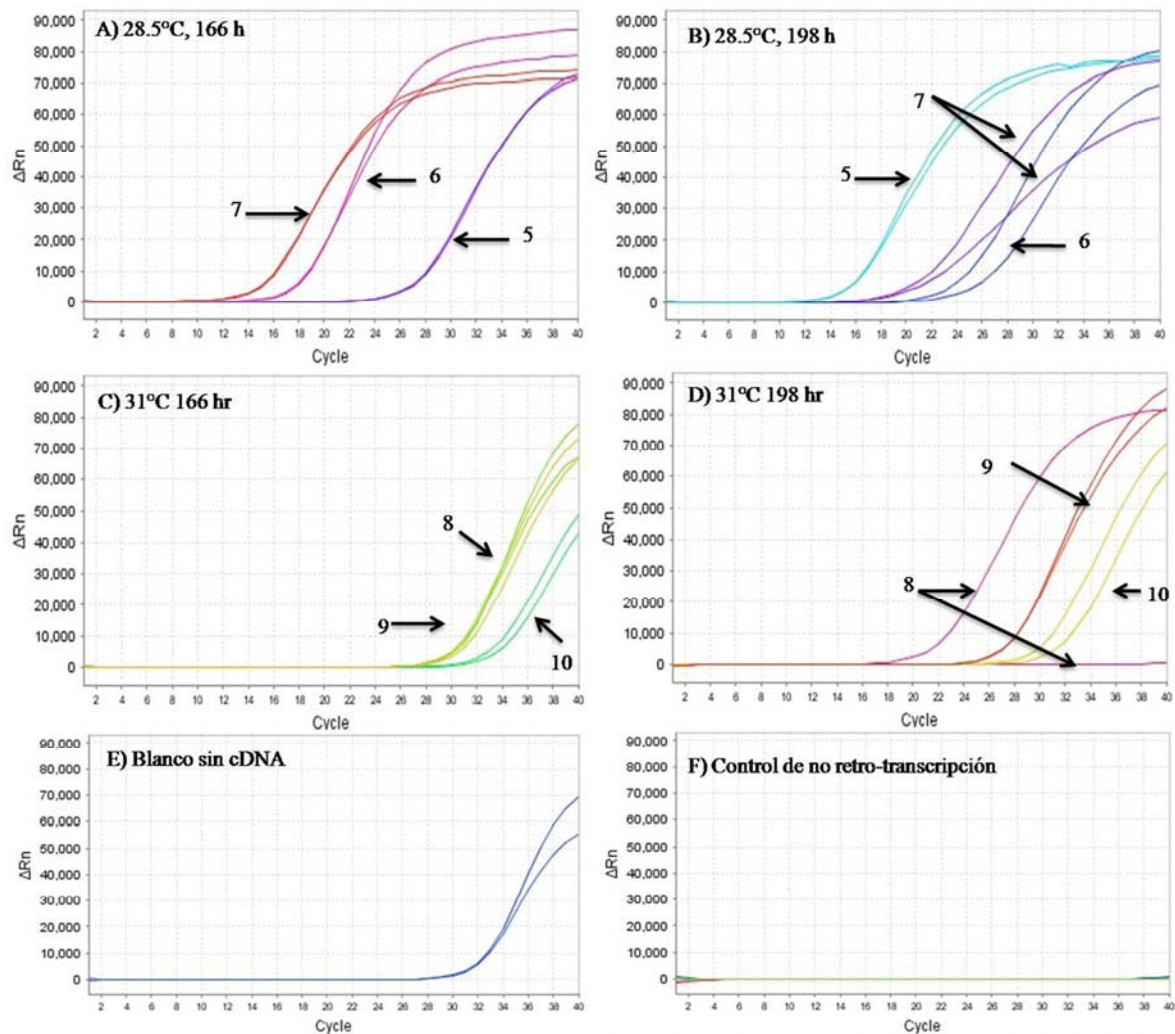


Figura 17. Curvas de amplificación para el gen *sl* incluido como gen exógeno y que fue introducido a partir de la extracción de RNA total de fragmentos del coral *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico experimental. A y B representan dos evaluaciones del tratamiento a 28°C con sus tres réplicas (acuarios 5, 6 y 7); C y D representan las mismas evaluaciones a 31°C con sus tres réplicas (acuarios 8, 9 y 10); E es el control sin cDNA y F) el control de no retro-transcripción. Cada muestra está representada por duplicado.

La razón por la cual no se utilizó ninguno de los genes constitutivos descritos para el género de coral estudiado fue que, diversos autores han demostrado que el incremento en la temperatura tiene efecto en gran parte de los procesos celulares de los corales (Gates y Edmunds, 1999; Mayfield y Gates, 2007). Por ejemplo, se ha encontrado que genes como la actina que son comúnmente utilizados como constitutivos, cambian sus niveles de expresión en los organismos afectados por estrés térmico (Bower *et al.*, 2007). Debido a esto, se ha propuesto la inyección de un gen exógeno como una metodología alternativa con el fin de evitar fluctuaciones en la expresión de los genes ‘constitutivos’ o ‘de referencia’.

Para normalizar la expresión del gen, en este caso la *hsp70*, se deberán probar varios genes de referencia y asegurar que las condiciones experimentales, como incrementos en la temperatura del agua, no afecten sus niveles de expresión. Por ejemplo, Pagarigan y Takabayashi (2008) experimentaron en acuarios con fragmentos de *P. meandrina*, e incrementaron la temperatura y la concentración de nitrógeno del agua. De acuerdo a sus resultados, los autores proponen el uso de 5 genes de referencia (Brn1, 18S rARN,  $\beta$ -actina y EF1 $\alpha$ ) que no cambiaron su expresión en respuesta a las condiciones experimentales. Sin embargo, aunque estos genes fueron usados para un organismo del mismo género de coral utilizado en el presente estudio, sería conveniente normalizar para poder utilizar los genes de referencia en la especie de estudio.

### 3.4.2.3 Evaluación del gen *hsp70*

En la figura 18 se presenta la curva de fusión obtenida para el gen *hsp70*. En el gráfico, se puede observar solamente un pico que corresponde a un sólo producto de amplificación con una temperatura de desnaturalización de  $\sim 78.5^{\circ}\text{C}$ .

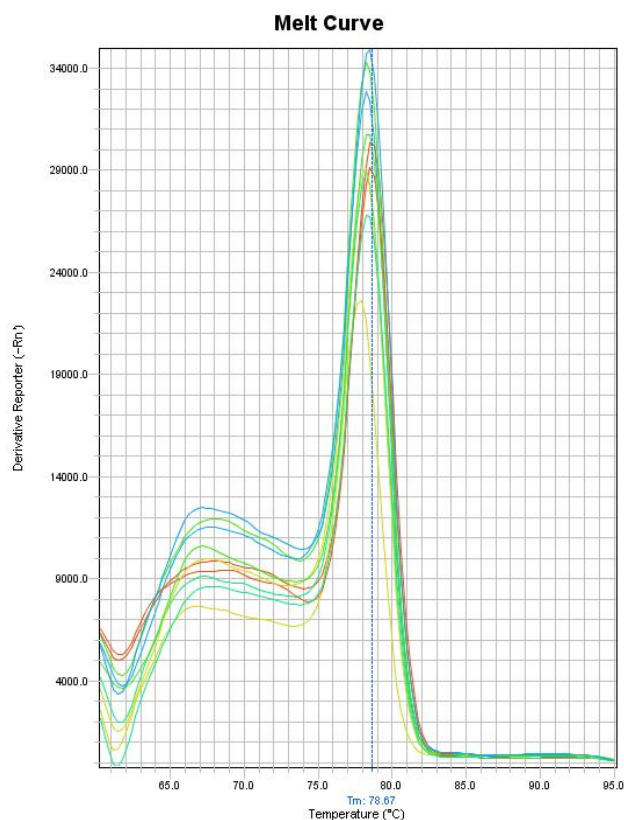


Figura 18. Curva de fusión resultante de la amplificación por PCR tiempo real para el gen *hsp70* a partir de muestras de fragmentos del coral *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico experimental. En la curva se puede observar la presencia de un solo producto con una temperatura de desnaturalización de  $\sim 78.5^{\circ}\text{C}$

Igualmente que para el gen *sl*, para verificar la presencia del gen *hsp70* en las muestras, se amplificó el producto de PCR en un gel de agarosa al 2.5%. En el gel se

evidenció la presencia de la banda que coincide con el tamaño del fragmento esperado (88 pb), y por lo tanto, corresponde al gen esperado (Fig. 19).

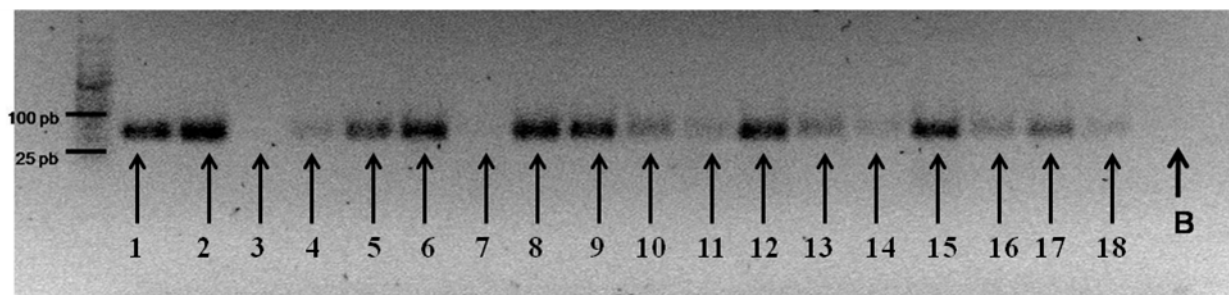


Figura 19. Amplificación del gen *hsp70* (88 pb) a partir del producto de PCR tiempo real. En el gel se observan diferentes muestras del experimento y un control sin cDNA (B). Los carriles 1 al 6 corresponden a los acuarios 5, 6 y 7 a 28.5°C con 166 h de estrés experimental; los carriles 7 al 12 corresponden a los mismos acuarios y temperatura a las 198 horas. Los carriles 13 al 18 corresponden a los acuarios 8, 9 y 10 a las 166 horas con una temperatura de 30.5°C.

Las curvas de amplificación del gen *hsp70* presentadas son equivalentes para cada tiempo y evaluación previamente descritos para el gen *sl*. El gen *hsp70* presentó un Ct variable desde el ciclo 28 (Fig. 20D) hasta el 35 (Fig. 20B y C). Sin embargo, no se encontró una relación aparente entre el Ct y el tratamiento (temperatura) o tiempo de exposición (horas). Además, los valores Ct, se deberían presentar en promedio a partir del ciclo 10 a 15, para ser considerados como variaciones en la expresión; y por lo tanto, un valor Ct igual o superior a 35 ciclos indica que ya no hay más amplificación (Mackay *et al.*, 2002; Wong y Medrano, 2005; Dorak, 2006). En base a lo anterior, las curvas obtenidas en el presente podrían ser un indicativo de una muy baja o nula presencia de *hsp70* en las muestras, sin embargo, estos datos deberán ser rectificadas.

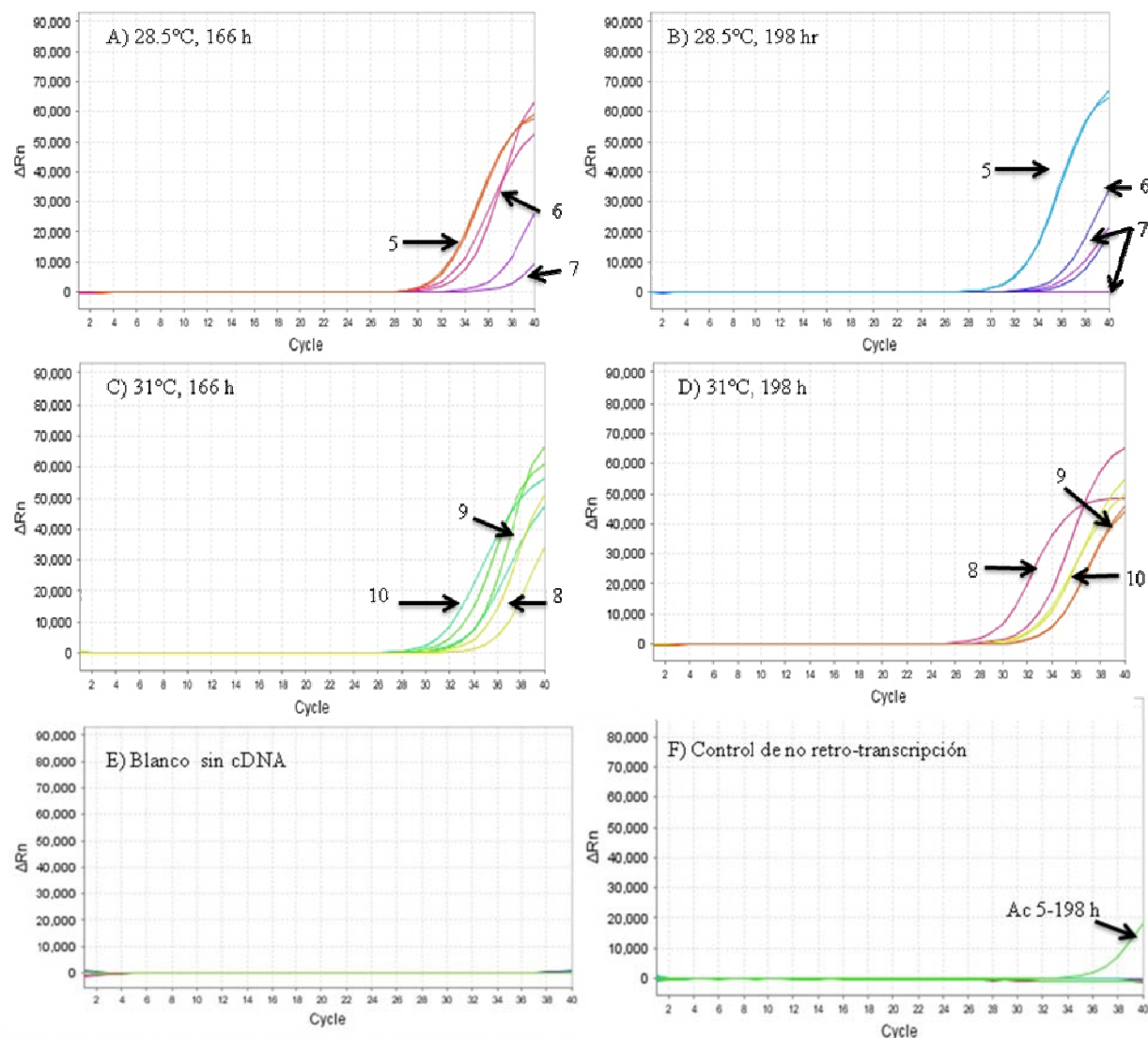


Figura 20. Curvas de amplificación para el gen *hsp70* a partir de la extracción de RNA total de fragmentos del coral *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico experimental. A y B representan dos evaluaciones del tratamiento a 28°C con sus tres réplicas (acuarios 5, 6 y 7); C y D representan las mismas evaluaciones a 31°C con sus tres réplicas (acuarios 8, 9 y 10); E es el control sin cDNA y F el control de no retro-transcripción. Cada muestra está representada por duplicado.

Por otra parte, cuando las muestras fueron corridas en una electroforesis en gel, se observó con claridad la presencia del gen *hsp70* (Fig. 19), con lo cual se demuestra la expresión del gen en la muestra. Wan-Heng *et al.* (2001) encontraron que la presencia de pigmentos en los tejidos produce una baja calidad del RNA pero además, interfiere con la detección de la fluorescencia; por lo tanto, aunque el gen *hsp70* esté expresado en la muestra, la detección por PCR en tiempo real pudo haberse visto afectada por la baja calidad del RNA obtenido así como presencia de los pigmentos fotosintéticos del *Symbiodinium*, que en el presente trabajo no fueron cuantificados.

Estudios previos en invertebrados marinos, han demostrado que el estrés térmico provoca un incremento en los niveles de *hsp70* (Osovitz y Hofmann 2005; Place *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009). Y, dado que valores menores de Ct indican mayores niveles de expresión de la *hsp70*, se esperaría que las muestras provenientes de organismos sometidos a 31 °C (Fig. 20C y D), presentaran en su curva de amplificación un Ct menor que los organismos que se mantuvieron a 28 °C (Fig. 20A y B). Sin embargo, esto no pudo ser corroborado en el presente estudio.

En el gráfico representativo del blanco (sin template) no se observó amplificación (Fig. 20E), por lo que se descarta que los resultados obtenidos hayan estado afectados por la contaminación de algún reactivo. En el caso del control de no retro-transcripción, se observó amplificación solamente en una muestra correspondiente a la evaluación de las 198 horas en el acuario 5, lo cual indica que existió presencia de DNA en el RNA total de esa muestra (Fig. 20F). En este caso, se requiere volver a tratar con DNase el RNA total de la muestra que amplificó y, de nuevo hacer la retro-

transcripción (RT) para obtener nuevamente cDNA pero sin presencia de DNA genómico.

Además, en algunos casos, se observó una alta variación en los valores de Ct entre réplicas correspondientes a una misma muestra (Fig. 20A-C). El PCR en tiempo real es un método muy sensible, y los resultados obtenidos pueden haber sido afectados por diversos factores como son la baja calidad del RNA y la presencia de pigmentos (Fleige y Pfaffl, 2006; Wan-Heng *et al.*, 2001), así como variaciones mínimas, como una falla en la homogeneización de la mezcla, o inclusive, que ésta se haya encontrado fondo del tubo. Por lo tanto, es muy importante extremar precauciones durante la preparación y carga de las muestras al termociclador, con el fin de evitar que los cambios en Ct sean producto de error humano.

En síntesis, los resultados de esta parte requieren ser corroborados nuevamente. Para esto se sugiere primeramente, evaluaciones en periodos de tiempo más cortos, y además un rápido procesamiento de las muestras. Asimismo, sería útil estandarizar más de dos genes de referencia que puedan ser utilizados como constitutivos para esta especie de coral. Esto sería de utilidad para tener la referencia de genes constitutivos y poder normalizar la expresión del *hsp70* y llevar a cabo su cuantificación relativa.

## CAPÍTULO 4. LA UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES PARA LA DETERMINACIÓN DE 'ÁREAS SENSIBLES' AL BLANQUEAMIENTO EN LAS COMUNIDADES CORALINAS DEL PARQUE NACIONAL ISLAS MARIETAS

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente, los eventos de blanqueamiento de corales se han vuelto recurrentes con el calentamiento del planeta (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). Actualmente se han planteado varias hipótesis que explican el proceso de blanqueamiento en los corales (Lesser, 2004); no obstante, existen pocos marcadores que ayuden a predecir la afectación sobre los organismos antes y después de los eventos. Debido a la importancia de estos ecosistemas y al grado de afectación al que han estado sujetos, se han implementado programas de manejo a nivel internacional, tales como la Red Global de Monitoreo de Arrecifes Coralinos (GCRMN por sus siglas en inglés), así como programas de manejo a nivel nacional o regional. En el caso de México, la mayor parte de las áreas arrecifales están administradas por la Comisión Nacional de Áreas Marinas Protegidas (CONANP); órgano gubernamental que se encarga de protegerlas y promover un uso sostenible, donde las actividades humanas como la pesca y el turismo están incluidos con reglamentaciones específicas. En teoría, el estatus de protección de estas áreas, debería reducir el efecto de estrés que produzcan las actividades humanas, ayudando a que el ecosistema tenga menos presión y resista mejor el efecto de estrés provocado por disturbios naturales.

Hasta al momento, los programas de monitoreo en todas las áreas protegidas mexicanas consisten en visitas para observar y evaluar el ecosistema utilizando como

indicadores la abundancia y cobertura, tanto de los corales como de los organismos asociados. En algunos casos, se aplican técnicas de mapeo y uso de imágenes por sensores remotos los cuales son métodos indirectos que evalúan solamente el ecosistema cuando ya ha sufrido el blanqueamiento y cuando está en proceso de recuperación (Alquezar y Boyd, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha utilizado ningún método de diagnóstico o marcadores pro-activos que evalúen continuamente el estado general del ecosistema *in situ* o bien una respuesta temprana al blanqueamiento.

#### **4.2 TEMPERATURA COMO FACTOR DETERMINANTE DE LAS ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS**

En la actualidad, se reconoce que la temperatura es uno de los factores más importantes que determinan actividades como el asentamiento, crecimiento y reproducción de los corales (Coles y Brown, 2003; Stanley, 2003). El efecto de estrés que puede provocar condiciones sub-óptimas de temperatura es específico para cada especie y depende de su localización, ya que se pueden desarrollar límites de tolerancia específicos a nivel local (Glynn, 1996; Brown *et al.*, 2002; D’Croz y Mate, 2004).

El grado de afectación que tenga el estresor sobre el coral depende de la intensidad y el tiempo de exposición (Mayfield y Gates, 2007) y como resultado, el organismo generará diferentes tipos de respuesta como: 1) Resistencia al estresor, que es la capacidad del organismo de soportar disturbios sin presentar pérdidas funcionales o estructurales; 2) aclimatación, donde los corales desarrollan la capacidad de resistir periodos de estrés sin llegar al blanqueamiento y; 3) la adaptación, que ocurre cuando el organismo desarrolla una modificación genética que le ayude a sobrellevar el efecto del

estrés (Coles y Brown, 1993; Done, 1999; Brown *et al.* 2002; D’Croz y Mate, 2004; Kemp *et al.* 2006; Visram y Douglas, 2003). Por otra parte, a nivel de ecosistema, la resiliencia, que está definida como capacidad de recuperación de un disturbio, determinará la supervivencia y desarrollo futuro del coral en el área (Fitt *et al.*, 2001; Douglas, 2003). Las condiciones ambientales que favorecen la resiliencia de una comunidad son diferentes a las que favorecen la resistencia (West y Salm, 2003). Cualquiera de estos dos procesos, conllevan un esfuerzo extra con un alto costo energético, por lo que durante el tiempo que el organismo se encuentre estresado, se inhibirán otros procesos fisiológicos no esenciales como el crecimiento y la reproducción (Szmant y Gassman, 1990; Ward, 1995; Coles y Brown, 2003; West, 2003; Baird, 2008).

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el incremento de temperatura como factor de estrés, ha sido frecuentemente reportada por sus efectos, de inducción al blanqueamiento como respuesta de defensa ante el estrés oxidativo (Downs *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005; Weiss, 2008). Por otro lado, cuando la temperatura en vez de aumentar disminuye drásticamente, los blanqueamientos serán efecto de la reducción o atrofia del sistema fotosintético del simbiote (Saxby *et al.*, 2003; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2005). En ambos casos, el blanqueamiento conllevará a una deficiencia en la cantidad de carbono fijado (nutrientes) que es actividad metabólica diaria del hospedero (Davies, 1984; Douglas, 2003; Baird, 2008).

#### **4.3 INCORPORACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EL DIAGNOSTICO DE ESTRÉS**

Como se mencionó anteriormente, previo al blanqueamiento ocurren alteraciones metabólicas en el organismo. Estas pueden ser ‘cuantificadas’ utilizando marcadores celulares, como la *CuZnSOD* (ver Capítulo 3) o marcadores fisiológicos utilizando la cuantificación de lípidos y la densidad de simbiontes (ver Capítulos 1 y 2).

Los biomarcadores o respuestas fisiológicas, además de ser utilizados como indicadores de estrés ‘natural’, también han sido previamente utilizados para evaluar la influencia de la actividad humana, principalmente por el aporte de desechos y contaminantes en las zonas costeras, donde se desarrollan comunidades coralinas (Downs *et al.*, 2005; Fauth *et al.*, 2006). Con el fin de comprender la respuesta al estrés térmico en las comunidades coralinas, actualmente se está introduciendo el uso de biomarcadores para evaluar el nivel de estrés de los organismos.

Con esta información, además de conocer el estado de salud de las colonias antes y después del blanqueamiento, se pueden generar predicciones de las posibles repuestas que tendrán estas comunidades y sus consecuencias ante futuros eventos ENSO y al cambio climático global.

#### **4.4 PRIMERAS APROXIMACIONES UTILIZANDO *Pocillopora verrucosa* PARA LA DETECCIÓN DE ÁREAS ‘MÁS SENSIBLES’ AL BLANQUEAMIENTO EN EL PACÍFICO MEXICANO**

Las comunidades arrecifales del Pacífico Mexicano son considerados como arrecifes de barrera (Carriquiry *et al.*, 2001) donde el género *Pocillopora* es la especie más abundante; mientras que otros géneros como *Pavona* y *Porites* ocurren en menor

densidad y se distribuyen principalmente en áreas más profundas (Glynn y Leyte-Morales, 1997; Carriquiry y Reyes-Bonilla 1997). Hasta el momento, las comunidades del Pacífico Mexicano han sido caracterizadas con diversos estudios que describen la estructura, composición y abundancia tanto de los corales como de las especies asociadas a ellos, y se llevan a cabo los registros de eventos de blanqueamiento regionales causados principalmente por eventos ENSO (Carriquiry *et al.*, 2001; Reyes-Bonilla, 2001). Como resultado, en algunas de las comunidades se han hecho reportes especiales que ayudan a la identificación de sitios prioritarios para la conservación (López-Pérez y López-García, 2008), que les dan un estatus especial de protección.

La zona costera del Pacífico Mexicano está compuesta por varias comunidades coralinas, una de las más importante está localizada dentro del PNIM (CONANP, 2008). La comunidad coralina dentro de esta región está compuesta principalmente por especies del género *Pocillopora* (Carriquiry y Reyes-Bonilla 1997; Cupul-Magaña *et al.*, 2000). Debido a que este género está ampliamente distribuido en la mayoría de las comunidades coralinas mexicanas (Carriquiry y Reyes-Bonilla, 1997; Glynn y Leyte-Morales, 1997; Cupul-Magaña *et al.*, 2000; Reyes-Bonilla, 2003; López-Pérez y Hernández-Ballesteros, 2004; Reyes-Bonilla *et al.*, 2005) se han elaborado diversos estudios que registran al género *Pocillopora* como el más sensible a eventos de blanqueamiento, pero también como el de mayor índice de recuperación (Carriquiry *et al.*, 2001; Reyes-Bonilla *et al.*, 2002) lo cual puede ser un indicador de éste género es altamente resiliente.

Recientemente un evento de blanqueamiento por frío afectó los corales del PNIM, donde el género *Pocillopora* fue nuevamente el más impactado, sin embargo

también hubo registros de afectación en los géneros *Porites* y *Pavona* (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Este no ha sido un evento totalmente aislado, ya que un blanqueamiento similar fue previamente documentado por LeJennuese *et al.* (2007) al sur de Baja California. Desafortunadamente, no se tomaron registros a microescala del nivel de afectación que tuvo el blanqueamiento. Debido a esto, se han hecho diferentes estudios en la región evaluando la respuesta de la especie *Pocillopora verrucosa* ante eventos de estrés por temperatura a diferentes escalas temporales y espaciales. Los resultados mostraron diferentes respuestas de un biomarcador ante el mismo estresor (ej. incremento en la temperatura del agua), que dependen de la magnitud del cambio de temperatura. Por ejemplo, cambios diarios por influencia de ondas internas en la región (Filonov *et al.*, 1996), provocan una respuesta de incremento en la actividad metabólica en cuestión de horas, lo cual se refleja en un aumento en la cantidad de lípidos totales como respuesta de mitigación de daños celulares (Capítulo 1 del presente trabajo y Rodríguez-Troncoso *et al.*, 2010). Esta respuesta es diferente a lo encontrado ante los eventos de estrés térmico por fluctuaciones anuales en la temperatura, donde resultados obtenidos en el presente estudio han documentado que un incremento de temperatura produce una baja en la cantidad de lípidos (Capítulo 2).

Además, los cambios anuales en la temperatura pueden tener un efecto diferencial dentro de la misma área (Capítulo 2), donde un grupo de colonias (zona sur) presentaron cambios en su densidad de simbiontes y contenido de lípidos a lo largo del año, sin importar la profundidad a la que están distribuidos. Sin embargo, zonas adyacentes (situadas al norte de este sitio), separadas por 50 m aproximadamente, mostraron variaciones asociadas a la profundidad; además, las colonias contenían en

promedio 40% menos lípidos comparados con colonias de la zona sur. Este comportamiento puede ser consecuencia de que estas colonias fueron afectadas por un evento de estrés por frío, resultando las del área norte las más afectadas (Cupul-Magaña y Calderón-Aguilera, 2008). Con estos resultados, se podría inferir que el área norte es más ‘sensible’ y posee menos resistencia a eventos de estrés y además no tiene la misma capacidad de recuperación comparada con la zona sur. Como resultado, se podría sugerir el colocar en un status de mayor protección a esta área específica, para mitigar el efecto de otros factores de estrés externos como las actividades humanas. Con esto se permitiría la recuperación de las colonias coralinas antes de que sean nuevamente afectadas por los eventos de estrés térmico que periódicamente ocurren en la zona.

Existe también la posibilidad de utilizar otros marcadores a nivel celular. Dentro de los estudios realizados en esta región se ha demostrado el incremento en la actividad de la *CuZnSOD* en el hospedero debido al estrés, por efecto del aumento de temperatura (Capítulo 3). Con estos indicadores, es posible llevar a cabo seguimientos en la condición de salud de los corales, tomando en cuenta los niveles normales de cada uno de ellos y comparándolos con los obtenidos antes, durante y después de eventos de blanqueamiento. Esto permitiría tener una evaluación continua de su estado de salud y además, conocer el tiempo de recuperación ante futuros blanqueamientos.

#### **4.5 APLICACIÓN DE LOS RESULTADOS COMO HERRAMIENTA DE MANEJO DENTRO DEL PNIM**

El establecimiento de áreas marinas protegidas genera una serie de acciones y delimitaciones de espacios regulados que ayudan a proteger el ambiente. Sin embargo,

los polígonos que se establecen en la mayoría de los casos ignoran los flujos de energía tales como hábitats ligados, intercambio larval, organismos migratorios o cambios en condiciones oceanográficas que interaccionan directamente con el área protegida (Salm, 1984; Ortiz-Lozano *et al.*, 2007). Estudios en esta región demuestran que el problema de protección debe de ser abordado de manera simultánea, a nivel de micro y de macro escala, así como incluir la respuesta diferencial que puede presentarse en función de la época de muestreo. Esto permitiría integrar un diagnóstico independiente y de forma complementaria a los censos de cobertura, diversidad y blanqueamiento usualmente utilizados. De esta manera, se agregaría una herramienta más a las utilizadas típicamente en el manejo, y permitiría conocer el estado de salud de los corales de la región, así como su capacidad de respuesta ante los diferentes estresores a los que pueden ser sujetos.

Los resultados por las aproximaciones *in situ* y experimentales en el presente estudio, muestran información que pueden describir algunas características de la comunidad coralina de las Islas Marietas.

- ✓ La comunidad coralina presente en el PNIM se encuentra sometida periódicamente a eventos de estrés de corta persistencia, posiblemente debido a las ondas internas, y durante éste periodo las colonias pueden estar más sensibles a los disturbios generados por la actividad antropogénica
- ✓ Dentro de la misma área existen diferencias a micro escala, que promueven respuestas diferenciales de una misma especie a lo largo de la zona. Esta

aclimatación puede, en un futuro, determinar cambios en la abundancia y distribución de la especie en la región.

- ✓ Debido a que el área norte presentó menor resistencia ante las anomalías térmicas, también será menos resiliente en relación a la zona sur durante el periodo de recuperación de los eventos de blanqueamiento

Cabe mencionar que los resultados obtenidos para el PNIM solo pueden ser utilizados para el manejo de esta área, ya que una misma especie puede desarrollar diferentes respuestas al estrés dependiendo de su localización. Esto ha sido demostrado en otros estudios, con organismos como el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Osovitz y Hofmann, 2005). Por lo tanto, debe considerarse que cada comunidad coralina a lo largo del Pacífico Mexicano, difiere no solamente en abundancia y composición de sus organismos (Reyes-Bonilla, 2003), sino en su periodo de actividad reproductiva (Rodríguez-Troncoso, 2006; Chávez-Romo y Reyes Bonilla, 2008; Carpizo-Ituarte, *et al.*, 2010) y en algunos casos su morfología (Veron y Pichon, 1976). Estos cambios en el comportamiento fisiológico son el reflejo de los diferentes sustratos y condiciones oceanográficas que promueven un medio ambiente diferente. Por lo que resulta importante estandarizar estos biomarcadores para las diferentes regiones del Pacífico Mexicano y con esto generar un registro del estado de salud de las comunidades coralinas a nivel local y regional, que pueda ser utilizado en forma equivalente.

En conclusión, sería importante integrar los biomarcadores como una herramienta de uso regular para el manejo de estos ecosistemas, ya que puede ayudar a predecir las afectaciones que tendrán eventos que se presenten con cierta periodicidad como son los

eventos ENSO y el calentamiento global a largo plazo. Asimismo, es importante identificar las áreas que presenten mayor sensibilidad a eventos de estrés y que por lo tanto, necesiten de un estatus especial de protección o de estrategias de manejo diferenciales que ayuden al mejor manejo y conservación de las comunidades coralinas del Pacífico Mexicano.

## CONCLUSIONES

Los datos generados en el presente estudio, nos permiten en su conjunto, entender a diferentes niveles (celular y fisiológico) la resistencia y diferencias en aclimatación regional que presenta la especie *P. verrucosa* en respuesta a la frecuencia e intensidad que tengan los cambios de temperatura en la región del Pacífico Central Mexicano.

Estos resultados, representan una primera medición del efecto que pueden causar las oscilaciones térmicas abruptas a las que se encuentran expuestas las colonias de *P. verrucosa* en la Isla Redonda. A diferencia de otros estudios, este es el primero que registra una respuesta de incremento en la cantidad de lípidos por efecto del choque térmico, la cual es una respuesta interna fisiológica de ‘mitigación de daños’ y es lo que le permite al organismo ‘tolerar’ y mantener sus actividades metabólicas normales cuando se presentan los eventos locales de ondas internas.

La evaluación *in situ* permitió conocer la respuesta diferencial de las colonias ante las fluctuaciones anuales en la temperatura del mar, en función de su distribución a nivel de micro escala dentro de la misma área. Se encontró que la zona norte tiene menor resistencia ante eventos de blanqueamiento, ya que durante los periodos de estrés pierde una mayor cantidad de reservas energéticas, lo que incrementa su vulnerabilidad ante las fluctuaciones naturales de la temperatura en la región.

A diferencia de la respuesta al estrés por incremento abrupto de la temperatura, cuando el organismo sufre de estrés por aumento gradual de la temperatura como puede ser durante eventos ENSO, el hospedero utiliza los lípidos almacenados en su tejido

como fuente energética para mantenerse durante el periodo de estrés y de manera simultánea liberan simbiontes, lo cual dispara el inicio del blanqueamiento.

La liberación de simbiontes por aumento en la temperatura, es resultado del estrés oxidativo que sufre el hospedero. Debido a esto, en el hospedero aumentan los niveles de *CuZnSOD*, con el fin de mitigar los daños que causan el exceso de ROS producidas por el simbionte.

A pesar de no haber evaluado los niveles de expresión de la *hsp70* por efecto del estrés térmico, se obtuvo una amplia experiencia en laboratorio, y se enfatiza la importancia de generar un protocolo estandarizado, desde extracción de RNA hasta genes de referencia, adecuado para el organismo estudiado; las consideraciones y resultados obtenidos en el presente estudio serán utilizados para las aproximaciones futuras.

El uso de marcadores fisiológicos y moleculares como herramientas de monitoreo nos permite conocer el estado general de la comunidades coralinas de la región, Esto también lleva a la posibilidad de llevar un seguimiento de las afectaciones que tendrán eventos de incrementos anómalos en la temperatura ante eventos como el ENSO y, en un futuro, el efecto del cambio climático y acidificación del océano.

Debido a que cada especie esta aclimatada a las condiciones regionales, sería importante elaborar estos estudios a nivel local en las diferentes áreas de distribución de comunidades coralinas a lo largo del Pacífico Mexicano, y conjuntar estos datos para generar un monitoreo continuo de las comunidades arrecifales que componen a toda la región.

## RECOMENDACIONES

Cada uno de los marcadores utilizados en el presente estudio nos dio una aproximación del efecto del estrés a diferentes niveles, por lo que el contar con una mayor cantidad de biomarcadores nos permitirá entender mejor las respuestas observadas. A continuación se mencionan algunas de los aspectos que serían importantes considerar para continuar el estudio.

Los cambios en la cantidad de los lípidos totales permiten evaluar si el organismo está haciendo uso de este recurso energético. Sin embargo, sería importante separar las clases de lípidos para así saber, dependiendo del tipo de estresor, si está haciendo uso de lípidos de almacenaje (triglicéridos), estructurales (fosfolípidos) o de señalización celular (esfingolípidos) y así tener un mayor detalle sobre el efecto del estrés sobre el organismo.

Asimismo, de manera complementaria se podrían medir otras moléculas esenciales como son los carbohidratos. Por ejemplo, al cuantificar la celulosa nos permitiría conocer el nivel de daño a la pared celular de los simbiontes y por otro lado la evaluación del glucógeno nos dará aproximaciones sobre el uso de energía por parte de ambos organismos.

Para diferenciar algunas respuestas de estrés, en el presente estudio se utilizó la *CuZnSOD* para cuantificar el efecto del estrés térmico solamente sobre el hospedero, sin embargo, sería importante hacer la misma aproximación teniendo la respuesta de ambos organismos cuantificando la *FeSOD* ya que se encuentra solamente en el simbiote. Asimismo, la *hsp70* a pesar de ser altamente conservada tiene sitios con secuencias diferentes entre hospedero y simbiote como son la *hspChl* que es específica del alga

nos permitiría saber de manera individual el efecto del estrés sobre el hospedero y el simbiote.

La aclimatación diferencial de la especie en diferentes regiones puede estar dada por diferencias en el clado del simbiote asociado, por lo que sería importante llevar a cabo la identificación de clados y compararlas dentro y entre diferentes áreas. Los datos obtenidos podrían explicar parcialmente las diferencias en la capacidad de resistencia que tiene la especie de manera local.

Tomando en cuenta que las anomalías térmicas en los últimos años no son solamente de aumentos, sino también se han registrado disminuciones drásticas en la temperatura, es importante hacer este tipo de aproximaciones experimentales con un intervalo amplio de temperatura, que permita generar aproximaciones sobre la susceptibilidad al blanqueamiento (resistencia) de los corales, así como su capacidad de recuperación (resiliencia) ante eventos futuros de anomalías térmicas.

## LITERATURA CITADA

- Alquezar R, Boyd W (2007) Development of rapid, cost effective coral survey techniques: tools for management and conservation planning. *J Coast Conserv* 11, 105-119
- Anthony KRN, Connolly SR, Hoegh-Guldberg O (2007) Bleaching, energetic, and coral mortality risk: Effects of temperature, light and sediment regime. *Limnol Oceanogr* 52, 716-726
- Bachar A, Achituv Y, Pasternak Z, Dubinsky Z (2007) Autotrophy versus heterotrophy: The origin of carbon determines its fate in a symbiotic sea anemone. *Jour Exp Mar Biol Ecol* 349, 295-298
- Baird AH, Bhagooli R, Ralph P, Takahashi S (2008) Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 16-20
- Black NA, Voellmy R, Szmant AM (1995) Heat shock protein induction in *Montastrea favoelata* and *Aiptasia pallida* exposed to elevated temperatures. *Biol Bull* 188, 234-240
- Borell EM, Yuliantri AR, Bishof K, Richter C (2008) The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 364, 116-123
- Bower NI, Moser RJ, Hill JR, Lehnert SA (2007) Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of pre-implantation embryos. *BioTechniques* 42, 199-206
- Bromage E, Carpenter L, Kaattari S, Patterson M (2009) Quantification of coral heat shock proteins from individual coral polyps. *Mar Ecol Prog Ser* 376, 123-132
- Brown BE, Downs CA, Dunne RP, Gibb SW (2002) Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Mar Ecol Prog Ser* 242, 119-129
- Carpizo-Ituarte E, Vizcaíno-Ochoa V, Chi Barragan G, Tapia-Vázquez O, Cupul-Magaña AL, Medina-Rosas P (2010) Reproductive cycle of the hermatypic corals *Pocillopora damicornis*, *Porites panamensis* and *Pavona gigantea* at Bahía de Banderas, Mexican Pacific. *Ciencias Marinas In press*
- Carriquiry JD, Reyes-Bonilla H (1997) Community structure and geographic distribution of the coral reefs of Nayarit, Mexican Pacific. *Ciencias Marinas* 23, 227-248
- Carriquiry JD, Cupul-Magaña AL, Rodriguez-Zaragoza F, Medina-Rosas P (2001) Coral bleaching and mortality in the Mexican Pacific during the 1997-98 El Niño and prediction from a remote sensing approach. *Bull Mar Sci* 69, 237-249
- Coles SL, Brown BE (2003) Coral bleaching- capacity for acclimatization and adaptation. *Adv Mar Biol* 46, 183-223

- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas –CONANP- (2008) Programa de Conservación y Manejo: Parque Nacional Islas Marietas. México. 129 p
- Cupul-Magaña A, Aranda-Mena S, Medina-Rosas P, Vizcaíno-Ochoa V (2000) Comunidades coralinas de las Islas Marietas, Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit, México. *Mexicoa* 2,15-21
- Cupul-Magaña A (2008) Estructura ecológica y patrones de colonización en las comunidades coralinas y arrecifes de la región de Bahía Banderas, costa Sur e Islas de Nayarit. PhD dissertation. Universidad Autónoma de Nayarit, México 124 pp
- Cupul-Magaña A, Calderón-Aguilera L (2008) Cold water bleaching at Islas Marietas National Park, Nayarit, México. 15to Congreso Nacional de Oceanografía, Veracruz, México
- Choresh O, Ron E, Loya Y (2001) The 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) of the Sea anemone *Anemonia viridis*: a potential warning system for environmental changes. *Mar Biotech* 3, 501-508
- D’Croz L, Maté JL (2004) Experimental responses to elevated water temperature in genotypes of the reef coral *Pocillopora damicornis* from upwelling and non-upwelling environments in Panama. *Coral Reefs* 23, 473-483
- Davies SP (1984) The Role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* 2, 181-186
- De Maio A (1999) Heat Shock proteins: facts, thoughts and dreams. *Shock* 11, 1-12
- Desalvo MK, Voolstra CR, Sunagawa S, Shwarz A, Stillman JH, Coffroth MA, Szman AM, Medina M (2008) Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastrea faveolata*. *Molecular Ecology* 17, 3952-3971
- Done TJ (1999) Coral community adaptability to environmental change at the scales of regions, reefs and reef zones. *Amer Zool* 39, 66-79
- Donnell MJ, Hammond LaTM, Hofmann GE (2009) Predicted impact of ocean acidification on marine invertebrate: elevated CO<sub>2</sub> alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Mar Biol* 156, 439-446
- Douglas AE (2003) Coral Bleaching – how and why? *Mar Poll Bull* 46, 385-392
- Downs CA, Muller E, Philips S, Fauth JE, Woodley ChM (2000) A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastrea faveolata*) during heat stress. *Mar Biotechnol* 3, 533-544
- Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemmis J, Woodley ChM (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 533-543

- Downs CA, Fauth JE, Robinson ChE, Curry R, Lanzendorf B, Halas JC, Halas J, Woodley ChM (2005) Cellular diagnosis and coral health: Declining coral health in the Florida Keys. *Mar Poll Bull* 51, 558-569
- Dorak MT (2006) Real-Time PCR. New York: Taylor and Francis Group. <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>
- Edmunds PJ (2009) Effect of acclimatization to low temperature and reduced light on the response of reef corals to elevated temperature. *Mar Biol* 156: 1797-1808
- Edge S, Morgan MB, Snell TW (2008) Temporal analysis of gene expression in a field population of the Scleractinian coral *Montastrea faveolata*. *J Exp Mar Biol Ecol* 355, 114-124
- Fauth JE, Dustan P, Ponte E, Banks K, Vargas-Angel B, Downs CA (2006) Final report: southeast Florida coral biomarker local action study. 69 pp
- Feder ME (1999) Organismal, ecological and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: Established conclusions and unresolved issues. *Amer Zool* 39, 857-864
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-282
- Feeley RA, Sabine ChL, Lee K, Berelson W, Kleypass J, Fabry VJ, Milero F (2004) Impact of Anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> System in the Oceans. *Science* 305, 362-366
- Filonov A, Monzon C, Tereshchenko I (1996) On the conditions of internal tide wave generation along the west coast of Mexico. *Cienc Mar* 22, 255-272
- Fitt WK, McFarland FK, Warner ME, Chilcoat GC (2000) Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanog* 45, 677-685
- Fitt WK, Brown B, Warner ME, Dunne RP (2001) Coral Bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs* 20, 51-65
- Fitt WK, Gates RD, Hoegh-Guldberg O, Bythell JC, Jatkar A, Grottoli AG, Gomez M, Fisher P, LaJuenesse TC, Pantos O, Iglesias-Prieto R, Franklin DJ, Rodrigues LJ, Torregiani JM, van Woesik R, Lesser MP (2009) Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term stress: the host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching. *J Exp Mar Biol Ecol* 373, 102-110
- Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 126-139

- Flores-Ramirez LA, Liñán-Cabello MA (2007) Relationships among thermal stress, bleaching and oxidative damage in the hermatypic coral, *Pocillopora capitata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 194-202
- Folch JLM (1957) Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journ. Biol. Chem.* 226, 497-506
- Frade PR, Bongaerts P, Winkelhagen AJS, Tonk J, Bak RPM (2008) In situ photobiology of corals over large depth ranges: A multivariate analysis on the roles of environment, host, and algal symbiont. *Limnol Oceanog* 53, 1-14
- Furla P, Allemand D, Shick M, Ferrier-Pages Ch, Richier S, Plantivaux A, M PL, Tambutte S (2005) The Symbiotic Anthozoan: A physiological chimera between alga and animal. *Integr Comp Biol* 45, 595-604
- Gates RD, Edmunds PJ (1999) The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. *Amer Zool* 39, 30-43
- Gates RD, Baghdasarian G, Muscatine L (1992) Temperature stress causes host cell detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for coral bleaching. *Biol Bull* 182, 324-332
- Giglio S, Monis PT, Saint CP (2003) Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 31, e136
- Glynn PW, Pérez M, Gilchrist SL (1985) Lipid decline in stressed corals and their crustacean symbionts. *Biol. Bull.* 168, 274-284
- Glynn PW (1996) Coral reef bleaching: facts, hypotheses and implications. *Global Change Biology* 2, 495-509
- Glynn PW, Leyte-Morales GE (1997) Coral reefs of Huatulco, West Mexico: reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec. *Rev Biol Trop* 45: 1033-1047
- Glynn PW, Ault JS (2000) A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral Reefs* 19, 1-23
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Juarez C (2004) Lipids and stable carbon isotopes in two species of Hawaiian corals *Porites compressa* and *Montipora verrucosa*, following a bleaching event. *Mar Biol* 145, 621-631
- Harland A, Navarro J, Davies S, Fixter L (1993) Lipids of some Caribbean and Red Sea corals: total lipid, wax esters, triglycerides and fatty acids. *Mar Biol* 117, 113-117
- Hayes R, King CM (1995) Induction of 70-kD heat shock protein in scleractinian coral by elevated temperature: significance for coral bleaching. *Mol Mar Biol Biotech* 4, 36-42
- Hawkrigde JM, Pipe BK, Brown BE (2000) Localization of antioxidant enzymes in the cnidarians *Anemonia viridis* and *Goniopora sotkesi*. *Mar Biol* 137, 1-9

- Hernández-Urraca V, López-Pérez A (2009) Determinación de lípidos totales, pigmentos y densidad de zooxantelas en colonias de Pocillopora damicornis (Linnaeus) en Bahías de Huatulco. 5to Congreso Nacional de Arrecifes Coralinos
- Hoegh-Guldberg O, Fine M, Skirving W, Johnstone R, Dove S, Strong A (2005) Coral bleaching following wintry weather. *Limnol Oceanogr* 50, 265-271
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten J, teneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bardbury RH, Dubi A, Hatzios ME (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318, 1737-1742
- Hofmann GE, Somero GN (1996) Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: Evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar Biol* 126, 65-75
- Hofmann GE (2005) Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organism on small to large biogeographic scales. *Integr Comp Biol* 45, 247-255
- Hochacka PW, Somero GN (2002) Biochemical Adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. Cap 7: Temperature, Oxford EUA p. 290-449
- Jones R, Yellowlees D (1997) Regulation and control of intracellular algae (=zooxanthellae) in hard corals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B* 352, 457-468
- Jones R (2008) Coral bleaching, bleaching-induced mortality, and the adaptative significance of the bleaching response. *Mar Biol* 154, 65-80
- Kemp DW, Cook CB, LaJeunesse TC, Brokks R (2006) A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. *J Exp Mar Biol Ecol* 335, 266-276
- Kleypas JA, Buddemeir RW, Gattuso JP (2001) The future of coral reefs in an age of global change. *Int J Earth Sciences* 90, 426-437
- Krebs RA, Feder ME, Lee J (1998) Heritability of expression of the 70-kD heat-shock protein in *Drosophila melanogaster* and its relevance to the evolution of thermotolerance. *Evolution* 52, 841-847
- LaJeunesse TC, Reyes-Bonilla H, Warner ME (2007) Spring 'bleaching' among *Pocillopora* in the Sea of Cortez, Eastern Pacific. *Coral Reefs* 26, 265-270
- Lee-shing F, Shiao-Ping H, Ku-Lin L (1997) High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. *Coral Reefs* 16, 127-131.
- Leichter JJ, Helmuth B, Fischer AM (2006) Variation beneath the surface: Quantifying complex thermal environments on coral reefs in the Caribbean, Bahamas and Florida. *Journ Mar Res* 64, 563-588

- Lesser MP (2006) Oxidative stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-268
- Liñán-Cabello MA, Flores-Ramírez LA, Cobo-Díaz JF, Zenteno-Savin T, Olguín-Monroy O, Sosa-Avalos R, Patiño-Barragan M, Olivos-Ortiz A (2009) Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. *Mar Ecol DOI* 10.1111/j.1439-0485.2009.00349.x
- Liñán-Cabello MA, Flores-Ramírez LA, Cobo-Díaz JF, Zenteno-Savin T, Olguín-Monroy O, Olivos-Ortiz A, Tintos-Gómez A (2010) Response to short term ultraviolet stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Rev Biol Trop* 58, 103-118
- Logan BA, Kornyejev D, Hardison J, 1Scott AH (1996) The role of antioxidants enzymes in photoprotection. *Photosynthesis research* 88, 119-132
- López-Pérez A, Hernández-Ballesteros LM (2004) Coral community structure and dynamics in the Huatulco area, western Mexico. *Bull Mar Sci* 75, 453-472
- López-Pérez A, López-García A (2008) Identification of priority conservation sites for reefs building corals in Oaxaca State, Mexico. *Hidrobiológica* 18, 239-249
- Mayfield AB, Gates RD (2007) Osmoregulation in anthozoan-dinoflagellate symbiosis. *Comp Biochemistry and Physiology, Part A* 147, 1-10
- Mayfield AB, Hirst MB, Gates RD (2009) Gene expression normalization in a dual-compartment system: a real-time quantitative polymerase chain reaction protocol for symbiotic anthozoans. *Molecular Ecology Resources* 9, 462-470
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acid Research* 30, 1292-1305
- Middlebrook O, Hoegh-Guldberg O, Leggat W (2008) The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. *Journ Exp Biol* 211, 1050-1056
- Moya AC, Ferrier-Pagès P, Furla P, Richier S, Tambuttè E, Allemand D, Tambuttè S (2008) Calcification and associated physiological parameters during a stress event in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Comp Bioch Physiol Part A* 151, 29-36
- Muscatine, L, LR McCloskey, RE Marian (1981) Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.* 26, 601-611
- NanoDrop Technologies (2007) Technical Support Bulletin T0009. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)

- Orr, JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar R, Plattner G, Rodgers KB, Sabine Ch, Sarmiento J, Schlitzer R, Slater R, Totterdell I, Weirig M, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*. 437, 681-686
- Ortiz-Lozano L, Espejel I, Granados-Barba A, Arceo P (2007) A functional and integrated approach of methods for the management of protected marine areas in the Mexican Coastal Zone. *Ocean & Coastal Management* 50, 379-391
- Osovitz ChJ, Hofmann GE (2005) Thermal history-dependent expression of the hsp70 gene in purple sea urchins: biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. *J Exp Mar Biol Ecol* 327, 134-143
- Pagarigan J, Takabatyashi M (2008) Reference gene selection for qRT-PCR analysis of the Hawaiian coral *Pocillopora meandrina* subjected to elevated levels of temperature and nutrient. Proc 11<sup>th</sup> Int Coral Reef Symp Ft. Lauderdale, Florida, Session number 06
- Pal Yu B (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74, 139-162
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496
- Patton JS, Abraham S, Benson AA (1977) Lipogenesis in the Intact Coral *Pocillopora capitata* and Its Isolated Zooxanthellae: Evidence for a Light-Driven Carbon Cycle between Symbiont and Host. *Mar Biol* 44, 235-247
- Pelejero C, Calvo E, Hoegh-Guldberg O (2010) Paleo-perspectives on ocean acidification. *TREE* doi: 10.1016/j.tree.2010.02.002
- Piggot AM, Fouke BW, Sivaguru M, Sanford RA, Gaskins HR (2009) Change in zooxanthellae and mucocyte tissue density as an adaptative response to environmental stress by the coral *Montastrea annularis*. *Mar Biol* 156, 2379-2389
- Place SP, O'Donnell MJ, Hofmann GE (2008) Gene expression in the intertidal mussel *Mytilus californianus*: physiological response to environmental factors on a biogeographic scale. *Mar Ecol Prog Ser* 356, 1-14
- Reyes-Bonilla H (2001) Effects of the 1997-98 El Niño-Southern Oscillation on coral communities of the Gulf of California, Mexico. *Bull Mar Sci* 69, 251-266
- Reyes-Bonilla H, Carriquiry JD, Leyte-Morales GE, Cupul- Magaña AL (2002) Effects of the El Niño - Southern Oscillation and the anti El Niño event (1997-1999) on coral reefs of the western coast of Mexico. *Coral Reefs* 21, 368-372
- Reyes-Bonilla H (2003) Coral Reefs of the Pacific coast of Mexico. In: Cortes J (ed) *Latin American Coral Reefs*. Elsevier, EUA p 331-349

- Reyes-Bonilla H, Calderón- Aguilera LE, Cruz-Piñón G, Medina Rosas P, López-Pérez RA, Herrero-Pérezrul MD, Leyte-Morales GE, Cupul Magaña AL, Carriquiry-Beltrán JD (2005) Atlas de los corales pétreos (Anthozoa: scleractinia) del Pacífico Mexicano. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de Guadalajara / Centro Universitario de la Costa, Universidad del Mar, México 128 pp
- Richier S, Cottalorda JM, Guillaume M, Fernandez C, Allemand D, Furla P (2008) Depth-dependant response to light of the reef building coral, *Pocillopora verrucosa*: Implication of oxidative stress. *Jour Exp Mar Biol Ecol* 357, 48-56
- Richier S, Merle PL, Furla P, Pigozzi D, Sola F, Allemand D (2003) Characterization of superoxide dismutases in anoxia- and hiperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. *Bioch Bioph Acta* 1621, 84-91
- Rodrigues LJ, Grottoli AG (2007) Energy reserves and metabolism as indicators of coral recovery from bleaching. *Limnol Oceanogr* 52, 1874-1882
- Rodrigues LJ, Grottoli AG, Pease TK (2008) Lipid class composition of bleached and recovering *Porites compressa* Dana, 846 and *Montiopora capitata* Dana, 1846 corals from Hawaii. *J Exp Mar Biol Ecol* 358, 136-143
- Rodríguez-Troncoso, AP (2006) Ciclo reproductivo de tres especies formadoras de arrecife en bahía La Entrega, Oaxaca, México. Masters dissertation. Universidad Autónoma de Baja California. 117 pp
- Rodríguez-Troncoso AP, Carpizo-Ituarte E, Cupul-Magaña A (2010) Response to sudden increases in temperature (thermal shock) under laboratory conditions in the coral *Pocillopora verrucosa*. *Ciencias Marinas* 36, 91-98
- Rossi S, Snyder MJ, Gilli JM (2006) Protein, carbohydrate, lipid concentrations and HSP70-HSP90 (stress protein) expression over an annual cycle: useful tools to detect feeding constraints in a benthic suspension feeder. *Helgol Mar Res* 60, 7-17
- Salm RV (1984) Ecological boundaries for coral-reef reserves: principles and guidelines. *Environ Conserv* 11, 209-215
- Saxby T, Dennison WC, Hoegh-Gulberg O (2003) Photosynthetic responses of the coral *Montiopora digitata* to cold water temperature stress. *Mar Ecol Prog Ser* 248, 85-97
- Sharp VA, Brown BE, Miller D (1997) Heat Shock Protein (HSP 70) expression in the Tropical Reef Coral *Goniopora djiboutiensis*. *J Therm. Biol* 22, 11-19
- Smith DJ, Sugget DJ, Baker NR (2005) Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology* 11, 1-11

- Somero, GN (2005) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integ and Comp Biol* 42, 780-789
- Stanley GD (2003) The evolution of modern corals and their early story. *Earth-Science Reviews* 60, 195-225
- Stat M, Loh WKW, Hoegh-Guldberg O, Carter DA (2008) Symbiont acquisition strategy drives host-symbiont associations in the southern Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 27, 763-772
- Stimson J (1997) The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *J Exp Mar Biol Ecol* 214, 35-48
- Szmant AM, Gassman NJ (1990) The effects of prolonged 'bleaching' in the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. *Coral Reefs* 8, 217-224
- Veron JEN, Hoegh-Guldberg O, Lenton TM, Lough JM, Obura DO, Pearce-Kelly P, Sheppard CRC, Spalding M, Stafford-Smith MG, Rogers AD (2009) The coral reef crisis: The critical importance of <350 ppm CO<sub>2</sub>. *Mar Poll Bull* 58, 1428-1436
- Vidal-Dupoil, J, Adjeroud, Roger E, Foure L, Duval D, Mone Y, Ferrier-Pages Ch, Tambutte E, Tambutee S, Zoccola D, Allemand D, Mitta G (2010) Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC physiology* doi:10.1186/1472-6793-9-14
- Visram S, Douglas A (2007) Resilience and acclimation to bleaching stressors in the scleractinian coral *Porites cylindrica*. *J Exp Mar Biol Ecol* 349: 35-44
- Veron JEN, Pichon M (1976) Scleractinia of Eastern Australia Part I. Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae y Pocilloporidae. *Aust Int Mar Monog Ser. Vol 1*, 56 pp.
- Ward S (1995) The effect of damage on the growth, reproduction and storage of lipids in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *J Exp Mar Biol Ecol* 187, 193-206
- Weis VM (2008) Cellular mechanism of cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211, 3059-3066
- Welch WJ (1993) Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles I normal and stressed cells. *Phil. Trans. R. Soc Lond* 339, 327-333
- West JM, Salm RY (2003) Resistance and Resilience to Coral bleaching: Implications for Coral Reef Conservation and Management. *Conservation Biology* 17, 956-967
- Winters G, Beer S, Brickner I, Loya Y (2009) Spatial and temporal photoacclimation of *Stylophora pistillata*: zooxanthella size, pigmentation, location and clade. *Mar Ecol Prog Ser* 384, 107-119

- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85
- Yakovelva I, Bhagooli R, Takemura A, Hidaka M (2004) Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Com Biochem Phy Part. B* 139, 721-730.
- Yellowlees D, Rees TAV, Leggat W (2008) metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell and Environment* 31, 679-694
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biology & Medicine* 33, 337-349

## ANEXO I. PROTOCOLOS DE LABORATORIO

### 1. PREPARACIÓN DE RNA-LATER

(Rodríguez-Troncoso A. P y R. Pedrin-Caballero, 2009)

**Introducción.** Receta para preparación de 1 litro de solución de RNA-later. Esta solución sirve para preservar la integridad del RNA en los tejidos.

#### **Reactivos necesarios**

EDTA disodio dihidratado 0.5 M pH 8.0  
18.61g EDTA disodio dihidratado  
100 ml Agua destilada

Sodium citrate Trisodium (dihidratado) 1M  
29.4 g SCT  
100 ml de agua destilada

Sulfato de Amonio 700 g  
Agua Destilada 935 ml  
DEPC 1 ml

#### **Procedimiento**

1. Vaciar en 935 ml de agua destilada los 700 g de sulfato de amonio. Tenerlo en agitación constante y con calor (temperatura baja) hasta que se disuelva.
2. Agregar 40 ml de EDTA 0.5 M y 25 ml de Citrato de sodio.
3. Mezclar durante algunos minutos a temperatura baja.
4. Dejar enfriar y ajustar el pH a 5.2 con  $H_2SO_4$  1M
5. Transferir a una botella con tapa
6. Agregar 1 ml de DEPC, agitar y dejar en reposo durante 18 horas
7. Esterilizar
8. Dejar enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

#### **Notas:**

- Después de esterilizar, NO debes observar ningún tipo de precipitado, de ser así, la solución no es estable y no puede ser utilizada.
- Se recomienda que antes de su uso, se haga una prueba fijando cualquier tejido, y haciendo una extracción a los tres o cuatro días después de haberse almacenado, con el fin de evaluar la calidad de la solución.

## 2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE TEJIDO DE CORAL (Modificado de Folch *et al.*, 1957 por Rodríguez-Troncoso, 2009)

**Introducción.** Protocolo diseñado para extracción de lípidos totales de fragmentos de coral fijados en formalina al 10% a temperatura ambiente.

### **Procedimiento:**

1. Descalcificar con solución de ácido acético al 10%
  - El tejido tarda de 2-4 horas en descalcificar, debe de monitorearse continuamente para que no se lastime el tejido.
2. Enjuagar tejido con agua destilada
  - Se dividirá en la cantidad de extracciones que se hagan
  - Para la extracción dividiendo coral/simbionte se utilizan dos trozos para 1 registro
3. Etiquetar y pesar un tubo plástico de 2.0 ml por cada muestra a elaborar (peso tubo limpio)
4. Colocar el tejido en el tubo y pesarlo (peso tubo c/ tej húmedo)
5. Si se separaran coral de simbionte:
  - Pesar y etiquetar dos tubos
  - Colocar en uno el tejido completo
  - Añadir al tubo 1.0 ml de agua de mar filtrada
  - Homogeneizar por 30 seg a 1,000 rpm
  - Centrifugar por 3 min a 5,000 rpm a temperatura ambiente
  - Pasar el sobrenadante al otro tubo limpio
  - Pesar los tubos (peso tubo c/tej húmedo)
6. Dejar secar el tejido en la estufa a 60 °C durante 18 horas
7. Pesar el tubo (peso tubo c/tej seco)
8. Agregar 1 ml cloroformo: metanol (2:1)
9. Dejar durante 2-3 horas
10. Macerar la muestra
11. Agregar 333 µl de KCl 0.8% y agitar en vortex
12. Descartar fase superior
13. Lavar dos veces agregando 500 µl de metanol : agua (1:1)
14. Descartar fase superior
15. Filtrar y pasar a un tubo limpio previamente pesado y etiquetado
  - El filtro a utilizar puede ser filtro para café
16. Evaporar el sobrenadante a 50°C (el tiempo varía dependiendo del método de evaporación)
17. Secar por 12 horas a 60°C en estufa.
18. Pesar el tubo (peso tubo lípidos)



### 3. EXTRACCIÓN DE RNA

(Modificado de Mayfield *et al.*, 2009 por Rodríguez-Troncoso, 2010)

**Introducción.** Protocolo diseñado para extracción de RNA de un fragmento de coral de aproximadamente 0.5cm<sup>2</sup> (dependiendo si es un coral masivo o ramificado pueden cambiar las dimensiones).

#### **Procedimiento:**

1. Adicionar a la muestra (máximo 500 mg de tejido) 500 µl de Trizol® + 5 µl de RNA del gen exógeno (en este caso, se utilizó el gen somatolactina [SL] con una concentración de 5 pg/ µl)
2. Macerar en mortero. Al finalizar de moler, adicionar los otros 500 µl de Trizol®
3. Recuperar el macerado con el trizol y colocarlo en un tubo limpio. Incubar 5 min a temperatura ambiente
4. Anadir 200 µl de cloroformo y agitar. Incubar por tres minutos a temperatura ambiente
5. Centrifugar por 15 min a 12,000 rpm a 4°C
6. Recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio
8. Agregar 250 µl de isopropanol + 250 µl de solución precipitadora (0.8 M citrato de sodio, 1.2M NaCl)
9. Reposar por 10 minutos
10. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm a 4°C
11. Eliminar sobrenadante
12. Anadir 1 ml de etanol 75%
13. Centrifugar por 5 min a 7,500 rpm a 4°C
14. Eliminar el etanol restante
15. Dejar secar por 15 minutos a temperatura ambiente
16. Resuspender en agua tratada en DEPC (aprox. 40 µl pero puede cambiar)
  - Se calienta el agua a 60°C por 15 minutos antes de su uso para que se diluya mejor el pellet
17. Cuantificar
18. Analizar en gel de agarosa
19. Almacenar a -80°C

#### 4. OBTENCIÓN DE GEN EXÓGENO (*sl*-SOMATOLACTINA) (Modificado de Mayfield *et al.*, 2009 por Rodríguez-Troncoso, 2010)

**Introducción.** Protocolo diseñado para la obtención y purificación del RNA mensajero del gen exógeno somatolactina aislado de *Tilapia sp.* Para el presente protocolo se tiene previamente el gen de interés aislado y la secuencia descrita.

##### **Procedimiento.**

1. Digestión del Plásmido (SPE1 Promega R6591)
  - El gen fue previamente clonado en el vector pGEM-T® (Promega)
  - La digestión se hizo de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor
  - El producto final de DNA se analizó en un gel de agarosa al 3% y se almacenó en tubos de 1.6 µl a una temperatura de -20 °C
2. Transcripción con Promoter T7® (Bioline BIO-21072)
  - Debido a que se tiene el fragmento de ADN y para el PCR es necesario tener el mensajero del RNA se hace una transcripción.
  - Para la elección del kit a utilizar se debe rectificar el promotor que tiene el vector en el que fue clonada la secuencia
3. Tratamiento con DNAasa (Ambion AM2222)
  - Se elaboró de acuerdo al protocolo del proveedor
4. Purificación del producto  
Al producto tratado con DNAasa se le agrega:
  - 2 µl de Pellet Paint® (Novagen 70748-3)
  - 4 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2
  - 1 ml de Isopropanol
  - Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
  - Centrifugar 12,000 x g por 10 minutos 4 °C
  - Lavar dos veces con 500 µl de etanol 75%
  - Diluir en 20 µl de agua inyectable
5. Adición de Poly (A) (Ambion AM1350)
  - La reacción se hizo de acuerdo al protocolo del proveedor para 20 µl de producto con un volumen final de 97 µl
  - Añadir 3 µl de E-Pap (Ambion)
  - Incubar a 37 °C x 1 hora
  - Incubar en hielo x 10 minutos
6. Purificación final del producto con RNAaqueous® (Ambion AM1912)
  - La purificación se hizo de acuerdo al protocolo del proveedor
  - El pellet lavado se resuspendió en 40 µl de elute solution (parte del kit)
7. Cuantificación del producto en el Nanodrop®
8. Separación de alícuotas del producto para tener una concentración de 5pg/ µl
9. Almacenamiento a -80 °C hasta ser utilizado

## 5. EXTRACCIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

(Utilizando kit de extracción de Byoxytech® SOD-525)

**Introducción.** Protocolo diseminado para la extracción de la proteína CuZnSOD utilizando el kit Byoxytech® SOD-525 (Oxis Research) a partir de fragmentos de un fragmento de coral hermatípico de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

### Procedimiento

1. Eliminar el exceso de RNAlater con agua DEPC
2. Fragmentar la muestra con cincel y martillo a fin de obtener un fragmento de 1cm<sup>2</sup> aprox.
3. Colocar en mortero y añadir 2 ml de NaCl 0.9% y macerar hasta homogeneizar
4. Recuperar todo el sobrenadante evitando tomar el carbonato en tubos de 2.0 ml
5. Alícuotar 250 µl en un tubo limpio
6. Añadir 400 µl de etanol/cloroformo (62.7 ml/37.5 ml)
7. Dar vortex por 30 seg
8. Centrifugar 3,000 g x 5 min a 4 °C
9. Tomar el sobrenadante y llevarlo a un tubo limpio
10. Almacenar a -20 °C hasta que se hagan las mediciones con el kit
11. Las mediciones se hicieron de acuerdo al protocolo del proveedor.
  - Se midieron 4 blancos cada vez que se hicieron mediciones
  - Es recomendable por cada muestra hacer un mínimo de dos reacciones

\*. Para obtener las U/ml de acuerdo al protocolo se aplica la siguiente ecuación:

$$U/ml = 0.93 \times [(V_s/V_c) - 1] / 1.073 - [0.073 \times (V_c/V_s)]$$

Donde:

V<sub>s</sub>=lectura de muestra (n=2)

V<sub>c</sub>= lectura de blanco (n=4)

ANEXO II. CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL DE *P. verrucosa*Tabla 4. Cuantificación del RNA total a partir de fragmentos de *P. verrucosa* sometidos a estrés térmico experimental (previamente descrito en el capítulo 2) durante 198 horas

Acuario <sup>(1)</sup>	Tiempo (hrs) <sup>(2)</sup>	Muestra <sup>(3)</sup>	[ng/ul]	260/280	260/230	[RT 500ng] <sup>(4)</sup>
5	0	1	624.45	1.82	0.58	0.80
5	0	2	546.73	1.83	0.54	0.91
5	6	1	129	1.9	0.51	3.28
5	6	2	536.39	1.82	0.83	3.28
5	18	1	457.68	1.85	0.79	1.09
5	18	2	138.87	1.83	0.66	3.60
5	24	1	226.83	1.88	0.53	3.28
5	24	2	276.1	1.65	0.98	3.28
5	48	1	198.7	1.92	0.56	2.52
5	48	2	110.65	1.83	0.52	4.52
5	72	1	445.21	1.75	0.86	3.28
5	72	2	243.6	1.68	0.58	3.28
5	96	1	186.35	1.77	0.44	2.68
5	96	2	174.48	1.77	0.32	2.87
5	120	1	325.7	1.72	0.84	3.28
5	120	2	1379.02	1.63	0.56	3.28
5	166	1	174.21	1.78	0.57	2.87
5	166	2	215.08	1.87	0.7	2.32
5	198	1	353.48	1.7	0.63	3.28
5	198	2	1504.93	1.64	0.99	3.28
6	0	1	181.12	1.84	0.68	2.76
6	0	2	198.53	1.87	0.47	2.52
6	6	1	246.94	1.75	0.56	3.28
6	6	2	802.9	1.66	0.75	3.28
6	18	1	307.36	1.7	0.69	1.63
6	18	2	548.88	1.61	0.61	0.91
6	24	1	237.26	1.84	1.44	3.28
6	24	2	436.45	1.76	0.92	3.28

Tabla 5. Continuación...

Acuario ( <sup>1</sup> )	Tiempo (hrs) ( <sup>2</sup> )	Muestra <sup>(3)</sup>	[ng/ul]	260/280	260/230	[RT 500ng] <sup>(4)</sup>
6	48	1	84.63	1.76	0.58	5.91
6	48	2	198.46	1.68	0.68	2.52
6	72	1	359.27	1.82	0.59	3.28
6	72	2	275.89	1.74	0.69	3.28
6	96	1	272.75	1.73	0.62	1.83
6	96	2	331.42	1.71	0.77	1.51
6	120	1	636.33	1.77	0.53	3.28
6	120	2	532.9	1.77	0.82	3.28
6	166	1	412.9	1.78	0.97	1.21
6	166	2	159.59	1.83	0.53	3.13
6	198	1	440.63	1.64	0.55	3.28
6	198	2	523.48	1.8	1.24	3.28
7	0	1	201.45	1.85	0.55	2.48
7	0	2	365.93	1.96	0.39	1.37
7	6	1	231.41	1.63	1.1	2.16
7	6	2	152.67	1.87	0.77	3.28
7	18	1	261.67	1.65	0.92	1.91
7	18	2	192.23	1.92	0.7	2.60
7	24	1	232.24	1.75	0.53	3.28
7	24	2	659.99	1.79	0.67	3.28
7	48	1	230.05	1.75	1.51	2.17
7	48	2	198.58	1.8	0.88	2.52
7	72	1	337.93	1.87	0.71	3.28
7	72	2	162.99	1.83	0.81	3.28
7	96	1	125.95	1.86	0.67	3.97
7	96	2	383.58	1.98	0.29	1.30
7	120	1	2489.57	1.72	0.66	3.28
7	120	2	2296.18	1.61	1.05	3.28
7	166	1	259.8	1.95	0.9	1.92
7	166	2	122.58	1.89	0.57	4.08
7	198	1	123.02	1.85	1.35	3.28
7	198	2	207.32	1.81	1.01	3.28
8	0	1	193.3	1.74	0.52	2.59
8	0	2	253.69	1.7	0.58	1.97

Tabla 5. Continuación...

Acuario <sup>(1)</sup>	Tiempo <sub>(hrs)</sub> <sup>(2)</sup>	Muestra <sup>(3)</sup>	[ng/ul]	260/280	260/230	[RT 500ng] <sup>(4)</sup>
8	6	1	318.34	1.72	0.95	1.57
8	6	2	246.56	1.71	0.68	2.03
8	18	1	1046.47	1.57	0.66	0.48
8	18	2	842.28	1.65	0.57	0.59
8	24	1	328.45	1.88	0.78	1.52
8	24	2	588.97	1.68	0.69	0.85
8	48	1	514.26	1.67	0.53	0.97
8	48	2	187.51	1.85	0.56	2.67
8	72	1	132.28	1.69	0.68	3.78
8	72	2	85.83	1.66	0.74	5.83
8	96	1	332.39	1.71	0.99	1.50
8	96	2	1021.33	1.62	0.56	0.49
8	120	1	1037.37	1.8	0.66	0.48
8	120	2	212.27	1.72	0.9	2.36
8	166	1	263.36	1.69	0.51	1.90
8	166	2	255.84	1.78	0.57	1.95
8	198	1	228.49	1.72	0.75	2.19
8	198	2	121.34	1.6	0.66	4.12
9	0	1	216.4	1.77	0.54	2.31
9	0	2	576.52	1.73	0.44	0.87
9	6	1	146.42	1.83	0.58	3.41
9	6	2	243.84	1.8	0.73	2.05
9	18	1	130.3	1.7	0.72	3.84
9	18	2	180.97	1.66	0.82	2.76
9	24	1	98.57	1.71	0.62	5.07
9	24	2	195.61	1.85	0.86	2.56
9	72	1	604.85	1.71	0.57	0.83
9	72	2	160.72	1.88	0.69	3.11
9	96	1	365.13	1.74	0.61	1.37
9	96	2	362.53	1.83	0.67	1.38
9	120	1	167.01	1.66	0.79	2.99
9	120	2	219.29	1.66	0.55	2.28
9	166	1	466.6	1.89	0.71	1.07
9	166	2	817.55	1.7	0.63	0.61
9	198	1	195.81	1.82	0.42	2.55
9	198	2	93.42	1.69	0.4	5.35

**Tabla 5. Continuación...**

Acuario <sup>(1)</sup>	Horas <sup>(2)</sup>	Muestra <sup>(3)</sup>	[ng/ul]	260/280	260/230	[RT 500ng] <sup>(4)</sup>
10	0	1	671.86	1.67	0.66	0.74
10	0	2	104.08	1.64	0.69	4.80
10	6	1	102.1	1.69	0.56	4.90
10	6	2	333.37	1.81	0.54	1.50
10	18	1	637.05	1.68	0.46	0.78
10	18	2	784.45	1.55	0.66	0.64
10	24	1	1127.84	1.78	0.8	0.44
10	24	2	1003.53	1.76	0.66	0.50
10	48	1	59.58	1.78	0.61	8.39
10	48	2	226.51	1.78	0.72	2.21
10	72	1	600.07	1.66	0.82	0.83
10	72	2	460.49	1.84	0.13	1.09
10	96	1	142.72	1.64	0.67	3.50
10	96	2	30.43	1.74	0.59	16.43
10	120	1	91.54	1.74	0.66	5.46
10	120	2	104.62	1.53	0.76	4.78
10	166	1	286.4	1.89	0.8	1.75
10	166	2	311.01	1.82	0.76	1.61
10	198	1	139.96	1.81	0.44	3.57
10	198	2	191.52	1.85	0.75	2.61

- (1) Los acuarios 5 a 7 corresponden a la temperatura experimental de 28°C, los acuarios 8 a 10 corresponden a 31°C
- (2) El tiempo de experimentación fue de 10 evaluaciones (0 a 198 hrs)
- (3) De cada evaluación se hizo la extracción de RNA por duplicado
- (4) Cantidad de RNA máximo a utilizar (500 ng) durante la retro transcripción de acuerdo al protocolo del proveedor para el uso del kit Superscrip III® (Invitrogen)