

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



CAMBIOS ESTACIONALES EN EXPRESIÓN GÉNICA, METABOLISMO

Y SIMBIOSIS EN EL CORAL ESCLERACTINIO *Pocillopora verrucosa*

ASOCIADOS A LA RESPUESTA DE ESTRÉS EN LA COSTA DE

COLIMA, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA

OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y

BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MANUEL ALEJANDRO DELGADILLO NUÑO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, ENERO 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

CAMBIOS ESTACIONALES EN EXPRESION GENICA, METABOLISMO
Y SIMBIOSIS EN EL CORAL ESCLERACTINIO *Pocillopora verrucosa*
ASOCIADOS A LA RESPUESTA DE ESTRÉS EN LA COSTA DE
COLIMA, MÉXICO

TESIS

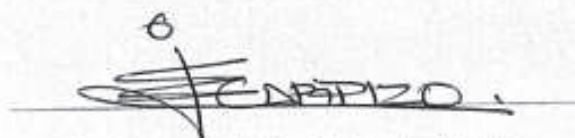
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MANUEL ALEJANDRO DELGADILLO NUÑO

Aprobada por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Director de tesis



Dr. Marco Agustín Liñán Cabello

Sinodal



Dra. Tatiana Nenatzen Olivares Bañuelos

Sinodal

A mi familia.

Un oasis en el océano incierto.

Agradecimientos

A mis padres Manuel y Leticia, mis hermanos Erick y Esmeralda y mis sobrinos Yahel y Lua. Por el amor y apoyo a lo largo de mi vida.

Al Dr. Eugenio J. Carpizo Ituarte, mi asesor, director de tesis y compañero en la travesía de esta investigación. A quien admiro y estimo, y de quién he recibido mucho más de lo que yo puedo otorgar.

Al Dr. Marco A. Liñán Cabello, mi profesor y mayor auxilio en el desarrollo de mi carrera en la investigación y en el estudio de los arrecifes coralinos de Colima.

A la Dra. Tatiana N. Olivares Bañuelos; por introducirme en las maravillas de la biología molecular, de manera simple y sencilla pero metódicamente, la clave para el desarrollo de mi estudio en laboratorio.

Al M. en C. Roberto Escobar por su indiscutida e inigualable ayuda en los procesos tangenciales (enredosos y caóticos) del proyecto, por quien salimos bien librados.

A la Dra. Nancy Saavedra y al Dr. Eric Guerrero, por su oportuno apoyo e infinita paciencia en el laboratorio, aun cuando las cosas parecían más difíciles.

A mis compañeros y amigos que formamos parte del laboratorio ECODEL, Al Dr. Francisco Benítez y los estudiantes Quetzalli Hernández, Viridiana Tapia, Maritza Escamilla, Julia Díaz, Samanta Mercado, Carlos Molina y muy especialmente a Jimena Ortega, por todos estos años dentro y fuera de Ensenada.

A CONACYT por la beca de maestría y por permitirme realizar mi posgrado y mi investigación satisfactoriamente como parte del proyecto titulado: Genes de respuesta al estrés como bioindicadores para evaluar el efecto del cambio global en organismos estructuradores del bentos en el Pacífico Mexicano. No. 181597.

Al personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas, particularmente al Dr. Luis Cupul y Angelica Arce, por su paciencia y apoyo en la tramitación durante la maestría.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California y la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad de Colima, en cuyas instalaciones se llevó a cabo el presente proyecto.

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California y los doctores y profesores del programa de posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología, Ivonne Giffard, Luis Enríquez, Tere Viana, Alejandro Cabello, Yoli Schramm, Faustino Camarena, Graciela Guerra, Rafael Solana y Francisco Correa; por su incansable labor de enseñanza.

A los doctores y profesores de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad de Colima, por su apoyo durante mis estancias de muestreo. Principalmente Aramis Olivos, Torres Orozco, Ramón Sosa y Cristian Ortega.

A al laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias, Dr. Juan Reyes y Fis. Darío Pozas, por la ayuda técnica en la cuestión del nitrógeno líquido.

Al Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada, especialmente al Dr. Axayácatl Rocha, por permitirme trabajar en el laboratorio de ecología molecular a su cargo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, especialmente al estudiante de doctorado David Paz y sus asesores los doctores Francisco García y Eduardo Balart, por su interés y dedicación en los temas asociados con mi línea de investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, unidad Mazatlán, especialmente a la estudiante de Maestría Milly Sandoval y su asesor el Dr. Bruno Gómez, por mostrarme diligentemente el área de meta-genómica.

A la Universidad Autónoma de Baja California sur, especialmente al Dr. Héctor Reyes, por sus comentarios siempre certeros durante las presentaciones de mi trabajo en congresos y simposios.

A todos mis amigos, colegas, compañeros, conocidos y gente de la UABC y CICESE, me da gusto que sean tantos que ni si quiera puedo nombrarlos a todos, mi mayor estima muchachos.

A mis amigos de la (pequeña) “Villa Manzanillo en Ensenada” Joel Bracamontes, Alin Calva, Oscar Bonilla, Javi Rguez, Fatima Castro, Tadashi Kono, Víctor García y Ester Portela y muy especialmente Alicia Bracamontes, con todo mi cariño.

A mis amigos en Colima, Manzanillo y Melaque, especialmente a Adrián Arechiga, Xochitl García y José Valencia, por el excelente recibimiento durante mis visitas.

A las familias Ituarte-Lugo (especialmente a Marcela) y Nuño-Franco (especialmente a Angélica), y a los cálidos integrantes de la familia García-Gómez; Manuel, Carmen, Pam, y muy especialmente a Karen Penélope, por hacerme sentir como en casa.

A mis amigas Diana Ramírez y García por el entusiasmo en su trabajo como estudiantes a mi cargo.

A mis queridísima amiga de intercambio Pilar Bobadilla, te extraño.

A Yulia Chaumel, por guay.

A ti, lector.

Resumen

A nivel global y local, los arrecifes de coral son ecosistemas de vital importancia ecológica y socioeconómica. Sin embargo, el impacto antropogénico se encuentra en aumento, deteriorando estos ecosistemas de manera acelerada en todo el planeta. No obstante, los corales pueden y se han adaptado a ambientes naturalmente variables, como es el caso del Pacífico Tropical Este. Por lo que existe la posibilidad de que tengan la capacidad de responder a los cambios antropogénicos, tales como contaminación, cambios de temperatura y acidificación del océano. Implicando respuestas a distintos niveles de organización biológica.

Considerando lo anterior, se realizó un esfuerzo por integrar biomarcadores de estrés fisiológico en corales escleractinios del Pacífico Mexicano. Se investigó la efectividad de la expresión del gen de la proteína de choque térmico de 70 k-Da (*hsp70*), índice RNA/DNA, densidad zooxantelar (DZ), extensión esquelética y salud (Coral Watch). Como indicadores de la respuesta al estrés ambiental y su variación espacio-temporal en el coral escleractinio *Pocillopora verrucosa*, de la costa de Colima, México.

Se observó una asociación en la sobre-expresión de *hsp70*, el índice RNA/DNA y la DZ en verano. Lo que sugiere un incremento estacional en la respuesta de estrés fisiológico, actividad metabólica y dependencia autotrófica en *P. verrucosa* durante el verano. Especialmente en parches coralinos de La Boquita, debido posiblemente a los efectos de la intercomunicación artificial con la Laguna Juluapan. En el arrecife Carrizales, lejos del efecto de la intercomunicación con la laguna, se observó un índice RNA/DNA mayor en corales del lado oriental del arrecife, en relación con los corales en el lado occidental.

En dicho sitio de Carrizales, la baja respuesta metabólica en *P. verrucosa* coincidió con valores de salud óptima en la escala de la tarjeta de Coral Watch. Por el contrario, los corales del lado oriental de Carrizales y ambos sitios de La Boquita, presentaron distintos umbrales de salud y mostraron un metabolismo consistentemente más activo. Por otro lado, se registraron diferencias en la extensión esquelética para los corales de los cuatro sitios. Particularmente, el crecimiento esquelético singularmente largo y delgado en corales de La Boquita podría estar relacionado con la morfología característica de *P. verrucosa* en ambientes turbios.

Los resultados del presente estudio mostraron diferencias en los bioindicadores entre las áreas coralinas de La Boquita y Carrizales, indicando condiciones ambientales anómalas en La Boquita, principalmente durante el verano. Lo anterior sugiere que los bioindicadores pueden ser utilizados como parte de una herramienta de monitoreo que contribuya a entender mejor la respuesta de los corales al estrés y apoyar mejor su conservación y manejo.

Abstract

Coral Reefs are essential ecosystems, for both global and local ecology and social economics. But anthropogenic impacts are rising and coral reefs have rapidly deteriorated around the world. However coral reefs can adapt to naturally variable environments, this is the case of the far Eastern Tropical Pacific. Therefore, it is possible that coral reefs have the opportunity to respond to anthropogenic changes like contamination, thermal variation and ocean acidification. Through several stress responses at different biological levels.

Based on the above, we make an effort to form a set of physiological stress biomarkers in coral reefs of Mexican Pacific. In this study we investigated the effectiveness of the gene expression of the 70 k-Da heat shock protein (*hsp70*), RNA/DNA ratio, zooxanthellae density (ZD), skeletal extension and coral health (using Coral Watch) as indicators of both temporal and spatial variation of environmental stress in the coral *Pocillopora verrucosa*, on Colima at Mexico Coast.

The indicators exhibit an association in the up-regulation of *hsp70*, and high levels of RNA/DNA ratio and ZD in summer. Suggesting a seasonal increase in the physiological stress response, metabolic activity and dependence on autotrophy during the summer. Especially in corals of La Boquita reef, because of the small jetty built next to Juluapan Lagoon. Far from lagoon influence, high levels of RNA/DNA ratio were observed on the east side of Carrizales reef, greater than that observed in corals on the west side.

On that site of Carrizales reef, the low metabolic response coincides with highest coral health chart scale (Coral Watch) and for the east side of Carrizales and both sites on La Boquita reef, the enhanced metabolic response was similar and coral health was different. On the other hand, differences in skeletal extension were recorded between all

sites. The singular spindly skeletal growth in La Boquita corals could be related to the characteristic morphology of *P. verrucosa* on turbid environments.

The results of this study show differences in the bioindicators between coral areas of La Boquita and Carrizales reefs, suggesting uncommon environmental conditions in La Boquita area in particular at summer time. The above indicate that biomarkers can be used as part of a monitoring reef tool, useful for the better understanding of coral stress response in advance of management and conservation.

Índice general

1. Capítulo I. Conceptos generales	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Antecedentes generales.....	3
1.2.1 Corales escleractinios	3
1.2.2 Problemática de los arrecifes de coral.....	4
1.2.3 Arrecifes del Pacífico Mexicano.....	7
1.2.4 Respuestas fisiológicas al estrés ambiental y antropogénico	10
1.3 Objetivos	13
1.3.1 General	13
1.3.2 Específicos	13
1.4 Hipótesis	14
1.5 Justificación.....	14
2 Capítulo II. Metodología general.....	15
2.1 Área de estudio	15
2.1.1 Arrecife Carrizales.....	17
2.1.2 Parches coralinos de Playa La Boquita.....	17
2.2 Diseño experimental <i>in situ</i>	18
2.3 Colecta de muestras biológicas	19
2.4 Análisis estadístico.....	19
3 Capítulo III. Morfología	20
3.1 Introducción.....	20
3.2 Antecedentes	22
3.3 Materiales y métodos.....	24

3.3.1	Salud.....	24
3.3.2	Morfometría	25
3.3.3	Morfología.....	26
3.4	Resultados	26
3.4.1	Salud	26
3.4.2	Morfometría.....	27
3.4.3	Morfología	29
3.5	Discusión.....	30
4	Capítulo IV. Metabolismo y simbiosis algal.....	34
4.1	Introducción.....	34
4.2	Antecedentes	34
4.3	Materiales y métodos.....	37
4.3.1	Extracción de ácidos nucleicos del hospedero	37
4.3.2	Extracción de ácidos nucleicos de <i>Symbiodinium</i>	37
4.3.3	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	38
4.3.4	Cuantificación de la densidad zooxantelar	38
4.4	Resultados	39
4.4.1	Relación RNA/DNA	39
4.4.2	Densidad zooxantelar.....	42
4.5	Discusión.....	43
5	Capítulo V. Expresión génica	47
5.1	Introducción.....	47
5.2	Antecedentes	47

5.3 Materiales y métodos.....	49
5.3.1 Extracción de RNA	49
5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.....	49
5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa punto final.....	50
5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.....	51
5.3.4.1 Estandarización y validación de oligonucleótidos.....	51
5.3.4.2 Ensayos de expresión génica	52
5.3.4.3 Cálculos: método comparativo delta-delta C _T	52
5.3.5 Análisis estadísticos	53
5.4 Resultados	54
5.4.1 Estandarización de PCR y q-PCR	54
5.4.2 Expresión génica	56
5.5 Discusión	58
Conclusiones.....	60
Literatura citada	62

Índice de figuras

Figura 1. A) Fotografía de un pólipo del coral <i>Pocillopora damicornis</i> . B) Representación esquemática de la morfología del coral: tentáculo, boca, celentéreo, tejido oral, tejido aboral, esqueleto de carbonato de calcio. C) Representación esquemática de la histología del coral: ectodermo (Ecto), mesoglea (M), endodermo (Endo), cnidocito (Cn), dinoflagelado endosimbionte (Zoox). (Tomado de Bertucci et al. 2013).....	4
--	---

Figura 2. Mapa basado en índices de impacto en los arrecifes de coral para tres escenarios: presente, año 2030 y año 2050. Tomado de Reefs at Risk Revisited (Instituto de Recursos Mundiales, WRI por sus siglas en ingles. Washington DC, 2011).....	6
Figura 3. Mapa de la región del Pacífico Oriental Tropical. Se muestran las provincias biogeográficas y el patrón de corrientes oceánicas. (Tomado de Cortés 1997)	8
Figura 4. Mapa de la distribución geográfica y diversidad de especies de corales hermatípicos en los mares de México. Los colores indican las zonas de arrecifes y la riqueza en número de especies de coral. Fuente: Oliver, J., M. Noordeloos, Yusuf, Y., M. Tan, N. Nayan, C. Foo, and F. Shahriyah. ReefBase: A Global Information System on Coral Reefs (Disponible en: http://www.reefbase.org . 2004)	8
Figura 5. Modelo conceptual de biomarcadores coralinos indicando la exposición a componentes de calidad de agua. Las respuestas se presentan en orden del efecto de condiciones de estrés (verde) hasta efectos sub-letales y letales (rojo).....	12
Figura 6. Área de estudio. A) Pacífico Mexicano, B) Costa de Colima, C) Manzanillo. (Imágenes de satélite, Google Earth, 2013).....	15
Figura 7. Sitios de muestreo en el Arrecife Carrizales (CW: Carrizales Oeste y CE: Carrizales Este) y parches coralinos de La Boquita (B1: Boquita 1 y B2: Boquita 2). La X indica el sitio de la intercomunicación artificial con la Laguna Juluapan. (Imágenes de satélite, Google Earth 2013)	17
Figura 8. Cambios en la geomorfología de la intercomunicación de la Laguna Juluapan y Playa La Boquita. A) Geomorfología del cordón y desembocadura natural de la laguna (Tomado de Lancin y Carranza 1976). B) Intercomunicación artificial de la laguna con el	

área arrecifal (Tomada de Liñán-Cabello en at. 2011). C) Geomorfología actual de la intercomunicación (Imagen de satélite, Google Earth 2014). Las flechas negras indican la dirección de la desembocadura de forma natural y las blancas la dirección de la intercomunicación artificial 18

Figura 9. Método de evaluación de salud coralina. A) Nomenclatura de la Tarjeta Coral Watch: cuatro categorías de colores diferentes (h), seis valores estandarizados de saturación (s) y brillantez (b). (Tomado de Siebeck et al. 2006). B) Ejemplo del uso de la tarjeta de Coral Watch en Manzanillo, Colima. (Tomado de Muñiz-Anguiano 2013)..... 24

Figura 10. Mediciones directas de extensión lineal en el coral *Pocillopora verrucosa*. A) Colonia de *P. verrucosa*, B) Acercamiento de la marca con cable plástico corredizo, C) Ejemplo de medición directa realizada por Anderson y colaboradores (2012). Las flechas indican la base de la marca..... 25

Figura 11. Colonias del coral *Pocillopora verrucosa* en experimento *in situ*. CW) Oeste de Carrizales; CE) Este de Carrizales; B) parches de La Boquita, a 400 m y 350 m de distancia de la intercomunicación artificial con la Laguna Juluapan. Los gráficos circulares muestran los valores en porcentaje de la escala de salud de la tarjeta Coral Watch en cada sitio (>100 observaciones, por sitio). Las flechas indican la posición de la etiqueta de la colonia..... 27

Figura 12. Morfometría de *Pocillopora verrucosa*. A) Largo y B) Ancho, C) relación largo/ancho, por sitio: Oeste de Carrizales (CW), Este de Carrizales (CE), La Boquita a 400 m (B1) y 350 m (B2), de distancia con la intercomunicación de la Laguna Juluapan. Se presenta la media de 20 mediciones ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias

significativas entre sitios y en relación con CW se muestran arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).....28

Figura 13. Relación RNA/DNA en individuos del Oeste de Carrizales (CW); Este de Carrizales (CE);, Boquita a 400 m (B1) y 350 m (B2) de distancia a la intercomunicación con la Laguna Juluapan. A) *Pocillopora verrucosa* en febrero, B) *P. verrucosa* en junio y C) *Symbiodinium* en junio. Se presenta la media de 9 individuos ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias significativas respecto a CW se muestran arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)40

Figura 14. Densidad simbiote (zooxantelar) en fragmentos de *P. verrucosa* por sitio: Oeste de Carrizales (CW); Este de Carrizales (CE); La Boquita a 400 m (B1) y 350 m (B2) de distancia a la intercomunicación con la Laguna Juluapan. A) febrero y B) junio. Se presenta la media de 9 individuos ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias significativas respecto a CW se muestran arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)43

Figura 15. Ensayo de q-PCR. A) Perfiles de expresión del gen hsp70 en muestras del sitio CW, CE, B1 y B2. B) Curvas de fusión del gen hsp70 y actina. Las líneas del mismo color representan las repeticiones por triplicado de cada muestras y las líneas de colores distintos las distintas muestras biológicas ($n = 3$)55

Figura 16. Niveles de expresión relativa del gen hsp70 para *Pocillopora verrucosa* en invierno (febrero) y verano (junio) de 2014. Por sitio: Oeste de Carrizales (CW); Este de Carrizales (CE); La Boquita a 400 m (B1) y 350 m (B2) de distancia con la intercomunicación de la Laguna Juluapan. Los valores se expresan como el nivel de expresión ($\pm$ error estándar de la media) del índice de hsp70/actina normalizado (a nivel 1),

en relación con los niveles de expresión en corales de CW en invierno ($n = 6$). Las diferencias significativas con respecto a CW (febrero) y el mes de muestreo aparecen arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)56

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de las principales localidades coralinas estudiadas en la Costa Centro y Sur del Pacífico Mexicano.	9
Tabla 2. Morfología de <i>Pocillopora verrucosa</i> en los sitios de estudio (fotografías: A. Delgadillo), comparada con la morfología de esa especie en arrecifes de Australia y Japón (fotografías: C. Veron, tomadas de coral.aims.gov.au)	28
Tabla 3. Rango de valores del índice RNA/DNA documentados para varias especies de corales escleractinios (entre ellos, el género <i>Pocillopora</i>), en estudios <i>in situ</i> y experimentos de estrés en laboratorio. Incluyendo los resultados obtenidos para <i>P. verrucosa</i> , en el presente trabajo.....	41
Tabla 4. Relación de genes, números de acceso en NCBI, oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido), temperaturas de alineamiento (°C) y tamaño esperado del producto de PCR en pares de bases (pb), para corales de la familia <i>Pocilloporidae</i>	50
Tabla 5. Niveles de expresión relativa del gen hsp70 reportados en el presente estudio.....	57
Tabla 6. Niveles de expresión relativa del gen hsp70, documentados para varias especies de organismos marinos en estudios <i>in situ</i> y experimentos de estrés en laboratorio. Incluyendo los resultados obtenidos para <i>Pocillopora verrucosa</i> en el presente estudio	57

1. Capítulo I. Conceptos generales

1.1 Introducción general

Los arrecifes de corales escleractinios, son ecosistemas de gran importancia a nivel global y local. Poseen alta biodiversidad y asociación exclusiva de numerosas especies marinas, proporcionan protección a la costa contra la dinámica oceánica y erosión, además de que su valor estético y comercial sustenta actividades de turismo y pesca. El éxito biológico de los corales escleractinios se atribuye en gran medida a la endosimbiosis con dinoflagelados del género *Symbiodinium*, comúnmente llamados “zooxantelas.” La relación simbiótica se caracteriza por el aporte energético y recirculación de nutrientes, resultando en el crecimiento de las estructuras calcáreas que forman el arrecife (Lesser 2004). No obstante, la simbiosis es sensible a fuertes cambios ambientales, ocasionando pérdida de la relación simbiótica, fenómeno conocido como “blanqueamiento,” que puede provocar la muerte del coral (Douglas 2003).

Es por ello que con la perspectiva de nuestro planeta cambiante y del impacto antropogénico acelerado, es importante conocer los efectos sobre las especies, ecosistemas y regiones, así como las respuestas a distintos niveles de organización biológica. Considerando el papel de los ecosistemas arrecifales como monitores ambientales, en los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar cómo las comunidades coralinas hacen frente a los eventos de estrés, para comprender la adaptación de los mismos a los ambientes naturalmente variables y verificar en lo posible con que capacidad de aclimatación o adaptación a los impactos antropogénicos, tales como contaminación, incremento en temperatura superficial y acidificación del océano, cuentan estos ecosistemas.

El Océano Pacífico puede considerarse como un laboratorio *in vivo* (Pala 2009), el cual ofrece un modelo de estudio sobre el cambio global en los océanos. Particularmente, en el Pacífico Oriental, la estrecha plataforma continental y la influencia de la Corriente Occidental Mexicana, Corriente de California así como del fenómeno El Niño Oscilación del Sur, ocasionan que esta región presente factores oceanográficos extremos, sedimentación y erosión intensa y disturbios ambientales frecuentes (Glynn & Leyte-Morales 1997, Carriquiry et al. 2001, Reyes-Bonilla et al. 2002, Kessler 2006). Lo anterior genera localidades naturalmente marginales para el establecimiento de arrecifes coralinos, las cuales son altamente dinámicas, algunas con intensa presión antropogénica por lo que son propensas a extinciones locales (Cortés y Guzmán 1998, Reyes-Bonilla y Lopez-Peréz 1999). Sin embargo, en esta región también existen comunidades coralinas bien desarrolladas, con alta riqueza y abundancia de especies, caracterizadas por la ausencia de perturbaciones naturales crónicas o intensas y bajo nivel de uso humano, que les confiere una excelente calidad ecológica (Reyes-Bonilla et al. 2013).

Para evaluar lo anterior, el estado de salud de los arrecifes de coral se aproxima por lo general, mediante el uso de indicadores ecológicos tales como el porcentaje de cobertura coralina, tasas de reclutamiento abundancia y diversidad de peces, entre otros (Edwards 2007). Sin embargo, es poca la información sobre las respuestas fisiológicas de estrés *in situ*. El presente estudio, representa un esfuerzo por establecer biomarcadores de estrés ambiental a nivel celular y sub-celular, principalmente de expresión génica. Integrados en un estudio a nivel organismo y comparando dos comunidades coralinas distintos del Pacífico Mexicano, en invierno y verano. Lo anterior, con el objetivo de que puedan ser usados en estudios de biología integrativa, ecología coralina y sobre eventos de aclimatación/adaptación ante condiciones de estrés, resultado de variaciones ambientales

estacionales o impactos antropogénicos locales. Considerando lo anterior, se investigó la respuesta al estrés *in situ* en el coral *Pocillopora verrucosa* (Ellis y Solander 1786), en dos localidades caracterizadas por la diferencia en el impacto antropogénico que han sufrido hasta el momento y ubicadas en la Costa de Colima, México.

1.2 Antecedentes generales

1.2.1 Corales escleractinios

Se han descrito alrededor de 13000 organismos del phylum cnidaria (Turk y Kem 2009, Technau y Steele 2011). Dentro del phylum, se ubica la clase anthozoa que incluye los corales formadores de arrecifes, pertenecientes al orden escleractinea. Estos organismos consisten en tejidos compuestos de dos capas celulares (diploblásticos), con una capa en contacto con el medioambiente (ectodermo) y otra capa orientada al interior del organismo o celentéreo (endodermo), separadas por una capa conectiva no celular (mesoglea). El cuerpo se compone de una columna en contacto con el agua de mar (tejido oral), presenta una boca en el ápice, rodeada por tentáculos, que funcionan como interfaz ambiente/celentéreo y una base en contacto con el sustrato (tejido aboral). En el tejido aboral se encuentra el epitelio calicoblástico, el cual se especializa en la secreción del esqueleto calcáreo (Fig. 1).

Todos los corales escleractineos presentan endosimbiosis con dinoflagelados del género *Symbiodinium* sp. Las células endosimbiontes están rodeadas por un compartimento o membrana perisimbiótica, localizada en el citoplasma de las células del endodermo, principalmente en la región oral. La simbiosis se caracteriza por una compleja interacción bioenergética y metabólica (Smith et al. 1969), con un importante rol fotosintético, nutricional, de crecimiento y calcificación (Gattuso et al. 1993, Gattuso et al. 1999), lo cual, da lugar a la capacidad del hospedero de formar las estructuras calcáreas y éstas a su vez,

conforman el arrecife de coral. De ésta manera, la fisiología coralina depende de la estrecha relación entre el hospedero y los endosimbiontes, en conjunto denominado holobionte, el cual es sensible a los cambios ambientales y al impacto antropogénico.

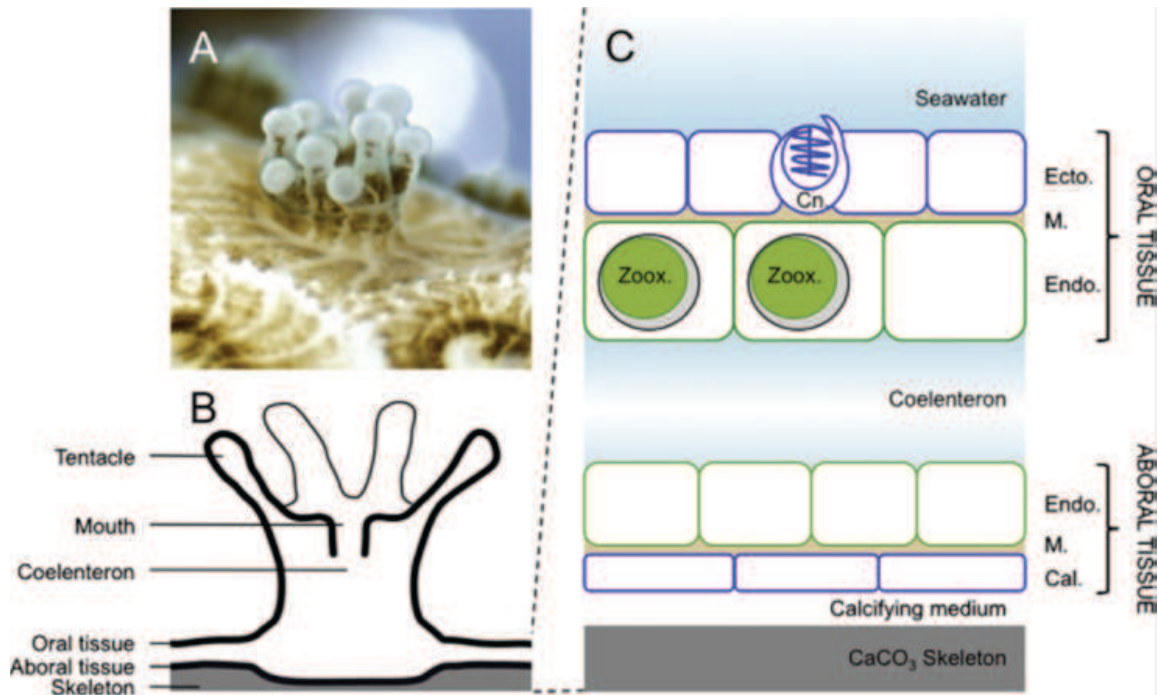


Figura 1. A) Fotografía de un pólipo del coral *Pocillopora damicornis*. B) Representación esquemática de la morfología del coral: tentáculo, boca, celentéreo, tejido oral, tejido aboral, esqueleto de carbonato de calcio. C) Representación esquemática de la histología del coral: ectodermo (Ecto.), mesoglea (M), endodermo (Endo), cnidocito (Cn.), dinoflagelado endosimbionte (Zoox.), (Tomado de Bertucci et al. 2013).

1.2.2 Problemática de los arrecifes de Coral

Los límites biogeográficos para la formación de arrecifes coralinos se establecen naturalmente entre los trópicos. Diversas condiciones oceanográficas en conjunto con corrientes marinas, contribuyen en su distribución y biodiversidad, desde los mares del Indo-Pacífico y Atlántico hasta los del Pacífico Central y Oriental. A pesar de que los

arrecifes coralinos representan solo el 0.2 % del fondo oceánico, mantienen hasta el 25 % de la vida marina (Cesar et al. 2003). Su importancia biológica y ecológica se centra en su mega biodiversidad, al ser un ecosistema multifuncional que provee de alimento y refugio para el crecimiento y reproducción de innumerables especies animales, creando una compleja red de relaciones interdependientes y todo tipo de simbiosis (Veron et al. 2009).

Desafortunadamente, los arrecifes de coral son también uno de los ecosistemas más vulnerables a los cambios ambientales (Caldeira y Wickett 2005, Doney et al. 2009). De acuerdo a Graham y colaboradores (2014), “Regresar a muchos de los arrecifes de coral a sus líneas base prístinas es irreal, debido a las vías de cambios sin precedentes a las que se han sometido a muchos arrecifes coralinos, por lo que serán necesarios aproximaciones más pragmáticas para mantener y aprovechar los servicios de los ecosistemas afectados, a los cuales la población humana deberá responder y adaptarse.”

Según estimaciones recientes, hasta un tercio de todas las especies de corales formadores de arrecifes están en riesgo de desaparecer, como consecuencia del cambio climático e impacto antropogénico local (Hannah y Glynn 2012, Roder et al. 2013). Se ha evaluado que 15 % de los arrecifes en el mundo se encuentran en etapa crítica con probabilidad de pérdida en los próximos años; 19 % se han deteriorado con posibilidad de recuperación; 20 % se encuentra bajo amenazas locales (con pérdidas de 20 – 50 %) y el 46 % restante, se encuentran en riesgo de impacto antropogénico, e incluso amenazados por el cambio climático y acidificación del océano (Hughes et al. 2010).

En un estudio sobre el riesgo de extinción en 845 especies de corales escleractinios, octocorales e hidrocorales, de tan solo tres familias (*Helioporidae*, *Tubiporidae* y *Milleporidae*), se indicó que el 70% de esta especies deberían ser asignadas en un estatus de conservación y entre éstas, 33 % en categoría de riesgo elevado de extinción (Carpenter et

al. 2008). El escenario para los corales es incierto y preocupante (Fig. 2), y debería ser catalogado de vital importancia para la biología de la conservación. Pero, en primer lugar es crítico abordar la cuestión de cómo responden los ecosistemas a la degradación ambiental y no solo centrar nuestra atención en la pérdida de hábitats y especies (Richmond 2005).

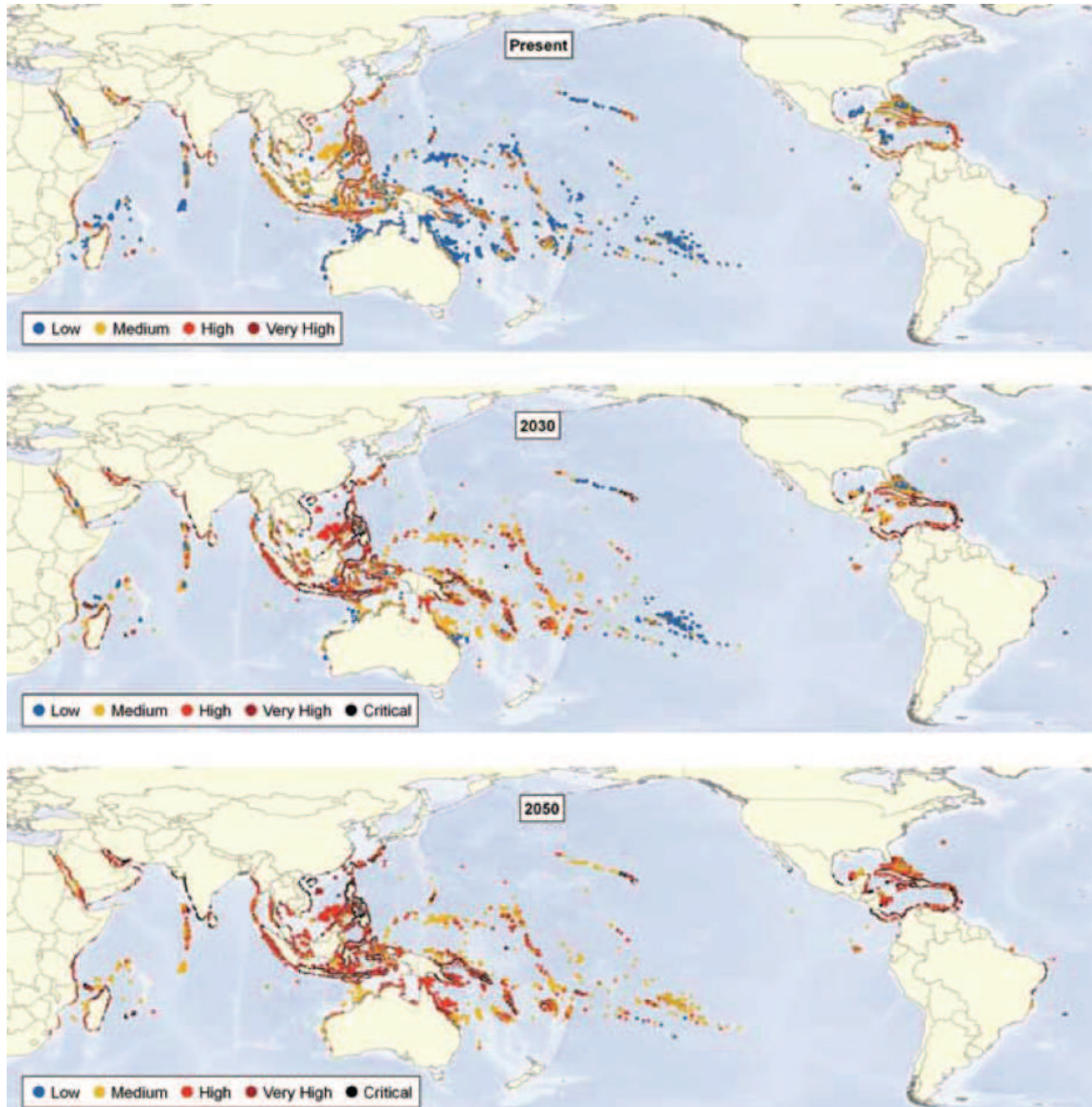


Figura 2. Arrecifes en Riesgo: presente, año 2030 y año 2050. Mapa basado en índices de impacto en los arrecifes de coral. Tomado de *Reefs at Risk Revisited* (Instituto de Recursos Mundiales, WRI por sus siglas en inglés. Washington DC, 2011).

1.2.3 Arrecifes del Pacífico Mexicano

En el Pacífico Mexicano, se cuenta con estudios sobre arrecifes de coral que abarcan su historia fósil (López-Pérez 2008), distribución geográfica y diversidad ecológica (Reyes-Bonilla et al. 2010), estructura comunitaria (López-Pérez et al. 2012), reclutamiento y reproducción (Medina-Rosas et al. 2005, Rodríguez-Troncoso et al. 2011), genética (LaJeunesse et al. 2010, Saavedra-Sotelo et al. 2011), e incluso su respuesta al estrés oxidativo (Liñán-Cabello et al. 2010, Rodríguez-Troncoso et al. 2010).

La región del Pacífico Oriental, se caracteriza por la presencia de especies coralinas enmarcadas en tres géneros principales: *Pocillopora*, *Porites* y *Pavona*, donde el primero ha sido el más estudiado (Reyes-Bonilla et al. 2013). De acuerdo con Mojeta (2006), esta región ha sido aislada histórica y evolutivamente del resto del Océano Pacífico, ya que se encuentra separada por más de 4 000 km de aguas profundas. Sin embargo, es posible que se presente inmigración de larvas originarias del Pacífico Central, principalmente en la costa del Pacífico Mexicano, entre los 18 y 20 °N (Glynn et al. 1997, Reyes-Bonilla et al. 1999, Pérez-Vivar et al. 2006). Por estas razones, la región se puede considerar como un sitio adecuado para el estudio comparativo de la biología coralina.

Además, la región del Pacífico Oriental, cuenta con varias provincias biogeográficas. Entre éstas, la provincia del Pacífico Mexicano (Fig. 3). Así mismo, la provincia mexicana puede ser dividida en zonas arrecifales menores, costeras e insulares, donde se encuentra la Costa Centro-Sur del Pacífico (Fig. 4). Esta zona a su vez, se compone de localidades coralinas en los estados en Nayarit, Jalisco y Colima (Centro), así como Michoacán Guerrero y Oaxaca (Sur).



Figura 3. Mapa de la región del Pacífico Oriental Tropical. Se muestran las provincias biogeográficas y el patrón de corrientes oceánicas. (Tomado de Cortés 1997).

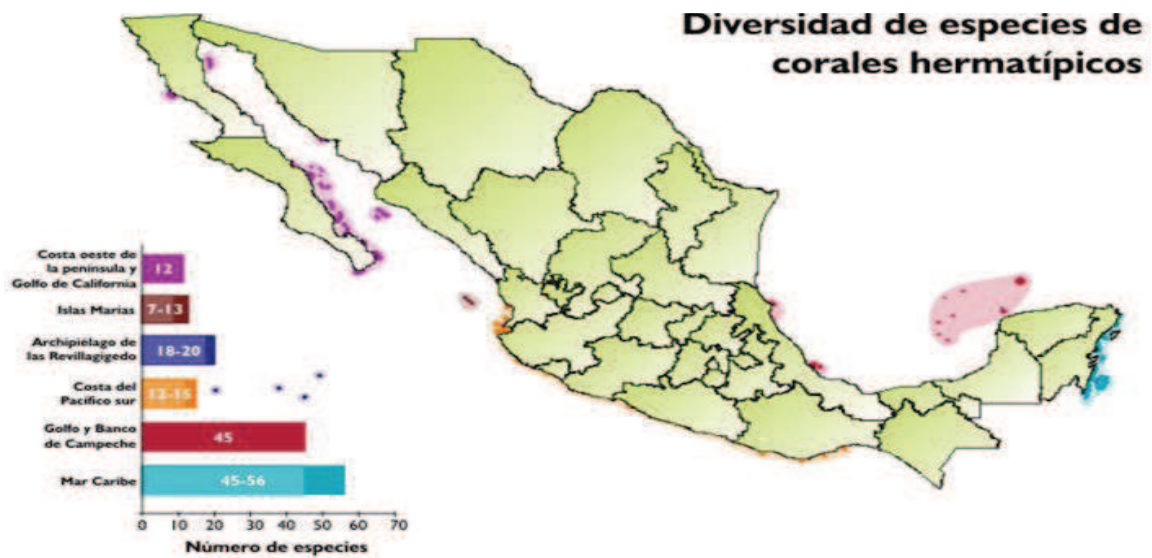


Figura 4. Mapa de la distribución geográfica y diversidad de especies de corales hermatípicos en los mares de México. Los colores indican las zonas de arrecifes y la riqueza en número de especies de coral. Fuente: Oliver, J., M. Noordeloos, Yusuf, Y., M. Tan, N. Nayan, C. Foo, and F. Shahriyah. ReefBase: A Global Information System on Coral Reefs (Disponible en: <http://www.reefbase.org>. 2004).

En estas localidades (Tabla 1), se han identificado formaciones coralinas de extensión considerable y condiciones deseables, albergando algunos de los arrecifes más desarrollados del Pacífico Mexicano, como los arrecifes de Bahía Tenacatita, en Jalisco; Bahía Carrizales, en Colima y Bahías de Huatulco en Oaxaca (Calderón-Aguilera et al. 2007, López-Pérez et al. 2007, Reyes Bonilla et al. 2013). Sin embargo, la mayoría de las comunidades coralinas se encuentran en ambientes marginales, debido a la intensa erosión, sedimentación y dinámica del océano y se han detectado problemáticas locales en prácticamente todos los estados, relacionadas principalmente con el impacto antropogénico (Liñán-Cabello et al. 2006, López-Pérez et al. 2012, Nava y Ramírez-Herrera 2012).

Tabla 1. Lista de las principales localidades coralinas costeras en el centro y sur del Pacífico Mexicano.

Localidades	Ubicación	Condición	Referencias
Punta Mita	20° N, 105°	Altamente expuesta a impacto antropogénico	(Nava y Carballo 2012)
Tenacatita	19° 16'N, 104° 52'W	Susceptible a impacto antropogénico	(Liñán-Cabello et al. 2006)
Carrizales	19.09° N, 104.44° W	Alejado de actividades antropogénicas	(Reyes-Bonilla et al. 2013)
La Boquita	19° 12.25' N, 104° 28.52' W	Estado de estrés agudo local	(Liñán-Cabello et al. 2008)
Ixtapa	17° 40/20' N, 101° 39/00' W	Alta cobertura coral vivo	(López-Pérez et al. 2012)
Acapulco	16° 50/46' N, 99° 55/49' W	Amplio historial de presión antropogénica	(López-Pérez et al. 2012)
Huatulco	15° 41/45' N, 96° 26/04' W	Perturbaciones ambientales frecuentes	(López-Pérez et al. 2007)

A pesar de esta situación, los estudios en la Costa Centro-Sur del Pacífico, se han enfocado en caracterizar la estructura y diversidad de las comunidades coralinas (p. ej.

Reyes-Bonilla y López-Pérez 1998, López-Pérez y Hernández-Ballesteros 2004). Mientras que las respuestas fisiológicas de estrés en corales del Pacífico Mexicano, solo se han estudiado en la zona Centro, en Nayarit (Rodríguez-Troncoso et al. 2010), Jalisco y Colima (Liñán-Cabello et al. 2006, 2008, 2010a). Considerando lo anterior, resulta imprescindible el estudio sobre, 1) cómo los corales del Pacífico Mexicano responden y se adaptan a los cambios medioambientales, 2) avanzar en la comprensión de la respuesta de las especies al cambio global y establecer los niveles de respuesta entre individuos y ecosistemas, 3) comparar la capacidad de adaptación y aclimatación fisiológica entre las poblaciones que viven en diferentes ambientes (Pacífico Mexicano, Pacífico Central e Indo-Pacífico) y 4) documentar la capacidad de respuesta de los corales ante la presión antropogénica local.

1.2.4 Respuesta fisiológica al estrés ambiental y antropogénico

El estrés ambiental se puede caracterizar como una fuerza que da forma a la evolución mediante adaptaciones en los ambientes cambiantes, y es una propiedad tanto del estresor como del individuo en estrés (Bijlsma y Loeschke 2005). No obstante, factores como el incremento de temperatura, acidificación y contaminación marina, se ven influenciados por el cambio climático global y actividades antropogénicas locales, éstos factores introducen nuevos retos en los ecosistemas, causando un aumento del estrés ambiental para muchas especies marinas, dando lugar a cambios ecológicos o extinciones de poblaciones a nivel global, regional y local (Breitburg y Ridell 2005, Koenigstein et al. 2013).

La evaluación del impacto de múltiples estresores en comunidades tan dinámicas y biodiversas como los arrecifes de coral conlleva un gran reto (Darling et al. 2013). Debido a que los disturbios son causados por una compleja combinación de estresores, que incluyen, además del cambio climático, enfermedades, depredación, sobre pesca y prácticas

destructivas de pesca, tormentas y cambios en la calidad de agua, entre otros (Cooper et al. 2009). Tomando como referencia el último factor, MacCulloch y colaboradores (2003) señalan que el efecto del incremento en nutrientes y sedimentación, se ha multiplicado considerablemente en los últimos 150 años, causando reducción del reclutamiento de corales (Loya et al. 2004), modificación de la estructura trófica (Fabricius 2005), alteración en biodiversidad (van Woesik et al. 1999), mortalidad coralina (Kline et al. 2006), e incremento del estrés oxidativo (Lesser 2006).

A nivel molecular se ha observado la sobreexpresión de 14 de 32 genes de estrés en el coral *Diploria Strigosa*, por ejemplo, la expresión elevada de genes uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) durante estrés por sedimentación (Morgan et al. 2005). En estudios de metabolismo celular (relación RNA/DNA), *Porites* spp., presentó mayor actividad en localidades de alta turbidez y sedimentación (Meestres et al. 2002), mientras que en *Acropora millepora*, el mismo comportamiento se observó en condiciones de alta concentración de nutrientes orgánicos (Hauri et al. 2010).

En cuanto a fisiología del simbiote, se ha visto que la sedimentación disminuye la capacidad fotosintética y densidad de las zooxantelas y estas incrementan debido a altas concentraciones de nutrientes inorgánicos y materia orgánica particulada (Fabricius et al. 2005). Finalmente, a nivel de la población coralina, se sabe que la sedimentación puede afectar significativamente la calcificación y en *Stylophora pistillata* se ha reportado una disminución entre 25 – 60 % del crecimiento en condiciones de exposición prolongada a nutrientes inorgánicos (Ferrier-Pages 2000).

No obstante, de manera natural los cambios ambientales generan fenómenos de adaptación y aclimatación. De acuerdo con West y Salm (2003), en ciertos casos los corales pueden presentar resistencia y recuperación ante la variación ambiental, gracias a la

tolerancia y potencial fisiológico, lo cual ha sido abordado utilizando indicadores ecológicos, bioquímicos y moleculares (Cooper et al. 2009, Fig. 5).

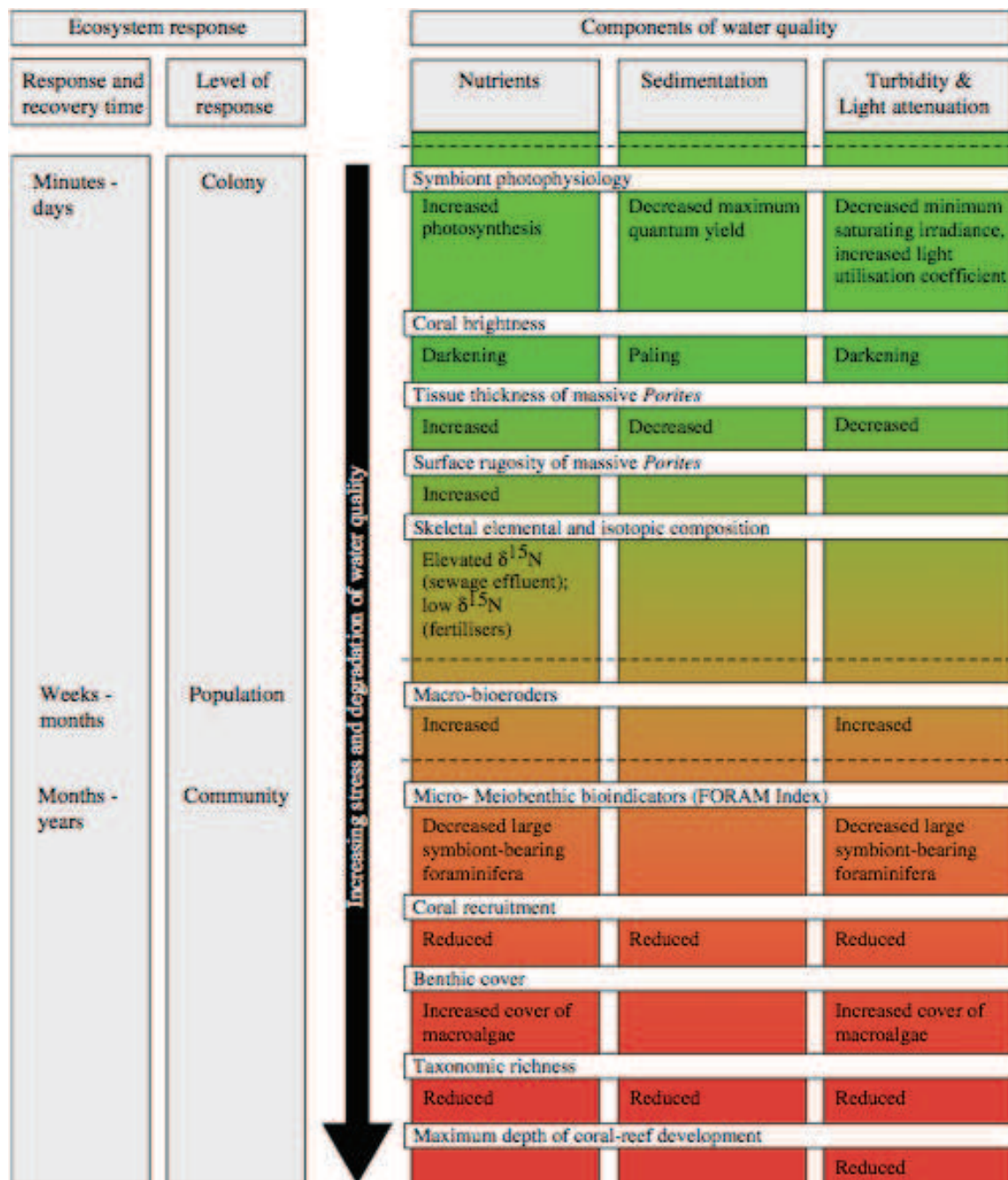


Figura 5. Modelo conceptual de biomarcadores coralinos indicando la exposición a componentes de calidad de agua. Las respuestas se presentan en orden del efecto de condiciones de estrés (verde) hasta efectos sub-letales y letales (rojo).

En la Costa de Manzanillo Colima, existe un marcado contraste ambiental entre el arrecife Carrizales y los parches de La Boquita. La variación espacio-temporal en temperatura y aportes terrígenos costeros y lagunares, han revelado un robusto frente de respuestas bioquímicas al estrés en corales del género *Pocillopora*, entre las que destacan la alta concentración de pigmentos fotosintéticos, aminoácidos tipo micosporina, marcadores de estrés oxidativo y actividad de enzimas antioxidantes, así como altos niveles de RNA y proteína totales (Liñan-Cabello et al. 2006, Liñan-Cabello et al. 2008, Liñan-Cabello et al. 2010). Ésta respuesta *in situ*, se ha confirmado en estudios de estrés en laboratorio (Flores-Ramírez y Liñan-Cabello 2007, Liñan-Cabello et al. 2010, Soriano-Santiago et al. 2013).

Con base en lo anterior, el presente trabajo propone un estudio de la respuesta estacional de estrés ambiental, mediante la utilización de biomarcadores a tres niveles de organización biológica que incluyen el poblacional (morfología y crecimiento), organismo (metabolismo y simbiosis algal) y celular (expresión génica), en el coral *P. verrucosa* de la Costa de Colima, México. Los resultados podrán ser utilizados como línea base para las investigaciones de estrés fisiológico en otras regiones del Pacífico Mexicano.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Caracterizar la variación estacional de la respuesta de estrés en el coral *Pocillopora verrucosa*, con relación a diferentes ambientes en la Costa de Colima.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Registrar la morfometría y morfología de *Pocillopora verrucosa*.
2. Analizar diferencias espacio-temporales en la densidad celular de *Symbiodinium*
3. Evaluar diferencias espacio-temporales en la respuesta metabólica celular

4. Caracterizar la expresión génica de biomarcadores sensibles al estrés, en particular la proteína de choque térmico de 70-kDa (hsp70).

1.4 Hipótesis

Los corales presentan una serie de respuestas fisiológicas intrínsecas ante cualquier factor de estrés. En particular, *P. verrucosa*, presentará diferencias en crecimiento, características de la endosimbiosis, metabolismo celular y expresión génica, como respuesta a las diferencias ambientales en la costa de Colima, México. La respuesta será mayor en la época menos estable (verano) y en los sitios con un historial de mayor impacto antropogénico.

1.5 Justificación

Debido a la importancia ecológica y socioeconómica de las comunidades de coral en la costa del Pacífico Mexicano, el presente estudio pretende generar un mayor conocimiento de las respuestas de estrés ambiental en los corales de la Costa de Colima. Lo anterior con el propósito de generar información que pueda ser utilizada en estudios comparativos, programas de restauración, manejo, protección y utilización de los ecosistemas coralinos de México.

Para lograr lo anterior, se ha realizado un estudio sobre las respuestas bióticas a la variación ambiental (espacial) y climática (temporal), a distintos niveles de organización biológica. El trabajo hace énfasis no solo en el riesgo de pérdida del hábitat y especies que tendrá lugar a largo plazo, sino también en los efectos sub-celulares de la degradación ambiental, los cuales son inmediatos y permitirían realizar predicciones a mediano y largo plazo (aclimatación/adaptación), además de morfología, crecimiento, simbiosis algal, metabolismo y respuesta molecular estrés.

2. Capítulo II. Metodología general

2.1 Área de estudio

El área de estudio en el estado de Colima, presenta características oceanográficas que se ven influenciadas por la Corriente Occidental Mexicana, con temperaturas superficiales del mar entre 27 y 28 °C en promedio (Kessler 2006). Sobre la plataforma continental se puede presentar una compleja circulación, debido a la presencia de remolinos y meandros ciclónicos y anti-ciclónicos, que resultan de la interacción del flujo estacional de macro-escala con forzamientos locales (Salas et al 2006) (Fig. 6).

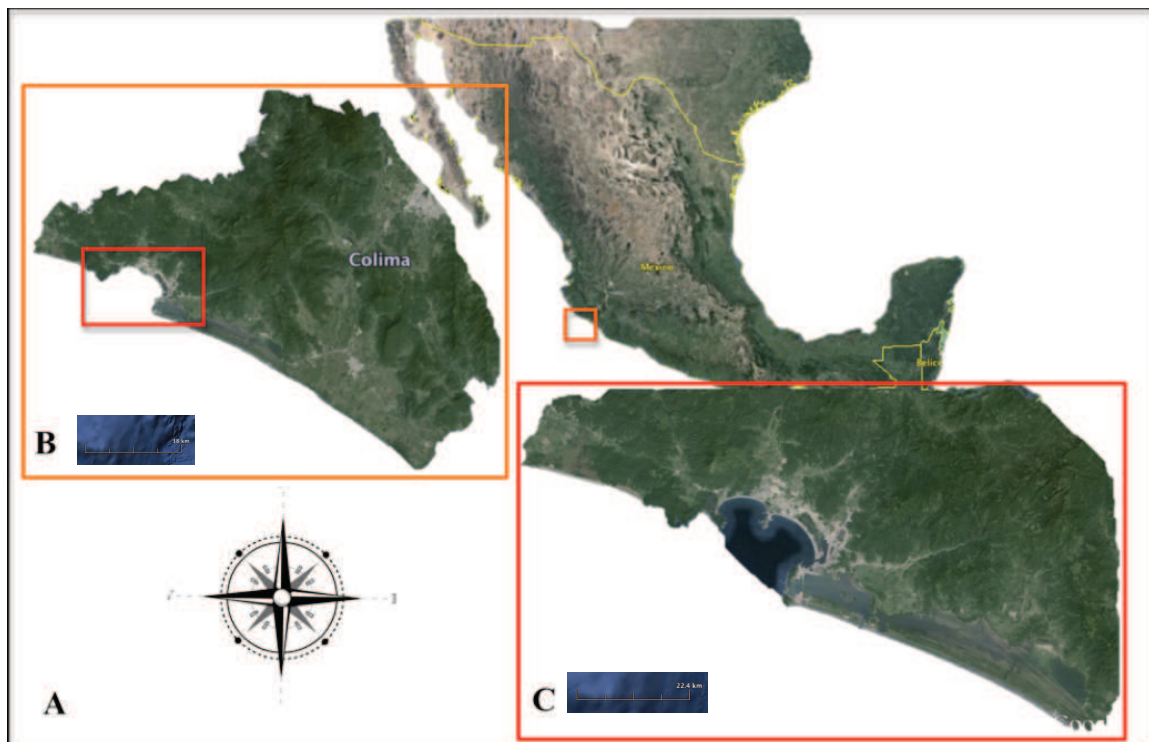


Figura 6. Área de estudio. A) Pacífico Mexicano; B) Costa de Colima; D) Manzanillo. (Imágenes de satélite, Google Earth, 2013).

La marea es semidiurna con amplitud promedio de 70 cm (Pacheco 1991). La salinidad varía de 35 UPS en estiaje a 32 UPS durante la temporada de lluvias en verano (Reyes-Bonilla 2013). La clorofila alcanza valores más altos en verano que en invierno y se han

registrado pequeños eventos de surgencia en primavera que contribuyen a la disminución de temperatura y aumento en productividad primaria local (Sosa-Avalos et al. 2006). Las concentraciones de nutrientes inorgánicos (nitratos, silicatos, ortofosfatos) son altas lejos de la costa y el amonio incrementa en sus cercanías (Olivos-Ortiz et al. 2006).

En el extremo Suroeste de Manzanillo, se extiende el corredor biológico más importante de la región que abarca las Bahías Carrizales y Ceniceros, Punta Juluapan, y Playa La Boquita (Fig. 7). El fondo se compone de arena en la zona más profunda (> 12m), presenta crecimientos coralinos sobre roca granítica, hacia los márgenes someros (0 – 10 m). La comunidad de peces, presenta 46 especies principales, dominada por el haemlido *Haemulon maculicauda* y el pomacntrido *Stegastes acapulcoensis* (Chávez-Comparn y Macías-Zamora 2006). La comunidad coralina es dominada por el género *Pocillopora* (*P. verrucosa*, principalmente), seguido por los géneros *Porites* y *Pavona* y un género menos frecuente, *Psammocora* (Reyes-Bonilla 2013).



Figura 7. Sitios de muestreo en el Arrecife Carrizales (CW: Carrizales Oeste y CE: Carrizales Este) y parches coralinos de La Boquita (B1: Boquita 1 y B2: Boquita 2). La X indica el sitio de la Laguna Juluapan. (Imágenes de satélite, Google Earth 2013).

2.1.1 Arrecife Carrizales

El arrecife de la Bahía Carrizales ($19^{\circ}05.45$ N, $104^{\circ} 28.48$ W), tiene una extensión de 4 ha, dividido en los extremos Este y Oeste dentro de la bahía (50 ha), por lo que presenta heterogeneidad en la comunidad coralina y alberga 39% de las especies coralinas conocidas en México (Reyes-Bonilla et al. 2013). Los corales se encuentran a profundidades de 0.5 a 12 m. Presenta una moderada presión antropogénica, debido a la profundidad y su acceso exclusivamente marítimo, así como su lejanía a la Laguna de Juluapan a 6 Km al Noroeste, por lo que el arrecife se ha mantenido en condiciones relativamente estables (Liñan-Cabello et al. 2006). Sin embargo, la presión ambiental por sedimentación y bioerosión es similar a lo observado en otras áreas del Pacífico Oriental y el impacto antropogénico ha incrementado, debido a la pesca, fragmentación y actividades turísticas (Liñan-Cabello 2010).

2.1.2 Parches coralinos de Playa La Boquita

Los parches coralinos localizados en Playa La Boquita ($19^{\circ} 06.15$ N, $104^{\circ} 28.48$ W), se encuentran disgregados sobre 3, 876 m² en la Bahía de Santiago, a profundidades de 0.5 a 3.5 m. No es un arrecife propiamente dicho, ya que se compone de agregaciones de parches coralinos y colonias aisladas sobre pequeñas plataformas rocosas, interrumpidas por amplios espacios arenosos. Debido a su escasa profundidad, alta presión turística, fácil acceso marítimo y terrestre así como a la intensidad del aporte sedimentario por parte de la intercomunicación artificial entre la Laguna de Juluapan y el área arrecifal, construida en el año 2003 (Fig. 8). Se considera un ambiente marginal que presenta estrés-agudo local y un

deterioro ecológico acelerado (Liñan-Cabello et al. 2008). Más del 20% de la comunidad coralina ha sido cubierta en su totalidad por las descargas sedimentarias de la Laguna (Liñan-Cabello et al. 2010a) y los principales estresores se mantienen o incrementan.

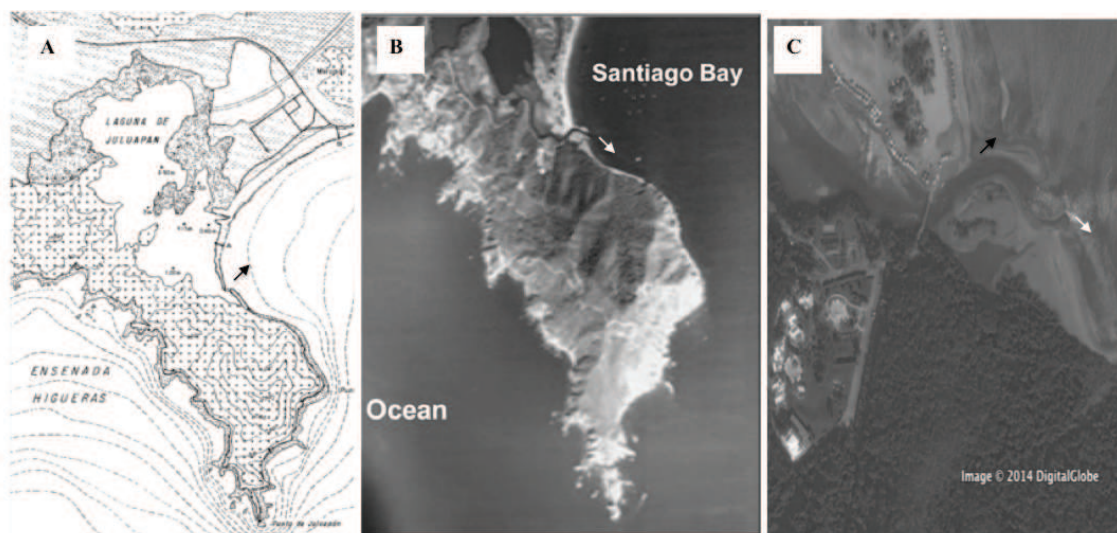


Figura 8. Cambios en la geomorfología de la intercomunicación de la Laguna Juluapan y Playa La Boquita. A) Geomorfología del cordón y desembocadura natural de la laguna (Tomado de Lancin y Carranza 1976). B) Intercomunicación artificial de la laguna con el área arrecifal (Tomada de Liñán-Cabello en at. 2011). C) Geomorfología actual de la intercomunicación (Imagen de satélite, Google Earth 2014). Las flechas negras indican la dirección de la desembocadura de forma natural y las blancas la dirección de la intercomunicación artificial.

2.2 Diseño de experimento *in situ*

En agosto de 2013 se realizó un buceo prospectivo en la Bahía Carrizales y Playa La Boquita, para localizar cuatro sitios (dos por localidad), a profundidades no mayores a 3 m y con una cobertura coralina similar en donde se identificaron colonias de la especie *Pocillopora verrucosa*, de tamaños $\sim 1 \text{ m}^2$ o menores (Fig. 7). En febrero de 2014, se seleccionó un sitio testigo con poco o nulo estrés fisiológico, en la sección Oeste del arrecife Carrizales (CW), un sitio dentro del mismo arrecife en la sección Este (CE);

adicionalmente se eligieron dos sitios que presentan un historial de estrés fisiológico agudo en Playa La Boquita, ubicados uno a 400 m (B1) y el segundo a 350 m de (B2) de la intercomunicación artificial de la Laguna de Juluapan. Se etiquetaron 10 colonias coralinas con marcas plásticas diseñadas por Muñiz-Anguiano (2013), separadas en distancias de 2 - 5 m, abarcando un área aproximada entre 40 y 50 m².

2.3 Colecta de muestras biológicas

Se realizaron dos campañas de muestreo. A finales del invierno (febrero de 2014) y a principios de verano (junio de 2014) abarcando la temporada de primavera. Para la recolección de muestras, se cortaron pequeños fragmentos de las 10 colonias previamente marcadas en cada sitio. Los fragmentos de menor tamaño ($\leq 1\text{cm}$), fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y triturados dentro de bolsas trilaminadas estériles, empleando un mazo de plástico y se colocaron en micro tubos de 2 ml con 1 ml de Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), para posteriormente ser congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la temporada de verano se recolectaron muestras adicionales para la separación de tejidos de endosimbiontes y hospedero. Los fragmentos de mayor tamaño (2 – 4 cm), se fijaron inmediatamente en 4% formalina, para análisis de la densidad zooxantelar (DZ).

2.4 Análisis estadístico

Se analizó la normalidad y homocedasticidad de los datos moleculares, morfológicos y DZ, aplicando las pruebas de Shapiro-Wilk/Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. Posteriormente, se analizaron los datos de la relación RNA/DNA, DZ, extensión esquelética y relación largo/ancho del esqueleto, con la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis y se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Wilcoxon (intervalos de confianza de 95%). Los análisis se realizaron con el programa R versión 3.0.1, para Macintosh (The R Foundation for Statistical Computing). Los datos de la

relación RNA/DNA, DZ, extensión esquelética, área de superficie, volumen y relación largo/ancho del esqueleto, se expresan como valores medios ($\pm$ error estándar de la media) de nueve individuos. Para la expresión de hsp70, los datos se presentan como valores medios del ensayo de q-PCR (por triplicado), en los sitios de estudio ($n = 3$).

3 Capítulo III. Morfología

3.1 Introducción

Las condiciones ambientales que limitan los procesos de reproducción, depredación, crecimiento y que afectan la salud del ecosistema, se han estudiado desde hace décadas. Entre las principales cuestiones que ha abordado la biología marina, se encuentra el potencial catastrófico de la sinergia por la variación ambiental, impacto antropogénico y cambio climático, sobre estos procesos biológicos (Scanlan y Wilson 1999, Soto 2002). Por lo que en la actualidad, es posible observar, y dar seguimiento a los cambios en la abundancia y distribución de especies, así como de los efectos en la salud, crecimiento y comportamiento de los organismos, de acuerdo al nivel de estrés local en cada ecosistema, principalmente en invertebrados marinos.

Por lo tanto, en estudios de arrecifes coralinos, es importante contar con indicadores rápidos, flexibles y de bajo costo, que puedan ser empleados en las campañas de buceo, como parte de la metodología integral de monitoreo. Entre estos, podemos encontrar: 1) el método Coral Watch para la evaluación del blanqueamiento y salud coralina; 2) marcaje de colonias que permiten el monitoreo continuo y/o de individuos de interés particular y 3) censos, identificación y detección de cambios biológicos y ecológicos en la comunidad coralina a través del tiempo.

Este capítulo presenta evidencia cualitativa y cuantitativa de los efectos sobre la extensión esquelética, morfología y salud de corales sujetos a un diferentes ambientes, de acuerdo con el historial de estrés ambiental y antropogénico en las localidades coralinas de Manzanillo, Colima. Los resultados de estos bioindicadores, son discutidos en función de una primera aproximación de la respuesta de estrés fisiológico en *P. verrucosa*.

3.2 Antecedentes

La tarjeta de salud coralina Coral Watch (Jennings 2003), cuenta con gran potencial en estudios de estrés y recuperación en el corto, mediano y largo plazo, tanto en arrecifes con pocos antecedentes de estudio o extensamente investigados; el método permite la evaluación rápida, sencilla y no invasiva de la salud coralina mediante la coloración registrada *in situ*; cambios en dos unidades o más, en la escala de seis niveles de saturación/brillantez de color, reflejan una variación directamente proporcional con la densidad de simbioses y concentración de clorofila (Siebeck et al. 2006).

El método Coral Watch (Jennings 2003), ha mostrado un incremento en su aplicación en estudios científicos (p. ej. Hill and Wilkinson 2004, Siebeck et al. 2008, Teymour y Sanjani 2010, Hijirezaee y Zaiton-Ibrahim 2013), y su diseño de fácil aplicación, ha permitido a especialistas y aficionados que acuden a los arrecifes de coral alrededor del mundo, la creación de una extensa base de datos de acceso público (Marshall et al. 2012). Particularmente, en las localidades Carrizales y La Boquita, se ha empleado para reconocer estados de salud, evaluar la recuperación coralina y relacionarla con la respuesta fisiológica en estudios de restauración coralina y tras realizarse trasplantes de *Pocillopora* spp. (Liñan-Cabello et al 2011, Laurel-Sandoval 2011, Muñiz-Anguiano 2013).

P. verrucosa presenta verrugas características, las cuales son alargadas e irregulares en tamaño y forma, presenta un tipo de extensión esquelética acelerada, de apariencia ramificada, verticalmente uniforme, de simetría radial (a lo largo de un eje apical), con poco o nulo crecimiento en otras direcciones y con gran diferencia (plasticidad) tanto en la extensión de las verrugas, ramas individuales y colonias coralinas (Martin y LeTissier

1988). De manera que, la extensión esquelética y la plasticidad morfológica en los corales pocilloporidos pueden ser utilizados como indicadores de la condición ambiental.

Por ejemplo, en condiciones de alta turbidez, las verrugas incrementan y se alargan aún más (Veron 2000), mientras que el poco movimiento y flujo de agua, permiten el crecimiento de ramas más largas, delgadas y separadas (Mass y Genin 2008, Mass et al. 2011, Chindapol et al. 2013) y la baja presencia de peces coralívoros, favorece la extensión esquelética lineal (Palacios et al. 2014). Todo lo anterior contribuye en la amplia plasticidad morfológica de *P. verrucosa*, por lo que en ocasiones la especie puede ser confundida con *Pocillopora damicornis* (Linnaeus 1758) o *Pocillopora capitata* (Verrill 1864). Sin embargo, las ramas de *P. verrucosa* son menos cespitosas y alargadas que dichas especies, respectivamente (Veron 2000, Schmidt-Roach et al. 2014).

Esta amplia variación morfológica dentro de la misma especie, indican claramente la capacidad fenotípica de aclimatación a los cambios ambientales locales y micro-ambientales con relación al movimiento del agua, partículas en suspensión y sedimentación, así como la presencia de depredadores.

Recientemente, se ha reportado que la plasticidad fenotípica puede verse reflejada en cambios morfológicos de *Pocillopora damicornis*, relacionados con el estrés ambiental generado por tormentas e incrementos en la temperatura del mar en el Pacífico Mexicano (Paz-García et al., comunicación personal). Particularmente, en la costa de Colima, se cuenta con antecedentes sobre la extensión esquelética en *Pocillopora* en Carrizales y La Boquita (Liñán-Cabello et al. 2011, Islas-Peña et al. 2013), así como su variación estacional (Muñiz-Anguiano 2013). De manera que los indicadores morfológicos cuentan con el potencial de investigación en estudios de estrés ambiental a mediano y largo plazo así como del cambio climático global.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Salud

La condición de salud se evaluó por el método Coral Watch, que utiliza la escala de coloración de la tarjeta de salud coralina (Coral Health Chart). Esta escala abarca niveles de 6 a 1, de mayor a menor saturación de color y de menor a mayor brillantez (Fig. 9). De manera que la escala puede ser usada para evaluar la condición de salud, palidez o blanqueamiento *in situ*, indicando una condición saludable, cuando los valores son ≥ 4 y blanqueamiento cuando el valor es = 1 (www.coralwatch.org), por lo que la palidez de la colonia puede establecerse en los valores 2 – 3. Se realizaron de 10 – 15 observaciones de la coloración de cada colonia marcada, con un total de más de 100 observaciones por sitio durante febrero de 2014.

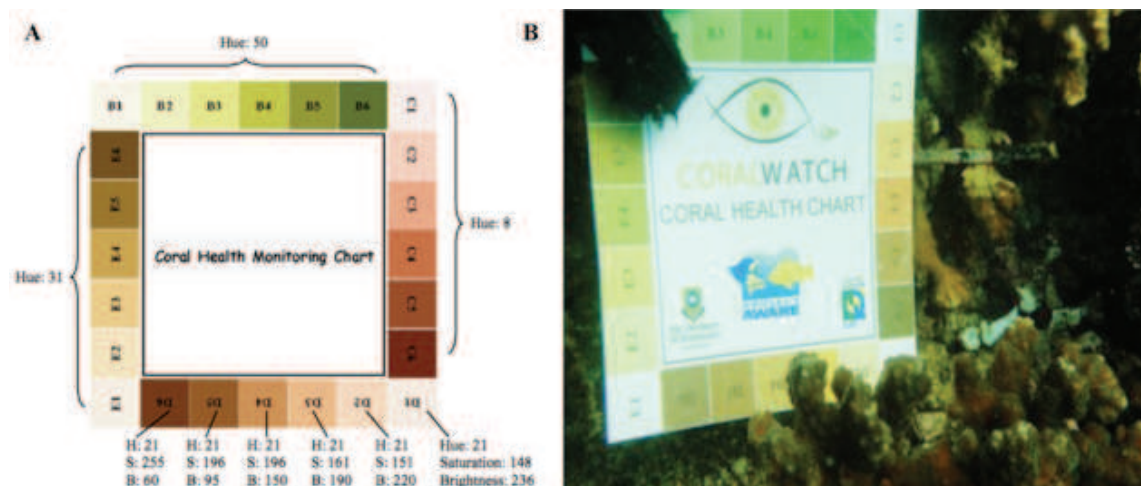


Figura 9. Método de evaluación de salud coralina. A) Nomenclatura de la Tarjeta Coral Watch: cuatro categorías de colores diferentes (H), seis valores estandarizados de saturación (S) y brillantez (B). (Tomado de Siebeck et al. 2006). B) Ejemplo del uso de la tarjeta de Coral Watch en Manzanillo, Colima. (Tomado de Muñoz-Anguiano 2013).

3.3.3 Morfometría

El crecimiento coralino, se aproximó mediante el cambio en talla esquelética promedio (mm mes^{-1}), en un periodo de 18 semanas (febrero a junio, 2014), con base en Anderson y colaboradores (2012). Se emplearon mediciones morfométricas directas, mediante el marcaje de 4 fragmentos por colonia, utilizando cables plásticos corredizos asegurados entre 10 y 30 mm del tope del fragmento (Fig. 10). Se registró el cambio en extensión lineal de la base de la marca al tope del fragmento y el ancho del fragmento sobre la marca, las mediciones se realizaron usando un vernier de precisión milimétrica. Empleando las medidas de la extensión lineal, se calculó la relación largo/ancho.

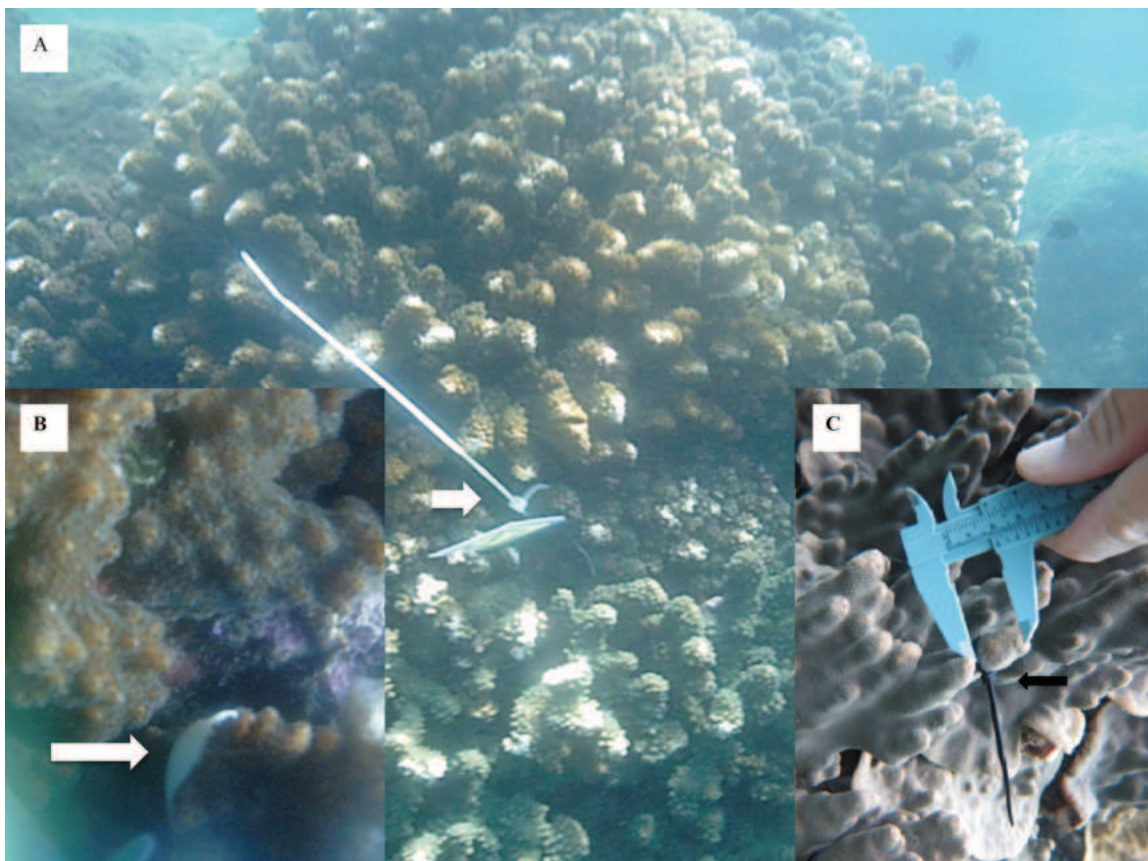


Figura 10. Mediciones directas de extensión lineal. A) Colonia de *Pocillopora verrucosa*, B) Acercamiento de la marca con cable plástico corredizo, C) Ejemplo de medición directa realizada por Anderson y colaboradores (2012). Las flechas indican la base de la marca.

3.3.2 Morfología

Durante las campañas de muestreo con buceó autónomo, se condujeron registros video-fotográficos de los sitios de estudio y colonias marcadas, empleando una cámara subacuática Hero3 Silver (©GoPro, Inc. EUA). Se utilizaron las fotografías de las colonias marcadas para el análisis de la morfología de *P. verrucosa*, con base en los trabajos de Cortés y Guzmán (1998), Veron (2000) y del instituto australiano de ciencias marinas (www.coral.aims.gov.au).

3.4. Resultados

3.4.1 Salud

Se muestran los resultados de la escala de coloración Coral Watch en orden descendente: 6 (salud óptima), 5 (buena salud) 4 (umbral de salud), 3 (no saludable), 2 (semi-blanqueamiento) y 1 (blanqueamiento total). En febrero de 2014, en el sitio CW (148 mediciones), los corales marcados registraron 42% salud óptima, 47% buena salud, 10% en umbral de salud y 1% de semi-blanqueamiento. El sitio CE (130 observaciones), presentó 6% salud óptima; 31% buena salud, 40% en umbral de salud, 21% no saludable y 2% de semi-blanqueamiento. En el sitio B1 (110 mediciones), se registró 2% salud óptima, 37% buena salud, 45% umbral de salud, 13% no saludable y 3% de semi-blanqueamiento. Por último, en el Sitio B2, obtuvo 2% salud óptima, 27% buena salud, 40% umbral de salud, 26% no saludable, 4% semi-blanqueamiento y 1% de blanqueamiento total. A pesar de que todos los sitios presentaron niveles 70 % arriba del umbral de salud, buena salud o salud óptima, estos últimos dos niveles en CE, B1 y B2; fueron 52, 50 y 60 % (respectivamente) menores que en CW (Fig. 11).

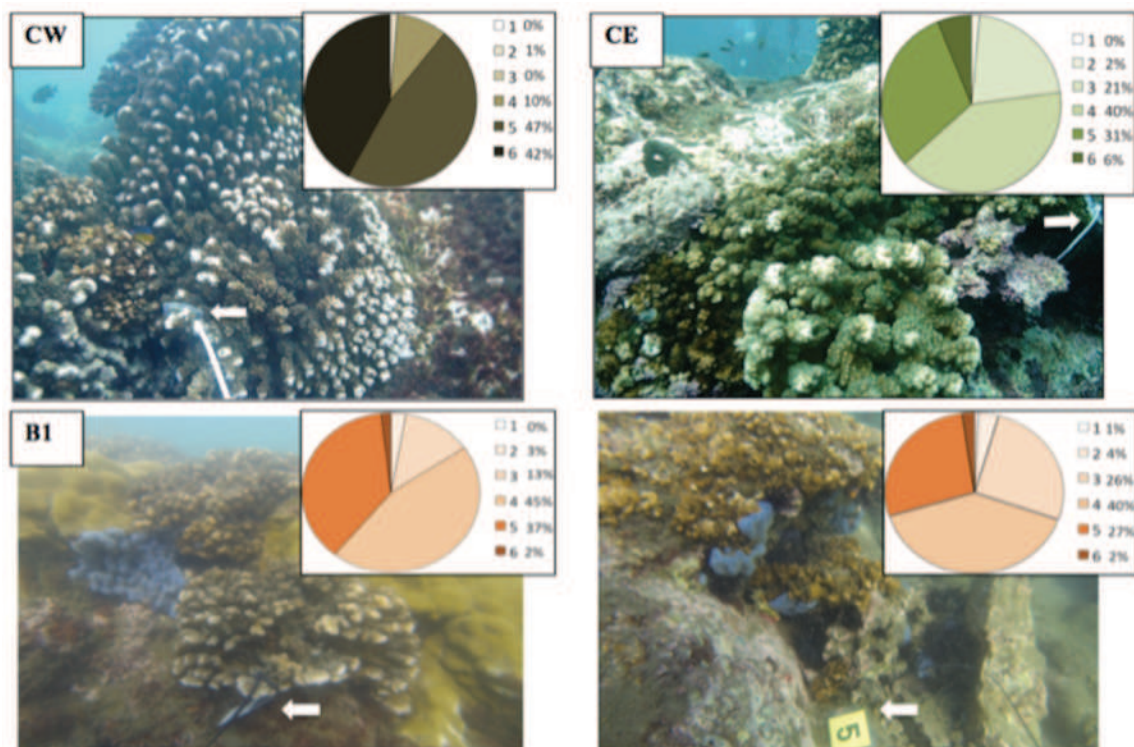


Figura 11. Colonias del coral *Pocillopora verrucosa* experimento *in situ*. CW) Oeste de Carrizales; CE) Este de Carrizales; B) parches de La Boquita, a 400 m y 350 m de distancia de la intercomunicación artificial con la Laguna Juluapan. Los gráficos circulares muestran los valores en porcentaje de la escala de salud de la tarjeta Coral Watch en cada sitio (>100 observaciones, por sitio). Las flechas indican la posición de la etiqueta de la colonia.

3.4.2 Morfometría

En relación con el valor promedio de longitud del esqueleto (extensión lineal). La extensión esquelética de los corales en La Boquita fue mayor en contraste con los sitios de Carrizales, sin ser significativamente distinta ($P > 0.05$). Mientras que el sitio CE presentó una extensión esquelética significativamente menor en relación con CW ($P < 0.05$), (Fig. 12 A). Con respecto al valor promedio de grosor de las ramas, CW presento el mayor grosor, B1 y B2 tuvieron un grosor ligeramente menor que CW y CE de nuevo presento los menores valores en las mediciones (Fig. 12 B). No obstante, estas diferencias no fueron

significativas ($P > 0.05$). Por otro lado, el sitio B2 presento el mayor promedio en la relación largo/ancho y los sitios B1, CE y CW presentaron promedios menores sin ser significativamente distintos ($P > 0.05$), en relación con B2 (Fig. 12 C).

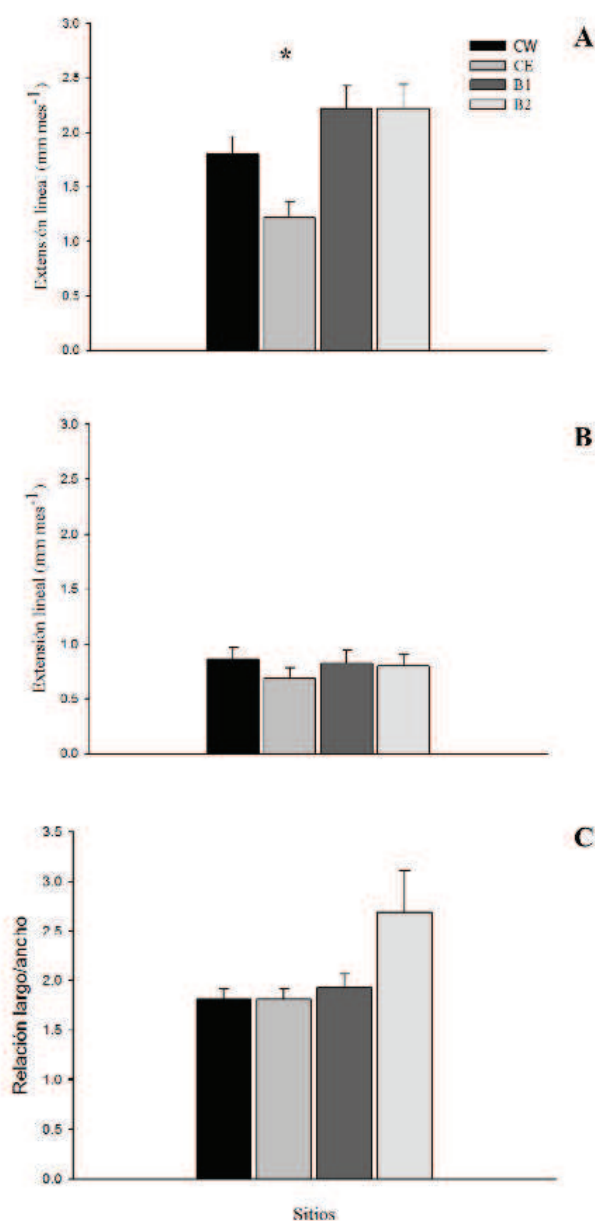


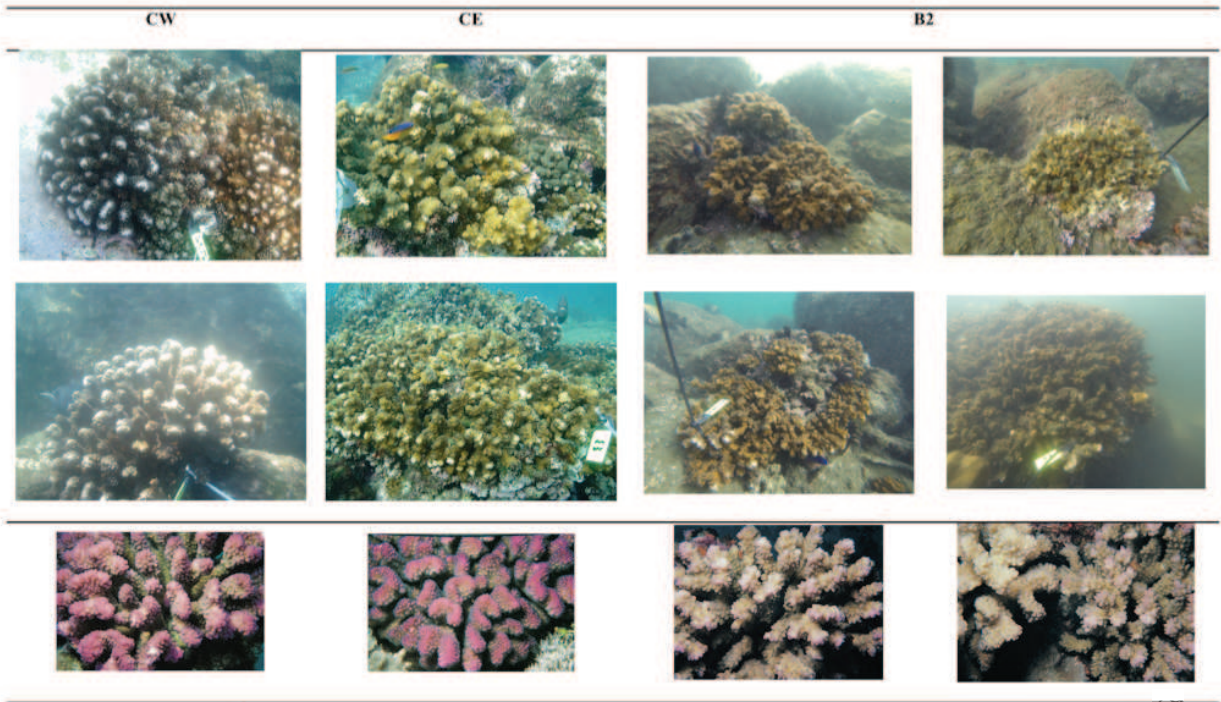
Figura 12. Morfometría de *Pocillopora verrucosa*. A) Largo y B) Ancho, localidad: Carrizales y La Boquita; C) Largo y D) Ancho por sitio: Oeste de Carrizales (CW), Este de Carrizales (CE), La Boquita a 300 m (B1) y 250 m (B2), de distancia con la intercomunicación de la Laguna Juluapan. Se

presenta la media de ~ 26 mediciones ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias significativas entre sitios y en relación con CW se muestran arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3.4.3 Morfología

Las características morfológicas de *P. verrucosa* fueron las siguientes: colonias de ~0.5 m de diámetro compuestas de ramas verticales que presentaron claramente las verrugas distintivas uniformes e son irregulares en tamaño. La variación morfológica (morfotipos) de los extremos terminales de las ramas en las colonias se presentan en la Tabla 2. Ramificaciones abiertas y delgadas características de arrecifes protegidos, ramificaciones gruesas y compactas, típicas en pendientes arrecifales y hábitats expuestos a una fuerte dinámica del océano y verrugas aún más alargadas, características de arrecifes que están sujetos a alta turbidez. Se observó mayor diversidad de morfotipos en el sitio CW, seguido del sitio CE, mientras que en B1 y B2 se observó un solo el morfotipo.

Tabla 2. Morfología de *Pocillopora verrucosa* en los sitios de estudio (fotografías: A. Delgadillo), comparada con la morfología de esa especie en arrecifes de Australia y Japón (fotografías: C. Veron, tomadas de coral.aims.gov.au).



3.5 Discusión

Se sigue que los corales del lado Oeste del arrecife (Sitio CW), son individuos testigo del poco o nulo estrés fisiológico, ya que presentaron un índice de salud coralina que se podría considerar como óptima. Mientras que en la cara Este del mismo arrecife, los niveles de salud son más similares a los encontrados en parches coralinos de La Boquita, que se encuentra sujeta a un creciente nivel de estrés ambiental y antropogénico como ha sido documentado por Liñán-Cabello y colaboradores (2006, 2008, 2010).

Dicha similitud entre CE, B1 y B2, podría deberse al incremento en la actividad humana dentro del arrecife (Liñán-Cabello et al. 2011), o debido a que esta área del arrecife presenta mayor cantidad de microambientes significativamente distintos entre ambas caras del arrecife (Reyes-Bonilla et al. 2013). De manera que los organismos de CE, a pesar de encontrarse dentro del arrecife Carrizales, no son adecuados como individuos testigo y podrían presentar una respuesta importante de estrés fisiológico.

De acuerdo a lo anterior podría ser posible confirmar, que en las condición actual de Carrizales es la de un ecosistema de bajo nivel de uso humano y ausencia de perturbaciones naturales crónicas o intensas y coincide con lo que lo reportado previamente por Reyes-Bonilla y colaboradores (2013). Ya que no se registró un evento de blanqueamiento durante el periodo de estudio, los resultados obtenidos del Coral Watch se consideran una aproximación puntual que permite reconocer diferencias entre arrecifes coralinos (Siebeck et al. 2008), es decir, un punto de partida, para el estudio de la respuesta fisiológica de estrés.

El método Coral Watch podría ser más adecuado en estudios a largo plazo, para la obtención de bases de datos; recuperación de un arrecife y sobre todo, registrar la

recuperación ante un evento de blanqueamiento (Siebeck et al. 2008; Liñán-Cabello et al. 2011, Marshall et al. 2012).

Por otra parte, aunque varias investigaciones científicas han probado la efectividad del método Coral Watch, para la evaluación de salud coralina (Hill and Wilkinson 2004, Teymour y Sanjani 2010, Hijirezae y Zaiton-Ibrahim 2013), inicialmente la tarjeta Coral Health Chart, de Coral Watch, se desarrolló con base en el estudio del blanqueamiento (Jennings 2003). Fue probada con experimentos en condiciones controladas de laboratorio y con mediciones en campo durante eventos de blanqueamiento (Siebeck et al. 2006). Por lo que el método constituye más bien una aproximación de la salud, relativa al blanqueamiento (Kerr 2005).

Por otro lado, contrario a lo observado en la metodología del Coral Watch, y a lo que se esperaría con respecto al crecimiento esquelético de corales en ambientes sin perturbación ambiental ni humana. La extensión esquelética fue mayor en los parches de La Boquita, probablemente como consecuencia de la integración de varios factores, entre estos, variabilidad en la temperatura (Jokiel y Coles 1990), menor dinámica (Mass et al. 2011, Chindapol et al. 2013), menor presencia de depredadores y mayor de organismos bioerosionadores (Palacios et al. 2014), en relación con Carrizales. No obstante, estas hipótesis requieren ser probadas con registros actuales de los factores en cuestión, y/o en condiciones controladas de laboratorio con especímenes de ambas localidades.

Es posible que las ramas de los corales de La Boquita, al ser más largas y delgadas, presenten una mayor fragmentación por efecto de la perturbación ambiental crónica. Mass y colaboradores (2011), reportaron que las ramas de *P. verrucosa* crecidas en condiciones de dinámica reducida (débil flujo de agua), fueron más delgadas y se relacionaron con una menor densidad esquelética. De manera similar, Dunn y colaboradores (2012), reportaron

que las altas concentraciones de fósforo tiene un efecto positivo en indicadores asociados al crecimiento en *Acropora muricata* con consecuencias negativas en la densidad esquelética. Probablemente las condiciones de estrés crónico en La Boquita (Liñán-Cabello et al. 2006, 2008, 2010), no alteren el crecimiento en extensión esquelética, pero si afecten el crecimiento esquelético vía disminución en densidad y calcificación (Enochs et al. 2014).

No obstante, la fragmentación es un fenómeno común y con seguridad una característica adaptativa en corales de crecimiento ramificado como *Acropora*, *Seriatopora* y *Pocillopora* (Marshall 2000). Se requiere entonces de estudios de extensión esquelética con mayor detalle (p. ej. tinción con alizarina), ya que se ha visto que las mediciones directas pueden subestimar los valores de extensión lineal (Anderson et al. 2012). Así como estudios de densidad esquelética, índices de calcificación y resistencia estructural, que demuestren diferencias considerables, entre estas y otras localidades del Pacífico Mexicano. Sobre todo en el contexto de cambio global, que implica mayor incidencia de efectores sobre el crecimiento, fragmentación y disolución esquelética, como frecuencia de tormentas, incremento de temperatura y acidificación.

La mayor diversidad de morfotipos en CW seguida por CE, sugieren diferencias espaciales en la composición morfológica dentro del arrecife, lo cual ha sido documentado por la DIGAOHM (digaohm.semar.gob.mx). Sin embargo esto es contrario a lo reportado en un estudio anterior, el cual sugiere que la comunidad coralina de Carrizales funciona como una unidad en el marco espacial (Reyes-Bonilla et al. 2013). Por otro lado, el morfotipo fijo de B1 y B2, podría estar relacionado con la aclimatación fenotípica y fisiológica de estos corales en La Boquita como ha sido reportado para *P. damicornis* por Lesser y colaboradores (1994). Debido a la complejidad en la estructura y diversidad de las especies de corales pociloporidos, será necesario recurrir a estudios que integren aspectos

morfológicos y genéticos (Marti-Puig et al. 2014, Schmidt-Roach), que permitan resolver esta cuestión, así como estudios sobre la variación morfológica en el marco temporal.

4 Capítulo IV. Metabolismo y simbiosis algal

4.1 Introducción

La simbiosis algal forma parte de la fotobiología coralina, la cual se relaciona directamente con el comportamiento, crecimiento somático y esquelético, morfología esquelética y procesos metabólicos del hospedero. A su vez la simbiosis es muy sensible a cambios ambientales, pudiendo ocasionar el deterioro y/o la pérdida de los simbioses y sus pigmentos fotosintéticos, fenómeno conocido como blanqueamiento, de resultados potencialmente mortales para el coral (Douglas 2003, Palumbi et al. 2014). Todo lo anterior, depende de las condiciones ambientales en las que encuentra sujeto el coral. Sin embargo, uno o varios de estos procesos pueden presentar variaciones como resultado de la aclimatación/adaptación a la presión ambiental y antropogénica y con esto favorecer la presencia o desaparición de las especies en un sitio determinado.

Dada la importancia de conocer estos cambios fisiológicos en el hospedero y los dinoflagelados simbioses, como parte de la respuesta al estrés ambiental, una alternativa actual, es la combinación de bioindicadores metabólicos (índice RNA/DNA, contenido de proteína) y autotróficos (densidad zooxantelar, clorofila a), los cuales ofrecen relativa sencillez, rapidez y accesibilidad en la investigación de arrecifes coralinos (Harithsa 2005, Hinrichs et al. 2013a, 2013b, 2013c). Para probar lo anterior, este capítulo presenta resultados de la variación estacional en el índice metabólico transcripcional (RNA/DNA) y el índice autotrófico de densidad zooxantelar, los cual se discute en función de la capacidad de aclimatación de *P. verrucosa* al historial de estrés ambiental y antropogénico en las localidades coralinas de Manzanillo.

4.2 Antecedentes

Aunado al efecto del cambio climático global por el incremento en temperatura y acidificación, entre los principales factores que afectan la salud en arrecifes, se encuentra el efecto de las escorrentías de origen terrestre y fluvial. Estos factores ocasionan disminución en la penetración de luz (turbidez), debido al exceso de nutrientes y materia orgánica particulada, así como incremento en la sedimentación y contaminación (herbicidas, pesticidas, metales pesados etc.), los cuales aumentan en temporadas de mayor precipitación (Cesar et al. 2003, Fabricius et al. 2005).

La salud de un organismo puede ser expresada en función de su tasa metabólica basal, (Speakmat 2005). Ésta constituye el conjunto de reacciones bioquímicas en reposo, y representa el nivel mínimo de energía requerida por las funciones vitales de un organismo (Valencak y Azzu 2014). De acuerdo con Hulbert y Else (2004), el concepto de tasa metabólica basal, fue desarrollado para realizar comparaciones de la actividad metabólica entre organismos. De manera que, en condiciones relativamente normales, el metabolismo basal mantiene apropiadamente la salud y funcionamiento de todo el organismo (Liu et al 2014).

Se ha visto que en condiciones de turbidez, la función metabólica, metabolismo basal o salud en corales, puede presentar adaptaciones genéticas o aclimatación fisiológica (p. ej. fotoaclimatación); en lo que respecta a la densidad algal e índice RNA/DNA, se ha reportado que ambos índices son consistentemente mayores en ambientes turbios, debido a la alta concentración de nutrientes disueltos y materia orgánica particulada (Bak y Messters 2000, Messters et al. 2002, Fabricius et al. 2005).

El aumento de la densidad zooxantelar debido al incremento en nutrientes nitrogenados se ha documentado con anterioridad (Muscatine et al. 1989, Marubini y Davies 1996, Stimson 1997). Sin embargo el enriquecimiento crónico incrementa la prevalencia y

severidad de fenómenos como el blanqueamiento y las enfermedades coralinas (Tanaka et al. 2014, Vega-Thurber et al. 2004). Asimismo, el incremento en la actividad metabólica, se ha reportado consistentemente en el índice RNA/DNA en corales, en relación con el blanqueamiento (Harithsa et al. 2005), disminución en la calidad de agua (Hauri et al. 2010), fragmentación (Mayfield et al. 2012) e incremento de temperatura y $p\text{CO}_2$ (Delgadillo-Nuño et al. 2014, Putnam et al. 2013). Todos estos factores se ven intensificados en severidad y frecuencia, por efecto del cambio climático global y las actividades humanas locales.

Un punto a considerar en la capacidad la respuesta de estrés, es la intensidad y su duración en relación al factor estresante. Se ha demostrado que tanto la densidad de simbioses como el índice RNA/DNA presentan diferencias especie-específicas y variaciones temporales y espaciales (Hinrichs et al. 2013a, 2013b, 2013c, Mayfield et al. 2012), de manera que todos los arrecifes coralinos presentan ciclos estacionales en la fisiología animal y algal (Stimson 1997, Fitt et al. 2000, Buckley y Szmant 2004).

Recientemente han incrementado los estudios sobre la respuesta de estrés térmico a nivel celular y sub-celular en corales del género *Pocillopora* (Mayfield et al. 2013a, 2013b, 2014) y particularmente, para *P. verrucosa* también se cuenta con estudios de la respuesta de estrés en la Costa del Pacífico Mexicano (Rodríguez-Troncoso et al. 2010a, 2010b, 2013, 2014), por lo que esta especie ha resultado ser un buen modelo de estudio. Particularmente en Manzanillo, Colima, se ha identificado la intercomunicación artificial con la Laguna Juluapan, como el origen de estrés ambiental/antropogénico para *Pocillopora* spp., particularmente en los parches de La Boquita (Liñan-Cabello et al. 2006, 2008, 2010).

Tomando esta especie como modelo de estudio sobre estrés fisiológico y, a partir de este historial de estrés ambiental/antropogénico, el cual presenta variaciones espaciales y estacionales, se muestran los resultados de utilizar el índice RNA/DNA y la densidad zooxantelar, para establecer la primera aproximación (dentro del presente estudio) de la respuesta de estrés fisiológico a nivel celular y sub-celular, en corales de la costa de Manzanillo, Colima.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Extracción de ácidos nucleicos del hospedero

La extracción de ácidos nucleicos de las muestras del holobionte de febrero y junio (2014) preservadas en Trizol, se realizaron de acuerdo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), con las siguientes modificaciones: 1) Una vez transferida la fase acuosa y agregado el Isopropanol, el RNA se precipitó a -20 °C toda la noche; de acuerdo al tamaño del pellet de RNA, éste se disolvió en agua libre de RNasas, 50 – 150 µl y se incubó 5 min/50 °C; 2) Una vez removida la fase acuosa, la fase orgánica se incubó a 4 °C toda la noche y de acuerdo al contenido inicial de tejido el DNA se disolvió en NaOH 40 mM, 100 – 200 µl y se incubó 10 min/60 °C; 3) La proteína total disuelta en 150 – 200 µl de SDS 1%, se incubó 10 min/50 °C para su posterior almacenamiento a -20 °C.

4.3.2 Extracción de ácidos nucleicos *Symbiodinium*

Para las muestras adicionales de junio de 2014, previo a la extracción, se aislaron los dinoflagelados endosimbiontes siguiendo el método propuesto por Zamoum y Furla (2012). Las muestras congeladas y maceradas de coral fueron colocadas en microtubos de 2 ml, se les agregó 1 ml de NaOH 1M y se incubaron a 37 °C/1 h; posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm/5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante (hospedero) y se realizaron dos lavados con amortiguador TE centrifugando a 12000 rpm/15 min 4 °C. Finalmente se agregó 1 ml

de Trizol al precipitado, conteniendo la células de *Symbiodinium* y el esqueleto de coral. La extracción de ácidos nucleicos de *Symbiodinium*, se realizó de la misma manera que en el hospedero.

4.3.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se cuantificó el RNA y el DNA midiendo la absorbancia a 260 nm (espectrofotómetro NanoDrop). La pureza de las extracciones se analizó midiendo el índice de absorbancia a 260/280 nm y se verificó la integridad los ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se realizaron diluciones del RNA (1:10) y DNA (1:5), las cuales se emplearon para determinar los índices RNA/DNA µg/µg, de la siguiente manera:

$$RNA/DNA = \frac{[(RNA \text{ ng}/\mu l)(10)](vol)}{[(DNA \text{ ng}/\mu l)(5)](vol)}$$

Donde:

ng/µl = Concentración de ácidos nucleicos obtenida en espectrofotómetro NanoDrop™

10 = Factor de dilución 1:10

5 = Factor de dilución 1:5

vol = Volumen final de resuspensión, H₂O libre de RNasa (RNA) y mM NaOH (DNA)

El RNA total fue almacenado a -80 °C, para posteriormente ser purificado, empleado en la síntesis de cDNA (RT-PCR) y este a su vez, en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR y q-PCR).

4.3.4 Cuantificación de la densidad zooxantelar

Previo a la cuantificación, las células de *Symbiodinium* sp. se aislaron del hospedero incubando las muestras en NaOH de acuerdo a lo descrito por Zamoum y Furla (2012), con la siguiente modificación: el fragmento de coral se retiró de la solución de formalina, se lavó con agua destilada y se incubó en 10 ml (V_T) de NaOH 4M a 60 °C/2 h, agitando

vigorosamente al inicio y termino de la incubación. Cuando fue necesario, la incubación se prolongó hasta blanquear el esqueleto por completo. Se utilizó una alícuota del volumen total (V_T) para la cuantificación de la densidad zooxantelar (DZ).

Para la cuantificación de la DZ, se colocaron 10 μ l del V_T de cada muestra (10 ml), en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) para el conteo celular con ayuda de un microscopio de luz transmitida (ocho conteos por muestra). Se calculó el área total (A_T) de los fragmentos previamente medidos asumiendo una forma cilíndrica ($A_T=2 \pi r [h + r]$). La DZ se expresó como células cm^{-2} , obtenida por medio de las siguientes fórmulas:

$$1) \quad \bar{X} = \frac{\sum(\text{conteo celular}_1 + \text{conteo celular}_2 + \dots + \text{conteo celular}_n)}{n=8}$$

$$2) \quad \text{células ml}^{-1} = (\bar{X})10^4$$

$$3) \quad \text{Células cm}^{-2} = [(\text{células ml}^{-1})(V_T)/A_T]$$

4.4 Resultados

4.4.1 Relación RNA/DNA

En febrero de 2014, la relación RNA/DNA en corales del sitio CW presentó el menor promedio, seguido de B1, mientras que CE y B2 presentaron el mismo promedio, mayor a los anteriores. No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el análisis estadístico (Kruskal-Wallis) en la relación RNA/DNA entre los sitios (Fig. 13 A).

En junio de 2014, el promedio de la relación RNA/DNA incrementó en todos los sitios de estudio (Fig. 13 A, B). De acuerdo con el análisis estadístico las diferencias entre ambos meses fueron altamente significativas ($P < 0.0001$). Además del aumento en los valores del índice en el mes de junio, solo el sitio CW presentó un promedio < 1 en el índice RNA/DNA (Fig. 13 B), mientras que los promedios de CE, B1 y B2 fueron

significativamente mayores con respecto al sitio CW ($P < 0.001$). Por otro lado, el índice RNA/DNA para *Symbiodinium* en el mes de junio, mostró promedios mayores en los sitios CW y B1, sin diferencias significativas ($P > 0.05$) con los sitios CE y B2. Ninguno de los sitios presentó un promedio mayor a 1.

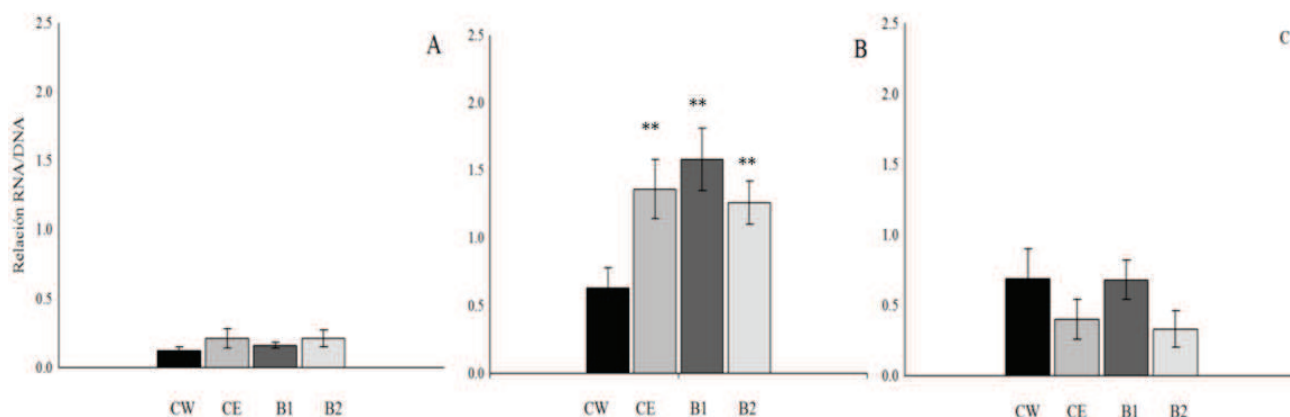


Figura 13. Relación RNA/DNA en individuos del Oeste de Carrizales (CW); Este de Carrizales (CE);, Boquita a 300 m (B1) y 250 m (B2) de distancia a la intercomunicación con la Laguna Juluapan. A) *P. verrucosa* en febrero, B) *P. verrucosa* en junio y C) *Symbiodinium* en junio. Se presenta la media de 9 individuos ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias significativas respecto a CW se muestran arriba de las barras (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

La Tabla 3, muestra los valores del índice RNA/DNA para varias especies de corales del género *Pocillopora*, incluidos los valores más altos reportados en el presente estudio. Se puede observar que nuestros valores se encuentran dentro del rango reportado para *P. verrucosa* y otras especies de *Pocillopora*, en varios sitios del Océano Pacífico.

Tabla 3. Rango de valores del índice RNA/DNA documentados para varias especies de corales escleractinios (entre ellos, el género *Pocillopora*), en estudios *in situ* y experimentos de estrés en laboratorio. Incluyendo los resultados obtenidos para *Pocillopora verrucosa*, en el presente trabajo.

Especie	Estudio	Relación RNA/DNA	Referencia
<i>Pocillopora verrucosa</i>	Variación espacial y estacional	0.1 – 1.6	Presente estudio
<i>Pocillopora</i> spp.	Trasplantes de colonias	0.2 – 1.2	(Muñiz-Anguiano 2013)
<i>Acropora</i> spp.	Variación estacional	0.3 – 3.0	(Hinrichs et al. 2013)
<i>Porites</i> spp.	Turbidez	0.6 – 1.4	(Meesters et al. 2002)
Larvas de <i>Pocillopora damicornis</i>	Estrés térmico y de acidificación	0.8 – 1.0	(Putnam et al. 2013)
<i>Acropora formosa</i> / <i>Porites lutea</i>	Blanqueamiento	0.8 – 1.2	(Harithsa et al. 2005)
<i>Montipora capitata</i> / <i>P. damicornis</i>	Variación temporal	1.0 – 3.0	(Mayfield et al. 2012)
<i>Pocillopora damicornis</i>	Estrés térmico	2.3 ± 0.2	(Mayfield et al. 2013)
<i>Montrastrea</i> spp.	Variación estacional	2.6 – 3.9	(Buckley y Szmant 2004)
<i>Pocillopora capitata</i>	Disminución de PH	2.8 ± 0.1	(Delgadillo-Nuño et al. 2014)
<i>Acropora millepora</i>	Variación físico-química	3.0 – 5.0	(Hauri et al. 2010)

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

-mark-
/sfnts
false