

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Fisiología fotosintética y potencial tóxico de especies de  
*Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y el Golfo de  
California**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Norma Valeria Ahumada Fierro**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Norma Valeria Ahumada Fierro**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Ernesto García Mendoza**  
Director de tesis

**Dra. Christine Johanna Band Schmidt**

**Dra. Laura Gómez Consarnau**

**Dr. Jose Miguel Sandoval Gil**

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**



---

**Dr. Jorge Adrián Rosales Casián**  
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Norma Valeria Ahumada Fierro** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

**Fisiología fotosintética y potencial tóxico de especies de *Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y el Golfo de California.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
**Director de tesis**

*Chattonella* es un género de rafidofitas que produce metabolitos que ocasionan la muerte de organismos marinos con repercusiones sobre la maricultura. La afinidad a irradiancias altas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: reactive oxygen species) son características del género; sin embargo, se desconoce la fisiología asociada a la producción de ROS. Se propone que la producción de los metabolitos tóxicos está relacionada con la regulación de la cantidad de luz que reciben, por lo que se estableció como objetivo general la caracterización de la relación entre la producción de estos metabolitos y los mecanismos de fotoprotección y características fotosintéticas de *Chattonella subsalsa* aislada de la Bahía de La Paz, y de dos cepas de *Chattonella* (CBTSA y CBTSB) aisladas de la Bahía de Todos Santos (BTS). Para esto, se evaluaron las características fotosintéticas, la disipación térmica de la energía independiente de la fotoquímica (NPQ, por sus siglas en inglés: Nonphotochemical energy quenching), la interconversión de pigmentos del ciclo de las xantofilas (CX) y se relacionó con la producción de metabolitos potencialmente nocivos. Las tres cepas se aclimataron a dos condiciones contrastantes de luz (43 y 300,  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; denominadas LB y LA, respectivamente). Las mediciones se realizaron al exponer a las células a una condición de estrés por luz saturante ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante 30 minutos. Las cepas CBTSA y CBTSB se identificaron mediante la caracterización del gen Citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) como *Chattonella marina* var. *antiqua* y *Chattonella* sp., respectivamente. Las tres especies crecieron en ambas condiciones de luz, pero las cepas de la BTS presentaron una tasa de crecimiento menor en LB. La tasa de crecimiento en *C. subsalsa* fue similar en ambos tratamientos. Se evaluaron las características fotosintéticas mediante las relaciones fotosíntesis-irradiancia (P-E). Se detectó que la fotosíntesis neta máxima (Pmax) y la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) normalizadas por la concentración de clorofila *a* fue similar entre las diferentes aclimataciones. La irradiancia de saturación ( $E_k$ ) fue alta para las tres especies. En promedio presentaron un  $E_k$  de  $551 \pm 90$  y  $785 \pm 110 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a LB y LA, respectivamente. El perfil pigmentario y el de ácidos grasos (AG) identificado en este trabajo corresponden a lo reportado para el género. Los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3) fueron los más abundantes, y no se detectaron diferencias importantes entre las aclimataciones. La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (FSII) (Fv/Fm) de las tres cepas, estimada mediante la detección de la fluorescencia de la clorofila *a*, disminuyó hasta un 80% del valor inicial al exponer a las células a luz saturante. Se identificó que las tres especies presentan NPQ al ser expuestas a luz saturante. Asimismo, se observó que utilizan el CX asociado a la zeaxantina- anteraxantina-violaxantina, y también presentan el ciclo asociado a la diatoxantina-diadinoxantina para disipar el exceso de energía. Estos ciclos y la inducción de NPQ están relacionados y brindaron protección al FSII. Sin embargo, se observó que el estrés por luz saturante indujo peroxidación lipídica por daño oxidativo, medido como un incremento en la concentración de malonaldehído (MDA), que fue dos veces mayor en *C. subsalsa* y *Chattonella* sp. en comparación con *C. marina* var. *antiqua*. Esto también se vio reflejado en la recuperación de Fv/Fm en oscuridad después de la exposición a luz saturante *Chattonella mar.* var. *antiqua* presentó la mayor recuperación de hasta un 80 y 90% del valor inicial de Fv/Fm, con un  $t_{1/2}$  de entre 2 y 4 minutos. Asimismo, en esta variedad la

producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) fue la más baja con una tasa de 5.2 a 8.8  $O_2^- \text{ cel}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ . Para las tres especies en las dos condiciones de aclimatación, se observó un incremento en el nivel de producción de  $O_2^-$  después de la exposición a luz saturante. Se confirmó que la producción de ROS está asociada con una baja expresión de los mecanismos de fotoprotección, y que es una vía de desexcitación del potencial de reducción que se acumula por el exceso de luz que reciben las especies de *Chattonella* en el aparato fotosintético, ya que el mecanismo de NPQ es bajo y depende de la interconversión de los pigmentos carotenoides del CX.

**Palabras clave:** *Chattonella*, fotosíntesis, luz, fotoprotección, metabolitos tóxicos

Abstract of the thesis presented by **Norma Valeria Ahumada Fierro** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

**Photosynthetic physiology and toxic potential of *Chattonella* species isolated from the Mexican Pacific and California Gulf.**

Abstract approved by:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
**Thesis Director**

*Chattonella* species are raphidophytes frequently associated with massive mortalities of marine organism worldwide. The main characteristics of this group of microalgae is their tolerance to high light and the production of extraordinary levels of reactive oxygen species (ROS). The physiology associated with the production of these metabolites is unknown. We propose that there is a relation between the production of toxic metabolites and the regulation of light received by cells. The objective of this work was to identify the relationship between the production of noxious metabolites and photoprotection mechanisms and photosynthetic characteristics of *Chattonella subsalsa* isolated from Bahía de La Paz, and two strains of *Chattonella* (CBTSA and CBTSB) isolated from Todos Santos Bay (BTS). The photosynthetic performance, pigment composition, thermal dissipation (measured as the nonphotochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence; NPQ) and the relation with production of the superoxide anion ( $O_2^-$ ) and fatty acids were evaluated in cells maintained at low light (LL, 43  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and high light (HL, 190  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Measurements were taken during 30 minutes of exposure to saturating light (1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). CBTSA and CBTSB strains were identified by sequencing the Cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (COI), as *Chattonella marina* var. *antiqua* y *Chattonella* sp, respectively. All three species grew in both acclimatization light conditions, but in LL the BTS strains presented a lower growth rate. *C. subsalsa* growth characteristics were similar between treatments. Photosynthetic characteristics were evaluated by the photosynthesis-irradiance relationship (PE) curve. Maximum net photosynthesis ( $P_{\text{max}}$ ) and photosynthetic efficiency ( $\alpha$ ) were similar in cells acclimated to both light conditions when the data were normalized per chlorophyll *a* concentration. All three species have an unusually high saturation irradiance ( $E_k$  of  $551 \pm 90$  and  $785 \pm 110 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for LL y HL, respectively). The pigment and fatty acids profiles were similar with those reported before. Palmitic (16:0), eicosapentaenoic (EPA, 20:5  $\omega$ 3) and palmitoleic (16:1) were the more abundant fatty acids, with no differences between light acclimation conditions. The photosystem II (PSII) maximum quantum yield,  $F_v/F_m$  in cells exposed to saturating light decreased up to 80% of initial value. Also, in saturating light NPQ was induced in the three species, and was associated with the xanthophyll cycle (CX) of zeaxanthin-*antheraxanthin*-violaxanthin, and also with XC of diatoxanthin-diadinoxanthin. Therefore, these XCs are involved in the dissipation of excess energy and protection of PSII. It was found that irradiance plays an important role in lipid peroxidation (measured as an increase in the concentration of malonaldehyde (MDA)), that was two times higher in *C. subsalsa* y *Chattonella* sp. Than in *C. marina* var. *antiqua*. Oxidative stress was also reflected on the recovery of  $F_v/F_m$  in darkness after saturating light exposure. The highest recovery of  $F_v/F_m$  was identified in *C. mar.* var. *antiqua*,  $F_v / F_m$  in darkness was 80 and 90% of the initial value, with a recovery  $t_{1/2}$  of 2 and 4 minutes. Also, these species presented the lowest superoxide ( $O_2^-$ ) production rate (5.2 to 8.8  $O_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ). All three species showed an increase in the level of  $O_2^-$  production after the exposure to saturating light. It was confirmed that the level of ROS production is associated with a low expression of photoprotective mechanisms. ROS production represents a de-excitation route in the photosynthetic apparatus of the excess of light that *Chattonella* species receive, because NPQ is low and it is mainly controlled by the interconversion of CXs carotenoids.

**Keywords:** *Chattonella*, photosynthesis, light, photoprotection, toxic metabolites

## Dedicatoria

A mis padres y hermanas.  
Con mucho amor.

## Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)**, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado como parte del programa de Maestría en Ecología Marina

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo de la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado, con el número de becario 634552.

A mi director de tesis, **Dr. Ernesto García Mendoza** por guiarme en el proceso, por mostrarme con entusiasmo el bello mundo de la fotobiología, por resolver con paciencia cada una de mis dudas, y por intentar comprender a *Chattonella*.

A mis **sinodales**: Dra. Christine Band Schmidt, Dr. Jose Sandoval, Dra. Laura Gómez y Dr. Jorge Cáceres por su disposición, conocimiento y tiempo brindado.

Al **proyecto #260040** denominado Consolidación del laboratorio FICOTOX y grupo de investigación regional para la atención a la problemática asociada a ficotoxinas marinas en el Noreste de México por la beca otorgada para concluir el proyecto de tesis.

A la Red Temática para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos (**RedFAN**) por el apoyo económicos otorgado para asistir al congreso SOMEFAN 2019.

A los **investigadores** que me abrieron las puertas de sus laboratorios: Dra. Asunción Lago, Dr. Helmut Masket, Dr. Juan Pablo Lazo (CICESE), Dr. Jose Sandoval (IIO-UABC), Dra. Katrin Quester, Dra. Karla Juárez (UNAM)

A todos los **investigadores, técnicos y estudiantes** que dedicaron tiempo y esfuerzo para realizar experimentos y mediciones: M. en C. César Almeda, M. en C. Ramón Murillo, Dr. Abelardo Campos, Dra Jennyfer Chong, Dra. María Dolores Belando, M. en C. Laura Rangel, M. en C. Alejandra Ferreira, M. en C. Jennifer Méndez, M. en C. Rigel Castañeda, Biol Mar. Ángeles Horta, Biol Mariel Juárez, Dr. Ricardo Cruz y a la Dra. Yamne Ortega (gracias Yam por tanta paciencia).

A la **Dra. Christine Band Schmidt** por la donación de las cepas para complementar este trabajo. Al **Biol. Erick Núñez** por facilitar el tan buscado reactivo.

A mis compañeras de **Biología Algal**: Miriam, Marilyn, Mariel, Michelle y Ángeles, por su apoyo técnico y moral, por hablarme y no hacerlo cuando lo necesité. Por todo.

A aquellos que compartieron tiempo y conocimiento en las reuniones de **conocimiento algal**.

A mis **maestros y compañeros** del posgrado (generación 2017). Aprendí tanto de ustedes.

A la **Dra. Mary Carmen Ruíz**, porque todo aquel que inculque el amor a la ciencia merece un agradecimiento

A los **amigos** que encontré en CICESE. Gracias por hacer que esta etapa fuera tan divertida. A mis **amigas** Melina, Denice y Ángeles, gracias por siempre estar. Los quiero.

A mis **papás y hermanas**, por su apoyo incondicional, y por tanto amor.

## Tabla de Contenido

Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	v
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1    Introducción general.....	1
1.2    Antecedentes.....	4
1.2.1    Fotosíntesis.....	4
1.2.2    Fotoprotección.....	6
1.2.3    El género <i>Chattonella</i> .....	7
1.3    Hipótesis.....	12
1.4    Objetivos.....	13
1.4.1    Objetivo general.....	13
1.4.2    Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología.....	14
2.1    Identificación molecular.....	14
2.1.1    Mantenimiento de las cepas.....	14
2.1.2    Extracción de ADN.....	14
2.1.3    Amplificación.....	14
2.1.4    Análisis de las secuencias y reconstrucción filogenética.....	16
2.2    Crecimiento.....	16
2.2.1    Condiciones experimentales de cultivo.....	16
2.2.2    Curvas de crecimiento.....	17
2.3    Fotobiología.....	18
2.3.1    Curvas fotosíntesis vs. irradiancia P-E.....	18
2.3.2    Mediciones de NPQ y Fv/Fm.....	19
2.3.3    Análisis de Pigmentos.....	20
2.4    Producción de metabolitos tóxicos.....	22
2.4.1    Ácidos grasos.....	22
2.4.2    Peroxidación lipídica.....	23

2.4.3	Producción de ROS .....	24
2.5	Estadística.....	24
Capítulo 3.	Resultados.....	25
3.1	Identificación molecular .....	25
3.2	Características de crecimiento poblacional .....	28
3.3	Características fotosintéticas .....	31
3.3.1	Concentración de pigmentos.....	34
3.4	Mecanismos de fotoprotección .....	35
3.4.1	Evaluación de la eficiencia cuántica máxima .....	35
3.5	Inducción y disipación de NPQ.....	38
3.5.1	Interconversión de pigmentos carotenoides .....	42
3.5.2	Inducción de NPQ en presencia de un inhibidor del CX.....	49
3.6	Producción de metabolitos secundarios con potencial tóxico .....	51
3.6.1	Ácidos grasos .....	51
3.6.2	Producción de anión superóxido .....	53
3.6.3	Peroxidación lipídica .....	54
Capítulo 4.	Discusión .....	56
4.1	Identificación molecular .....	56
4.2	Características de crecimiento poblacional .....	57
4.3	Características fotosintéticas .....	59
4.3.1	Concentración de pigmentos.....	61
4.4	Mecanismos de Fotoprotección.....	62
4.4.1	Evaluación de la eficiencia cuántica máxima .....	62
4.4.2	Inducción y disipación de NPQ .....	64
4.4.3	Interconversión de pigmentos carotenoides .....	65
4.5	Producción de metabolitos tóxicos.....	68
4.5.1	Ácidos grasos .....	68
4.5.2	Anión superóxido.....	69
4.5.3	Peroxidación lipídica .....	71
Capítulo 5.	Conclusiones .....	73
Literatura citada	.....	74

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador ITS del ADNr. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de <i>Chattonella</i> aisladas en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con <i>Prorocentrum micans</i> como grupo externo.....	27
2 . Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador LSU del ADNr. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de <i>Chattonella</i> aisladas en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con <i>Prorocentrum micans</i> como grupo externo.....	27
3. Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador COI. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de <i>Chattonella</i> aisladas en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con <i>Cochlodinium strangulatum</i> como grupo externo. ....	28
4. Abundancia celular de <i>C. mar. var. antiqua</i> (triángulos), <i>Chattonella</i> sp. (círculos) y <i>C. subsalsa</i> (cuadros) en condiciones de luz baja (símbolos cerrados) (A) y de luz alta (símbolos abiertos) (B). Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día. El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas.....	30
5. Curvas P-E (fotosíntesis-irradiancia) de <i>C. mar. var. antiqua</i> (triángulos), <i>Chattonella</i> sp. (círculos) y <i>C. subsalsa</i> (cuadros) en células aclimatadas a condiciones de luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). La fotosíntesis neta se presenta en $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ (A, B y C) y normalizada por el contenido de Chl <i>a</i> en $\text{pmol}$ (C, D y E). ....	33
6. Cambio en la eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) durante la exposición a luz saturante ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y en oscuridad en células de <i>C. mar. var. antiqua</i> (triángulos), <i>Chattonella</i> sp. (círculos) y <i>C. subsalsa</i> (cuadros) aclimatadas a luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del $F_v/F_m$ detectado antes de la exposición a luz saturante. ....	36
7. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) del PSII en oscuridad, posterior a la exposición a luz saturante ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para <i>C. mar. var. antiqua</i> (triángulos), <i>Chattonella</i> sp. (círculos) y <i>C. subsalsa</i> (cuadros) aclimatadas a luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). La línea representa el ajuste al modelo propuesto por Hanelt (1998). No se presenta la recuperación de <i>C. subsalsa</i> aclimatada al alta luz. ....	38

8. Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella marina* var. *antiqua* aclimatadas a 43  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Baja, símbolos cerrados) y 300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Alta, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar. .... 39
9. Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella* sp. aclimatadas a 43  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Baja, símbolos cerrados) y 300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Alta, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar. .... 40
- 10 . Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella subsalsa* aclimatadas a 43  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LB; símbolos cerrados) y 300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LA, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar..... 41
11. Cambios en la concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (XC) violaxantina, anteraxantina y zeaxantina (barras) y cambios en estado de desepoxidación del XC (DPS) (líneas) durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *C. mar. var. antiqua* (triángulos, A y D), *Chattonella* sp. (círculos, B y E) y *C. subsalsa* (cuadros, C y F). aclimatadas a Luz Baja (símbolos cerrados, A, B y C) y Luz Alta (símbolos abiertos, D, E y F) Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. .... 43
12. Concentración de Diadinoxantina (A y C) y Diatoxantina normalizados por la concentración de Chl *a* (barras), y los cambios del grado de desepoxidación (DPS) (líneas) de los pigmentos durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Luz Baja (símbolos cerrados, A, B y C) y Luz Alta (símbolos abiertos, D, E y F) de las cepas *C. mar. var. antiqua* (triángulos, A y D), *Chattonella* sp. (círculos, B y E) y *C. subsalsa* (cuadros, C y F). Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. .... 46
13. Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) y el estado de desepoxidación del conjunto de pigmentos del ciclo de xantofilas (DPS) durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella* sp. (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) aclimatadas a Luz Baja (símbolos cerrados) y Luz Alta (símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas y su desviación estándar. El DPS que considera el ciclo violaxantina azeaxantina se presenta en los paneles A, B , y C, y el DPS que incluye a la diadinoxantina y diatoxantina se presenta en los paneles D, E y F. El borde azul señala muestras en oscuridad (tiempo de recuperación). .... 48
14. Inducción de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante (1,400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en *Chattonella subsalsa* aclimatadas a luz alta (190  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ( cuadros abiertos) y células tratadas con DTT (cuadros rojos). .... 50

15. Producción del anión superóxido ( $\text{pmol O}_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ) en *C. mar.* var. *antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatados a luz baja (barras negras,  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (barras blancas,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), en oscuridad (A) y después de 30 min de exposición a luz saturante de  $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (B). ..... 54
16. Concentración de MDA ( $\text{pmol cell}^{-1}$ ) en *C. mar.* var. *antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja (LB,  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) en oscuridad (A) y después de 30 min de exposición a luz saturante (B). La diferencia en la concentración de MDA entre los dos tratamientos se presenta como porcentaje del incremento de la concentración detectada en oscuridad (C). Los asteriscos representan un incremento significativo según la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ). ..... 55

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las tres regiones de ADNr.....	15
2. Divergencia evolutiva del gen COI de las cepas de <i>Chattonella</i> aisladas de la BTS con otras cepas, especies de rafidofitas y del dinoflagelado <i>P. micans</i> , método de Kimura-2.....	26
3. Tasa específica de crecimiento (día <sup>-1</sup> ) y tiempo de generación (día) de <i>C. mar. var. antiqua</i> , <i>Chattonella</i> sp. y <i>C. subsalsa</i> cultivadas en luz baja (LB, 43 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA, 300 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) descrito por el modelo de crecimiento de Gompertz.....	29
4. Parámetros fotosintéticos de especies de <i>Chattonella</i> cultivadas en dos intensidades de luz. Se presenta el promedio y desviación estándar (tres mediciones independientes) de la tasa fotosintética máxima ( $P_{\text{max}}$ ) y tasa de respiración en oscuridad (R) en $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ , la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}(\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1})^{-1}$ , y la irradiancia de saturación ( $E_k$ ) y de compensación ( $E_c$ ) en $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ . .....	31
5. Parámetros fotosintéticos de las especies de <i>Chattonella</i> en las dos condiciones de estudio normalizados con el contenido de Chl a en pmol. Se presentan los valores promedio y desviación estándar de la tasa fotosintética máxima ( $P_{\text{max}}$ ) y tasa de respiración en oscuridad (R) en $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ pmol Chl a}^{-1}$ , y la pendiente inicial de la fotosíntesis o eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ pmol Chl a}^{-1}(\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1})^{-1}$ . .....	32
6. Concentración de pigmentos en $\text{pmol cell}^{-1}$ , y la razón molar molar de Chl c1+c2 y fucoxantina a con respecto a Chl a en las tres cepas de <i>Chattonella</i> aclimatadas a luz baja (LB) y luz alta (LA). .....	35
7. Concentración de pigmentos carotenoides de los ciclos de las xantofilas presentes en las cepas de <i>Chattonella</i> aclimatadas en las dos aclimataciones de luz. La concentración se presenta normalizada a la concentración de de clorofila a (mol de pigmento mol de Chl a <sup>-1</sup> ). Se presenta asimismo, la concentración total de los pigmentos de ambos ciclos ( $\Sigma\text{CX}$ ). .....	42
8. NPQ y DPS a los 30 min de exposición a luz saturante en células de las cepas de estudio incubadas con (DTT) y sin DTT (control).....	50
9. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de <i>C. mar. var. antiqua</i> , <i>Chattonella</i> sp. y <i>C. subsalsa</i> aclimatadas a luz baja (LB, 43 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA, 300 $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ). Los valores representan el promedio de dos mediciones. Se resaltan los ácidos grasos con el mayor porcentaje identificado.....	52

10. Concentración ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de los principales ácidos grasos de *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella sp.* y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja (LB,  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Se presentan el promedio de dos mediciones. Se presenta la relación que existe entre la concentración a luz baja con la de la luz alta ..... 53

## Capítulo 1. Introducción

---

### 1.1 Introducción general

La luz es la variable más importante para el crecimiento y productividad del fitoplancton (Perrine *et al.*, 2012). Por medio de la fotosíntesis, utilizan la energía de la luz para sintetizar compuestos orgánicos de carbono, un proceso altamente regulado en respuesta a las condiciones ambientales (Falkowski y Raven, 2007). En los ecosistemas acuáticos la cantidad de luz que reciben los microorganismos puede variar en cuestión de segundos, debido a los procesos de mezcla, corrientes y mareas, o fluctuaciones de irradiancia asociados al oleaje, así como la migración vertical en la columna de agua lo cual puede representar un factor de estrés para el metabolismo de los organismos autótrofos (Falkowski y LaRoche, 1991; Smerilli *et al.*, 2017). En consecuencia, el fitoplancton ha desarrollado la capacidad de adaptarse a las variaciones de irradiancia en su ambiente. El fitoplancton ajusta la función y composición de su maquinaria fotosintética a determinadas condiciones lumínicas para lograr un equilibrio entre el número de fotones absorbidos y su utilización para la fotosíntesis, lo que se denomina fotoaclimatación (Blankenship, 2002; Smerilli *et al.*, 2017; Berne *et al.*, 2018).

Cuando el fitoplancton está expuesto a niveles de irradiancia altos y no logra disipar el exceso de energía en forma segura, esta puede ocasionar un daño en el aparato fotosintético, específicamente en el centro de reacción del fotosistema II (FSII), y en consecuencia una reducción en la tasa fotosintética, lo que se denomina fotoinhibición (Farber *et al.*, 1997; Ting y Owens, 1994). Los organismos fotosintéticos han desarrollado mecanismos de fotoprotección para minimizar la degradación de proteínas del aparato fotosintético en presencia de luz alta. El más importante es la disipación térmica de la energía independiente de la fotoquímica (o NPQ, por sus siglas en inglés: Nonphotochemical energy quenching). El NPQ es fundamental para reducir el daño al FSII ya que reduce la presión energética sobre este sistema (Lavaud y Goss, 2014). Se trata de un proceso complejo que se lleva a cabo tanto en el centro de reacción, así como en las antenas pigmentarias del FSII. Se han caracterizado tres procesos moleculares que contribuyen en la formación del NPQ: el quenching energético (qE), el quenching fotoinhibitorio

(qI) y el quenching de transición (qZ) (García-Mendoza *et al.*, 2002; Berne *et al.*, 2018). El NPQ se mide indirectamente mediante la señal de fluorescencia emitida por la clorofila *a* (Chl *a*) del FSII.

En el NPQ intervienen varios componentes, uno de ellos es el Ciclo de las Xantofilas (CX). Este ciclo consiste en la interconversión de pigmentos carotenoides, por medio de la desepoxidación de la violaxantina (Vx) a anteraxantina (Ax) y de esta a zeaxantina (Zx), o de diadinoxantina (Ddx) a diatoxantina (Dtx) en luz alta según el grupo del fitoplancton. Esta reacción se presenta en condiciones de luz alta y la reacción opuesta es la epoxidación, que se realiza en la oscuridad (García-Mendoza *et al.*, 2002). Los pigmentos desepoxidados (Zx y Dtx) actúan como pigmentos fotoprotectores, al disipar el exceso de energía en forma de calor, protegiendo de esta manera al FSII del daño oxidativo (Niyogi, 1999).

El NPQ evita la sobreexcitación del FSII y reduce la formación de tripletes de Chl *a* (3Chl \*), un potente fotosensibilizador que reacciona con el oxígeno para formar especies de reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Smerilli *et al.*, 2017). El anión superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son los radicales libres del oxígeno. Estas moléculas son altamente inestables, y al estar en contacto con biomoléculas vitales como el ADN, los lípidos, las proteínas y las enzimas pueden ocasionar la muerte celular (Marshall *et al.*, 2003; Diaz y Plummer, 2018).

La producción extracelular de ROS se considera un mecanismo que modula las interacciones biológicas, como por ejemplo la alelopatía. Se ha observado que la producción extracelular de ROS disminuye el pastoreo por zooplancton y las infecciones virales, y al mismo tiempo favorece al crecimiento y adquisición de hierro de las células (Diaz y Plummer, 2018). Además, los florecimientos algales (FA) de especies de fitoplancton que producen concentraciones altas de ROS están asociadas con la mortandad masiva de organismos marinos como peces y moluscos, entre otros, que han provocado pérdidas económicas importantes para la acuicultura a nivel mundial (Imai y Yamaguchi, 2012). Las ROS provocan diversas lesiones en los organismos, por ejemplo dañan el tejido branquial de los peces, lo que conlleva a la muerte de estos organismos (Kim y Oda, 2010).

De las más de 100 especies de fitoplancton marino que han sido identificadas como tóxicas o nocivas, las del género *Chattonella* son consideradas las más nocivas (Cho *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2007). *Chattonella* spp. produce hasta 100 veces más aniones superóxido ( $O_2^-$ ) que otras especies de fitoplancton, y se ha sugerido que es un subproducto de la fotosíntesis producido por el ciclo del NADPH, y es liberado a través de la glicocalix (Kim *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002a). Sin embargo, la producción de ROS no define por si solo el potencial tóxico de estas especies, la producción de lípidos es de suma importancia, y especialmente los ácidos grasos libres (AG) presentes en las membranas celulares de los organismos vivos, que al reaccionar con las ROS, causan una reacción en cadena acompañada de la formación de una amplia variedad de subproductos, que son tóxicos y causan daños en los organismos por medio de la peroxidación lipídica (Dorantes-Aranda *et al.*, 2009)

Se desconoce por qué las especies del género *Chattonella* producen una cantidad de ROS tan alta que la convierte en un género con potencial nocivo. Se considera que si esto depende del trabajo fotosintético, entonces existe una relación directa entre la regulación de este proceso con la producción de ROS. Una de las características fisiológicas particulares de este género, es que tolera niveles altos de irradiancia, manteniendo tasas de crecimiento máximas hasta los 600  $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$  (Imai y Yamaguchi, 2012).

En la mayoría de los grupos algales la tasa máxima de crecimiento se presenta en irradiancias cercanas a la de compensación, y a irradiancias saturantes decae la tasa máxima de crecimiento debido a la fotoinhibición. Esto indica que *Chattonella* tiene mecanismos de fotoprotección eficientes que le permite reducir la fotoinhibición a irradiancias que son estresantes para otras microalgas. Sin embargo, Warner y Madden (2007), identificaron la ausencia de cambios significativos en NPQ al exponer a las células de *C. subsalsa* a irradiancias altas, y contrario a lo esperado, no se presentó fotoinhibición. Asimismo, observaron una disminución en el número de centros de reacción del FSII, pero se mantuvo la actividad fotoquímica a través de un menor transporte de electrones para evitar la posible fotoinhibición.

Si *Chattonella* no utiliza la inducción de NPQ a través de CX como mecanismos de fotoprotección, entonces la producción de ROS juega un papel importante en la reducción de

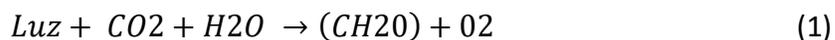
presión en el FSII, al utilizar el poder reductor (NADPH) producido a través de la fotosíntesis. Por lo tanto, se plantea como hipótesis de trabajo que el potencial tóxico (producción de metabolitos secundarios nocivos) de las cepas de *Chattonella* aisladas de distintas regiones del Pacífico mexicano y del Golfo de California está relacionado con su fisiología fotosintética y mecanismos de fotoprotección. Por ello, se evaluaron las características fotosintéticas, inducción de NPQ, interconversión de pigmentos del CX y se relacionó con la producción de metabolitos potencialmente nocivos en tres especies de *Chattonella* aclimatadas a dos condiciones contrastantes de luz.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se forman compuestos orgánicos ricos en energía a partir de la energía lumínica (Beer *et al.*, 2014). Aproximadamente el 45% de la fotosíntesis global ocurre en ambientes acuáticos. En prácticamente todos los ecosistemas acuáticos, la materia orgánica que es base para el crecimiento y las demandas metabólicas de todos los demás organismos, es suministrada por la fotosíntesis (Falkowski y Raven, 2007).

Los elementos básicos necesarios para la fotosíntesis oxigénica son la luz, el carbono inorgánico y el agua. La fórmula simplificada para la fotosíntesis es:



donde CH<sub>2</sub>O representa el carbohidrato que contiene alta energía. Todo el proceso ocurre dentro de los cloroplastos en los fotótrofos eucariontes e involucra componentes inmersos o unidos en la membrana tilacoidal, un sistema de membranas lipoprotéicas, y asociadas a ellas se encuentran los complejos proteico-pigmentarios involucrados en la captura de la luz y los procesos de transferencia de la energía (Blankenship, 2002; Falkowski y Raven, 2007; Beer *et al.*, 2014).

Aunque parece una reacción simple, se trata de un proceso químico de reacciones oxidoreductoras (redox) que involucra a un gran número de moléculas que cumplen funciones específicas en las dos etapas del proceso (clara y oscura). En la etapa clara se involucran reacciones en las que la energía de la luz se convierte en energía química (ATP) y el poder reductor se forma como NADPH. Mientras que en la etapa oscura o de síntesis, se utiliza el potencial químico generado (ATP y NADPH) para fijar el CO<sub>2</sub> a azúcares (Blankenship, 2002; Falkowski y Raven, 2007; Beer *et al.*, 2014).

La etapa clara de la fotosíntesis comienza con la absorción de la luz a través de los pigmentos fotosintéticos; la absorción de un fotón que crea un estado excitado, el cual eventualmente por medio de la transferencia primaria de electrones en los centros de reacción, logra la excitación de 2 moléculas de clorofila, P680 en el fotosistema II (FSII) y P700 en el fotosistema I (FSI). La separación de cargas da como resultado la oxidación de P680 y P700. El potencial redox generado oxida una molécula de H<sub>2</sub>O en el FSII, lo cual genera  $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub>, 2H<sup>+</sup> y 2e<sup>-</sup>. Estos electrones son transportados por moléculas asociadas a complejos proteicos embebidos en las membranas tilacoides, y por moléculas libres (proceso conocido como el diagrama Z) hasta la ferredoxina (Fd), que dependiendo de las necesidades celulares, esta puede reducir al NADP<sup>+</sup> vía la Ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa o para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa. En paralelo, se lleva a cabo la formación de adenosin-tri-fosfato (ATP) a través de un bombeo protones acumulado en el lumen mediante de una ATP sintasa (Blankenship, 2002; Falkowski y Raven, 2007; Beer *et al.*, 2014).

La fotosíntesis se puede medir mediante la tasa de incorporación de carbono o de manera más sencilla, como la evolución de oxígeno, al ser subproducto de este proceso. Medir la fotosíntesis función de la irradiancia es lo que se conoce como curvas de fotosíntesis-irradiancia (P-E), es una de las aproximaciones más sólidas para evaluar la fisiología fotosintética de los autótrofos.

De esta forma se evalúan diferentes características fisiológicas. La respiración (R), que se calcula en oscuridad. Al exponer a los organismos a irradiancias cercanas a la de compensación se puede evaluar  $\alpha$ , que es la pendiente inicial de la fotosíntesis y está relacionada el rendimiento cuántico máximo de la fotosíntesis. Se puede estimar la fotosíntesis máxima (Pmax), es decir

cuando se detecta la tasa fotosintética más alta independiente de un aumento de la irradiancia. Asimismo, se puede evaluar la fotoinhibición o  $\beta$ , que es una disminución de la tasa fotosintética a irradiancias saturantes (Colombo-Pallotta, 2006; Beer *et al.*, 2014).

### 1.2.2 Fotoprotección

En los sistemas acuáticos la cantidad de luz que reciben los organismos es altamente variable, lo cual tiene repercusiones en el proceso fotosintético. Los períodos de poca luz pueden limitar a la fotosíntesis. Sin embargo, el exceso de luz puede ocasionar una degradación de la proteína D1, la cual forma el centro de reacción FSII, y en consecuencia una reducción en la tasa fotosintética, es decir causa una fotoinhibición (Farber *et al.*, 1997; Beer *et al.*, 2014).

Los organismos presentan mecanismos que disipan el exceso de energía absorbida a procesos distintos de la fotosíntesis, o bien disminuyen la absorción de energía (luz) en el aparato fotosintético (Beer *et al.*, 2014). La disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ), es fundamental para reducir el daño al FSII ya que reduce la presión energética sobre este sistema (Lavaud y Goss, 2014). Este es un proceso complejo que se lleva a cabo tanto en el centro de reacción, así como en las antenas pigmentarias del FSII. Se han caracterizado tres procesos moleculares que contribuyen en la formación del NPQ: el quenching energético (qE), el quenching fotoinhibitorio (qI) y el quenching de transición (qZ) (García-Mendoza *et al.*, 2002; Berne *et al.*, 2018). Tanto en plantas como en algas verdes, se ha observado que el componente qE, es el componente más importante del NPQ total, se induce y disipa en menor tiempo (segundos), y puede disipar hasta el 80% de la energía en forma de calor. Mientras que el qI y el qZ prevalecen durante periodos de exposición largos a luz saturante (Berne *et al.*, 2018).

En contraste con plantas superiores, en algas pardas no existe un componente qE y la inducción de NPQ es dependiente de la presencia de carotenoides desepoxidados (qZ) producidas a través del ciclo de las xantofilas (CX). Este ciclo consiste en la interconversión de pigmentos carotenoides, por medio de la desepoxidación de la violaxantina (Vx) a anteraxantina (Ax) y de esta a zeaxantina (Zx), o de diadinoxantina (Ddx) a diatoxantina (Dtx) en luz alta según el grupo

del fitoplancton. Esta reacción se lleva a cabo en exceso de luz mediante la activación de la enzimas violaxantina de-epoxidasa (VDE) o diadinoxantina de-epoxidasa vía acidificación del lumen de los tilacoides y la presencia de ascorbato. La acidificación del lumen es el resultante de la translocación intensiva de protones a través de la membrana de tilacoides en luz saturante. Como se trata de un ciclo, en condiciones de poca luz y pH más alto ( $\sim 7.5$ ), ocurre la reacción inversa, la zeaxantina o diatoxantina se convierte nuevamente en violaxantina o diadinoxantina mediante la activación de la enzima epoxidasa (García-Mendoza *et al.*, 2002; Colombo-Pallotta, 2006; Beer *et al.*, 2014; Berne *et al.*, 2018).

El aumento de la tasa fotosintética conduce a una mayor concentración de xantofilas de-epoxidizadas en la antena de FSII, que a su vez aumenta la tasa de desexcitación de las clorofilas excitadas a través de la disipación de calor. Por lo que existe una correlación entre NPQ y el CX (Berne *et al.*, 2018). Una manera de medir esta disipación térmica es mediante la reducción de la fluorescencia máxima del FSII.

El NPQ evita que la sobreexcitación del FSII ocasione la formación de tripletes de Chl *a* ( $3\text{Chl}^*$ ), un potente fotosensibilizador que reacciona con el oxígeno para formar ROS (Smerilli *et al.*, 2017). Las ROS son los aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radicales libres hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que en altas concentraciones pueden desnaturalizar enzimas, despolimerizar polisacáridos, causar daños genéticos y con ello ocasionar la muerte celular (Marshall *et al.*, 2003). Los mecanismos de protección a la exposición a altas intensidades influyen en el éxito ecológico del fitoplancton, ya que reducir el costo de la reparación del FSII causada por el fotodaño, puede representar una ventaja competitiva (Van Leeuwe *et al.*, 2005).

### 1.2.3 El género *Chattonella*

*Chattonella* es un género de rafdofitas pertenecientes a la clase Raphidophyceae, del filo Ochrophyta. Son conocidas mundialmente por el efecto negativo que pueden causar en distintos organismos marinos de importancia en la maricultura, por lo que se les considera nocivas. En la costa de Malabar, India se reportó por primera vez un florecimiento de

*Chattonella* (*C. marina*, reportada originalmente como *Hornellia marina*), el cual estuvo asociado a la mortandad masiva de peces (Subrahmanyam, 1954). Este género se ha reportado en regiones tropicales, subtropicales y templadas del sudeste y este de Asia, América del norte, Nueva Zelanda, Brasil, Egipto, y Europa (Mar del Norte y Mar Mediterráneo) (Imai y Yamaguchi, 2012). En México se ha registrado el género a lo largo de la costa del océano Pacífico, así como en el Golfo de México, y principalmente en el Golfo de California (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Bravo-Sierra, 2004; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; García-Mendoza *et al.*, 2016; García-Mendoza *et al.*, 2018).

Se trata de células móviles e independientes, que miden de 20 a 130  $\mu\text{m}$  de largo, y tienen una forma ovoide, alargada o piriforme. Presentan un gran número de cloroplastos de color amarillo, dorado y verde, con clorofila *a* y *c*. Poseen dos flagelos, uno le permite moverse de forma dinámica, y el otro no se mueve (Hallegraeff y Hara, 1995; Van den Hoek *et al.*, 1995; Imai y Yamaguchi, 2012; Horiguchi, 2016). La membrana celular carece de una estructura rígida que las proteja y solo poseen un glicocálix en la superficie. Por lo tanto, las células son frágiles y es difícil conservarlas con métodos tradicionales de preservación, debido a la ocurrencia de cambios osmóticos durante la fijación (Katano *et al.*, 2009).

De acuerdo a las características morfológicas se han identificado cinco especies pertenecientes al género *Chattonella*; *C. antiqua* (Hada) Ono 1980, *C. marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara 1982, *C. minima* Hara et Chihara 1994, *C. ovata* Hara et Chihara 1994 y *C. subsalsa* Biecheler 1936 (Imai y Yamaguchi, 2012). Sin embargo, existe una gran similitud morfológica entre las especies y además las células son susceptibles a los métodos de fijación, por lo que utilizar la morfotaxonomía (estudios de ultraestructura) para identificarlas es poco confiable (Katano *et al.*, 2009). Asimismo, los perfiles de pigmentos, ácidos grasos y esteroides no representan un valor quimiotaxonomico para diferenciar a las especies (Mostaert *et al.*, 1998, Marshall *et al.*, 2002c). Por lo que la mejor técnica de identificación actual es la biología molecular.

Basados en la diversidad genética de las regiones nucleares de ADNr ITS, el gen *rbcL* del cloroplasto, el gen *COI* de la mitocondria y la región de microsatélites, Demura *et al.* (2009) propusieron una revisión taxonómica en la que se reclasifican a *C. antiqua*, *C. marina* y *C. ovata*

como variedades de la especie *C. marina*. Por lo tanto, actualmente solo se reconocen tres especies para el género *C. minima*, *C. subsalsa* y *C. marina*. La última especie consiste de las variedades: *C. marina* var. *antiqua* (Hada) Demura y Kawachi, *C. marina* var. *ovata* (Y. Hara y Chihara) Demura y Kawachi, y *C. marina* var. *marina* (Subrahmanyam) Demura y Kawachi.

Esta reclasificación se sustenta, asimismo en trabajos previos. Hosoi-Tanabe *et al.* (2006), reconocieron que las secuencias de la región 18S de *C. antiqua*, *C. marina* y *C. ovata* son idénticas, mientras que las secuencias de la región D1/D2 en los genes 28S, 5.8S y la región ITS presentan mayor variabilidad. Sin embargo, confirman que existe una relación muy cercana entre *C. antiqua*, *C. marina* y *C. ovata*. Por su parte, Bowers *et al.* (2006) al comparar la subunidad pequeña del ARN ribosomal (18S), las regiones ITS 1 y 2, 5.8S y el plásmido codificado en la región SSU ARNr (16S) identificaron que existe una gran similitud (99-100%) entre las secuencias que ellos obtuvieron y las secuencias de *Chattonella* alrededor del mundo que son depositadas en GenBank. Asimismo identificaron un complejo formado por *C. marina*, *C. ovata* y *C. antiqua*, el cual también identificó Demura *et al.* (2009), y nombró como “clado Chamo”.

La propuesta de Demura *et al.* (2009) ha sido aceptada, ya que en las secuencias de las regiones 5.8S, ITS y COI, así como el gen ribosomal, no se han identificado diferencias importantes entre las variedades de *C. marina* (Band-Schmidt *et al.*, 2012; Attaran-Fariman y Bolch, 2014; Nafisyah *et al.*, 2018).

Como se mencionó los florecimientos de este género han causado importantes pérdidas económicas. El record en daños fue ocasionado por *C. antiqua* en 1972 en Harima-Nada, Japón, donde un FAN de esta especie provocó la mortandad de 14.2 millones de individuos de atún aleta amarilla, con pérdidas económicas de alrededor de 90 millones de dólares estadounidenses (Imai y Yamaguchi, 2012). Por esto, es importante comprender los mecanismos que promueven la formación de un florecimiento de este género. La investigación sobre este género se ha centrado en los factores ambientales que promueven el crecimiento, así como la fisiología, ecología y toxicidad de *Chattonella* (Imai y Yamaguchi, 2012).

Los factores más importantes que afectan el crecimiento de *Chattonella* son la irradiancia, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes. Se ha observado que toleran intervalos amplios tanto de temperatura (15 a 32°C) y salinidad (10 a 35). Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento varía entre las especies e incluso entre variedades (Zhang *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2008; Imai y Yamaguchi, 2012; Kok *et al.*, 2019). Las células de *Chattonella* generalmente se dividen una vez al día, y esta división ocurre generalmente en oscuridad.

Una de las características más importantes sobre este género, es que tolera niveles altos de irradiancia, puede crecer hasta en una irradiancia constante de 600  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con una tasa de crecimiento mayor a 1 div día<sup>-1</sup> (Zhang *et al.*, 2006; Warner y Madden, 2007; Imai y Yamaguchi, 2012). La afinidad a alta luz se ha identificado también en el medio natural. Handy *et al.* (2005) identificaron que *C. subsalsa* migra a la superficie durante las horas pico de luz solar, cerca del mediodía y posteriormente regresa a una mayor profundidad por la noche. Este es un comportamiento opuesto al de la mayoría del fitoplancton, al utilizar la migración vertical para evitar la exposición a irradiancias altas, así como el pastoreo (Lalli y Parsons, 1997).

Se desconocen los mecanismos o vías fisiológicas que este género emplea para el procesamiento de la luz, y es poca la información que existe sobre los mecanismos que utiliza como fotoprotección. Tilney *et al.* (2015) en laboratorio identificó patrones de migración vertical asociada a cambios en la fotoquímica del FSII, y observó una reducción en la eficiencia cuántica máxima del FSII (Fv/Fm) en superficie (máxima irradiancia), pero con un valor máximo en la fijación de carbono. Estos autores sugieren que *C. subsalsa* implementa mecanismos fotoprotectores efectivos para prevenir la fotoinhibición.

Warner y Madden (2007), midieron la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de *C. subsalsa*, e identificaron una disminución de Fv/Fm cuando se expuso a luz saturante (3,000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sin embargo la disminución no fue tan grande como la que presentó el dinoflagelado *Prorocentrum minimum*. Asimismo, identificaron que no existieron cambios en NPQ aun cuando la presión de excitación aplicada al FSII fue importante durante varios días. Por lo tanto, ya que al parecer no utiliza NPQ, sugieren que *C. subsalsa* al ser expuesta a irradiancias altas por

periodos de tiempo largos regula el número de centros de reacción funcionales de PSII (manteniéndolo al mínimo), y así mantiene la actividad fotoquímica y evita la fotoinhibición.

*Chattonella* presenta los pigmentos carotenoides asociados al CX (Mostaert *et al.*, 1998; Klöpffer *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2019), sin embargo, se desconoce su función en el proceso de disipación de la luz. Marshall y Newman (2002b), sugirieron que este género utiliza el CX en irradiancias de luz visible alta para moderar la inhibición, ya que identificaron cambios en la concentración de violaxantina y zeaxantina al comparar entre aclimataciones de luz (150 y 500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Por otra parte, se han propuesto diversas hipótesis sobre el mecanismo preciso por el cual *Chattonella* provoca la muerte de organismos marinos. Okaichi (1983) propuso que los ácidos grasos libres que produce *Chattonella* ingresan al torrente sanguíneo a través de las branquias, lo cual resulta en la muerte de los peces. Actualmente se sabe que efectivamente, *Chattonella* produce altas concentraciones de ácidos grasos (AG) (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2003; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013), los cuales son biomoléculas formadas por una cadena hidrocarbonada larga, con un grupo carboxilo en el extremo.

Se ha identificado que los AG principales que produce *Chattonella* son el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ 3, hasta un 30%), octadecatetraenoico (OTA, 18:4 $\omega$ 3), palmitoleico (C16:1) y el docosahexaenoico (DHA, 22:6 $\omega$ 3) (Marshall *et al.*, 2002c; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013). Se ha observado que la mayoría de estos AG tienen un efecto negativo para otros grupos del fitoplancton y los consumidores primarios (zooplancton) lo cual representa una ventaja ecológica, además tienen un efecto hemolítico e ictiotóxico, ya que al oxidarse producen subproductos, conocidos como oxilipinas que producen efectos adversos sobre invertebrados (Jüttner, 2001, 2005; Mardones *et al.*, 2015; Marshall *et al.*, 2003; Pohnert *et al.*, 2002).

La producción AG no solamente hace a *Chattonella* como uno de los géneros más tóxicos si no el sinergismo que existe entre estos y ROS (Hallegraeff *et al.*, 2017). Marshall *et al.* (2003) identificaron que el efecto negativo del EPA en el pez Damisela (*Acanthochromis polycanthus*) incrementa hasta 15 veces al agregar el anión superóxido. Asimismo, Mardones *et al.* (2015)

observaron un incremento en la toxicidad de hasta 9 veces de DHA en sinergia con la producción de ROS. Las especies reactivas de oxígeno pueden robar electrones de los AG, es decir, las ROS promueve la oxidación de los AG, y esta degradación es llamada peroxidación lipídica que produce daños graves en las membranas celulares (Hallegraeff *et al.*, 2017).

La producción de ROS se considera como el factor clave que contribuye a la toxicidad del género. Se ha demostrado que *Chattonella* produce los niveles más altos de ROS, tanto del anión superóxido, como del peróxido de hidrógeno, comparados con otras rafdofitas, y otros grupos de microalgas (Oda *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2016). Se ha observado que la irradiancia juega un rol importante en la toxicidad de *Chattonella*. Marshall *et al.*, (2001) identificaron que los niveles de  $O_2^-$  disminuyen significativamente al mantener a *C. marina* en oscuridad. Marshall *et al.* (2002a) propusieron que la producción del anión superoxido está ligado con la transferencia de electrones de la fotosíntesis que realiza *Chattonella*.

Sin embargo, como ya se mencionó, se desconoce cómo se lleva a cabo la fotobiología del género y, en general de las rafdofitas. Asimismo, sobre las cepas aisladas de la región se ha identificado que tienen un efecto negativo en organismos de importancia para la maricultura, y que producen metabolitos secundarios tóxicos (Band-Schmidt *et al.*, 2012; Pérez-Morales *et al.*, 2014; Ahumada-Fierro, 2017). Sin embargo, no se ha caracterizado la relación de la producción de estos metabolitos con la luz. Por lo que es importante identificar los mecanismos que utilizan para tolerar los niveles de luz altos, y reconocer si realmente su toxicidad está relacionada con procesos fotobiológicos.

### **1.3 Hipótesis**

El potencial tóxico, identificado como la producción de metabolitos (ácidos grasos y especies reactivas de oxígeno), de cepas de *Chattonella* aisladas de distintas regiones del Pacífico mexicano y del Golfo de California dependerá de la capacidad de inducir mecanismos de fotoprotección.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Caracterizar la relación entre la producción de metabolitos (ácidos grasos y especies reactivas de oxígeno) con los mecanismos de fotoprotección y características fotosintéticas de especies de *Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y del Golfo de California.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar a nivel de especie las cepas del género *Chattonella* con el uso de marcadores genéticos.
- Evaluar las características fotosintéticas y de fotoprotección de las especies de *Chattonella*.
- Cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno y de ácidos grasos de especies de *Chattonella*.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Identificación molecular

#### 2.1.1 Mantenimiento de las cepas

Se trabajó con las cepas CBTSA y CBTSB aisladas de la Bahía de Todos Santos, Baja California en 2016. Su aislamiento, acondicionamiento y toxicidad sobre estadios tempranos de moluscos bivalvos se describe en Ahumada-Fierro (2016). Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas a 20 °C, con un ciclo de luz a oscuridad (12:12) a una irradiancia de 190 quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> en matraces de 200 mL, con 180 mL de medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993).

#### 2.1.2 Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se concentraron las células por centrifugación. Se utilizaron 200 mL de los cultivos en fase exponencial y se centrifugaron a 3,500 rpm por quince minutos. La extracción se realizó con el kit DNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN, se siguió el protocolo del fabricante. La concentración de ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría con el uso de un NanoDrop™ 2000 de Thermo Fisher Scientific, a una longitud de onda de 260 nm, y la pureza se midió mediante la razón de absorción 260/280 nm. Se utilizó 1 µL de cada una de las extracciones, y como blanco 1.5 µL del buffer en el que se disolvió la muestra (Buffer AE). Se verificó la calidad y la cantidad de las extracciones mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se utilizaron 10 µL de la extracción de ADN teñido con 3 µL de GelRed® de Biotium, la electroforesis se llevó a cabo a 50V por 10 minutos, seguidos de 80 V por 30 minutos.

#### 2.1.3 Amplificación

Para el análisis filogenético de las cepas se amplificó el segmento de la región de los espaciadores internos ITS1-5.8S-ITS2, los dominios D1/D2 del ADN ribosomal (rDNA) de la

subunidad grande (LSU) y del gen Citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) para cada una de las cepas de *Chattonella*.

Las amplificaciones realizaron en un termociclador (Thermal Cycler T100™ de BIO- RAD®). Se realizó una mezcla de reacción de un volumen final de 20 µL, que contenían 4 µL de buffer, 0.8 µL de cada uno de los primers (Tabla 1), 0.125 µL de My Taq™ DNA Polymerase de BIOLINE, ADN a una concentración de 10 ng y H<sub>2</sub>O Milli-Q® de Sigma-Aldrich para ajustar el volumen para cada reacción.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las tres regiones de ADNr.

Región	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Referencia
ITS	Chamo-ITSF	5'-TAGAGGAAGGTGAAGTCG-3'	Demura <i>et al.</i> , 2009
	Chamo-ITSR	5'-TTACTAGGGGAATCCGAG-3'	
LSU	D1R	5'-ACCGCTGAATTTAAGCATA-3'	Diaz <i>et al.</i> , 2010;
	D2C	5'-CCTTGGTCCG TGTTC AAGA-3'	Stacca <i>et al.</i> , 2016
COI	LCO1490 F	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATAT TGG-3'	Klinbunga <i>et al.</i> , 2003; Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2012
	HCO2198 R	5'-TAAACTTCAGGGT- GACCAAAAAATCA-3'	

Las primeras amplificaciones se hicieron de acuerdo a lo reportado para cada uno de los oligonucleótidos utilizados (Tabla 1). Sin embargo, cuando no se obtuvieron resultados óptimos, se realizaron modificaciones en los programas para lograr una mejor amplificación. Para la región del ITS y LSU se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguido de una etapa de 30 ciclos que consistía en un paso de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, otro de alineamiento a 55 °C por 30 segundos y uno de extensión a 72 °C por 1 minuto, y una última etapa de extensión final a 72 °C por 5 minutos. Para el gen COI se realizó el PCR en gradiente de acuerdo al siguiente programa: 1 ciclo de 94°C 5 minutos; 35 ciclos de 94°C 30 segundos, un gradiente de 47.5-49.5°C 90 segundos y 72°C 90 segundos; y al final un ciclo de 72°C por 1:30 minutos.

Los productos de la reacción se mantuvieron a 4 °C. Se tomaron 3 µL del producto de PCR y se mezclaron con 1 µL GelRed® de Biotium para tinción. Esta mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis durante 40 minutos a 80 V. Una vez concluida, el gel fue visualizado bajo luz UV en un ChemicDoc™ de BIO-RAD®. Se utilizó 1 µL de HyperLadder™ de 1kb de Bioline como marcador de peso molecular de los productos obtenidos.

#### **2.1.4 Análisis de las secuencias y reconstrucción filogenética**

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information con la herramienta blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de esta forma se confirmó que las cepas pertenecen al género *Chattonella*. Se utilizaron las secuencias obtenidas de la cepa *Chattonella marina* var. *marina* CMCV-1 aislada de la Bahía de la Paz B.C.S., como control positivo debido a que estas fueron identificadas y publicadas antes por (Band-Schmidt *et al.*, 2012).

En el programa Mega 7, se realizó una alineación de las secuencias y de las encontradas en el NCBI, y se construyeron arboles filogenéticos con el uso del método de neighbour joining, el cual se basa en las distancias evolutivas calculadas por medio del modelo de Kimura (Kimura, 1980; Kumar *et al.*, 2016).

## **2.2 Crecimiento**

### **2.2.1 Condiciones experimentales de cultivo**

Se trabajó con las cepas aisladas de la Bahía de Todos Santos, Ensenada B.C., *Chattonella marina* var. *antiqua* (CBTSA) y *Chattonella* sp. (CBTSB), y con la cepa de *C. subsalsa* (CSPAZ-1) aislada de la Bahía de La Paz B.C.S. Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas a 20 °C, con un ciclo de luz a oscuridad (12:12) en medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Se aclimataron las tres

cepas a una irradiancia de luz baja (LB) de  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (cercano a la irradiancia de compensación), y luz alta (LA) a  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (saturante). Se mantuvieron por un mínimo de ocho generaciones en estas condiciones, antes de realizar cualquier prueba.

### 2.2.2 Curvas de crecimiento

Para caracterizar el crecimiento poblacional se evaluó por triplicado el cambio de la abundancia en el tiempo en ambos tratamientos de luz. Se realizaron conteos celulares en alícuotas de 1 mL fijadas con una solución al 1% de Hepes (30 mM), glutaraldehído 20% y paraformaldehído al 20% (Katano *et al.*, 2009). Los conteos se realizaron en una cámara de Sedwick Rafter, bajo microscopio de luz invertido LEICA DM13000B 10x (Leica Microsystems, Alemania).

El cambio de la abundancia celular en el tiempo en los cultivos se ajustó al modelo de crecimiento de Gompertz:

$$\ln N/N_0 = a \exp(-\exp(b - ct)) \quad (2)$$

donde  $y = \ln ( N / N_0 )$  es la concentración celular a diferentes tiempos de cultivo. La concentración celular inicial es  $N_0$ , y  $N$  es a un al tiempo  $t$  y los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  describen la forma de la curva;  $a > 0$  describe la abundancia máxima, el parámetro  $c > 0$  es la tasa específica de crecimiento (divisiones día<sup>-1</sup>), y el parámetro  $b > 0$  controla la diferencia entre la abundancia inicial y la final a un tiempo  $t$ . El ajuste se realizó con el uso de la paquetería de SigmaPlot v11.0 (Systat Software, San Jose, CA).

## 2.3 Fotobiología

### 2.3.1 Curvas fotosíntesis vs. irradiancia P-E

La fotosíntesis se midió como la evolución de oxígeno disuelto a distintas irradiancias. Se trabajó con alícuotas de 180 mL ( $5,000 \text{ cél mL}^{-1}$ ) de los tratamientos por triplicado. Se colectaron las muestras antes de iniciar el ciclo de luz. Las mediciones se realizaron en cámaras de borosilicato de 200 mL, conectadas a un baño térmico. Para prevenir la limitación por carbono, se adicionó  $\text{NaHCO}_3$  a una concentración final de 2 mM. La respiración en oscuridad se midió como el consumo de oxígeno durante 5 min. Después de este periodo de oscuridad, los cultivos se expusieron a irradiancias crecientes aumentando de nivel cada 3 minutos. La cámara fue iluminada por cuatro fuentes de luz (LED 10 W) controladas automáticamente. Los niveles de irradiancia (E) a los que estuvieron expuestas las células fueron 6.35, 22.2, 51.2, 88.5, 118.6, 203, 308, 423, 622, 1069, 1635, 2010 y  $2944 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La concentración de oxígeno se midió con un sistema de optodos (dipping probe DP-PSt3, PreSens, Alemania) controlados por un equipo OXY-SM software (Measurement Studio 2, PreSens, Alemania).

Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo de la tangente hiperbólica (Jassby y Platt, 1976):

$$P = P_{\text{max}} \cdot \tanh(\alpha \cdot \text{EPAR}/P_{\text{max}}) \quad (3)$$

Donde la irradiancia de saturación ( $E_k$ ) representa la irradiancia de saturación, que es igual a la fotosíntesis máxima ( $P_{\text{max}}$ ) dividida entre la pendiente inicial de la fotosíntesis ( $\alpha$ ), y  $E_c$  representa la irradiancia de compensación.

Antes de iniciar las curvas P-E, se colectaron por duplicado alícuotas de 6 mL y se filtraron por filtros GF/F de 13 mm de diámetro. Los filtros fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente utilizados para el análisis de pigmentos en las muestras.

### 2.3.2 Mediciones de NPQ y Fv/Fm

Las estimaciones de la máxima eficiencia fotosintética (Fv/Fm) y de la disipación no fotoquímica del FSII (NPQ) se realizaron mediante el monitoreo de la emisión de este sistema. Las mediciones de fluorescencia de la clorofila a (Chl *a*) del FSII se realizaron por triplicado antes de que las células iniciaran el ciclo de 12 horas de luz, con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Alemania), que tiene una fuente de luz de excitación con una emisión a 428 nm. (LED azul). Se utilizó la nomenclatura y los parámetros descritos por Van Kooten y Snel (1990).

Para la determinación del Fv/Fm, la fluorescencia variable (Fv=Fm-F0) es la emisión máxima del FSII (Fm) cuando los centros de reacción están cerrados (oxidados) menos la fluorescencia basal (F0), condición opuesta; los centros de reacción están abiertos o el primer aceptor de electrones (QA) reducido, se utilizaron 70 mL (5,000 células mL<sup>-1</sup>) de los cultivos por triplicado colectados antes de iniciar el ciclo de luz. La F0 se midió en oscuridad al exponer las muestras solamente a la luz de medición, y la Fm se midió al dar un pulso de luz saturante (3,000 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con una duración de 0.8 segundos. Estos pulsos, y por lo tanto el monitoreo de las variables, se dispararon cada minuto.

Posterior al periodo de oscuridad inicial se iluminó la cámara durante 30 minutos a una irradiancia de aproximadamente 1,400 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Se utilizó un simulador solar (solar Sun 2000, ABET Technologies) como fuente de luz. Toda la muestra fue iluminada homogéneamente. La fibra óptica del fluorómetro fue colocada en un ángulo de 90° en relación a la luz de la lámpara.

Posterior al periodo de exposición a la luz se registraron mediciones de fluorescencia durante 30 minutos en oscuridad. NPQ se calculó como:

$$\text{NPQ} = (\text{Fm} - \text{Fm}') / \text{Fm}' \quad (4)$$

donde Fm' es el valor de la fluorescencia máxima obtenido durante el periodo de incubación con luz actínica y en oscuridad posterior al periodo de iluminación. Las mediciones se realizaron

en agitación y temperatura (20°C) constantes, por medio de recirculación de agua en el caso de esta última variable.

Se tomaron alícuotas de 3 mL por duplicado durante las mediciones, antes de iniciar la fase de luz, a 5, 15 y 30 min de exposición a  $1,400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y a 5, 15, 30 min después de apagar la luz actínica. Las alícuotas fueron filtraron en filtros GF/F y 13 mm de diámetro. Los filtros fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido.

También se monitoreó el efecto del inhibidor la enzima violaxantina desepoxidasa (VDE), dithiothreitol (DTT) sobre la inducción del NPQ. Para ello, se realizaron mediciones de fluorescencia de la Chl *a* de la forma ya descrita, pero antes de iniciar la exposición a luz a cada cepa en ambos tratamientos se incubaron las muestras por 5 minutos con DTT a una concentración final de 1mM.

### **2.3.3 Análisis de pigmentos**

La extracción de pigmentos lipofílicos se realizó por medio de disrupción mecánica de los filtros tomados de las curvas P-E y las mediciones de fluorescencia.

En tubos para centrifuga de 2 mL se colocó cada filtro, se agregaron perlas de sílice-zirconia de 0.5 mm y 1 mL de acetona fría al 100%. La ruptura se realizó en un mini “Bead Beater” (Bisopec Products Inc.), con pulsos de 10 segundos a 500 rpm por tres ocasiones con periodos de enfriamiento entre cada ronda. Enseguida se almacenaron las muestras en condiciones de oscuridad a -20°C con el fin de evitar la degradación de los pigmentos. Después de 24 horas de incubación (tiempo mínimo), se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y finalmente, se le agregó acetato de tetrabutilamonio (TBAA) 28 mM a una proporción de 30  $\mu\text{L}$  de TBAA por cada 100  $\mu\text{L}$  de muestra.

Para la separación de pigmentos por HPLC se utilizó el protocolo descrito por Van Heukelem y Thomas (2001), con modificaciones descritas en Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008). Se utilizó el equipo Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies) equipado con una columna fase reversa Eclipse XDB-C8 (150 X 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de poro 3.5  $\mu\text{m}$ ) y un detector de arreglo de diodos (DAD) programado para detectar 3 longitudes de onda (436, 450 y 475 nm). La temperatura de la columna fue de 60°C. El tiempo del análisis fue de 30 minutos y se realizó manteniendo un flujo constante de 1 mL minuto<sup>-1</sup>. Se usó un gradiente binario para bombear la fase móvil que consistió en metanol: TBAA 28 mM a una proporción de 70:30 (solución A) y metanol al 100% (solución B). El bombeo de dicha fase fue (Min, %B): 0 minutos, 5%; 22 minutos, 95%; 27 minutos, 95%; 30 minutos, 5%.

El sistema fue calibrado con 16 estándares de pigmentos (DHI Inc., Dinamarca): clorofila *c3* (Chl *c3*), clorofila *c2* (Chl *c2*), peridinina (Per), 19'-but fucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Viol), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Ddx), aloxantina (Allo), zeaxantina (Zea), clorofila *b* (Chl *b*), divinil clorofila *a* (DVChl *a*), clorofila *a* (Chl *a*) y  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -caro).

La identificación de los pigmentos se realizó por comparación del tiempo de retención de cada pico con el tiempo de retención de los estándares de pigmentos comerciales. La concentración se determinó a partir del área debajo de cada pico, el cual se realizó con el software de sistema de datos cromatográficos ChemStation (Agilent Co.). El ciclo de las xantofilas se calculó como:

$$CX = CXz + CXd \quad (5)$$

Donde:  $CXz = [\text{Ant}] + [\text{Zea}] + [\text{Viola}]$  y  $CXd = [\text{Ddx}] + [\text{Dtx}]$

El grado de desepoxidación (DPS) de los pigmentos involucrados en el CX se calculó como:

$$DPS = DPSz + DPSd \quad (6)$$

Donde:  $DPSz = ([\text{Zea}] + [0.5 * \text{Ant}]) / ([\text{Ant}] + [\text{Zea}] + [\text{Viol}])$  y  $DPSd = [\text{Dtx}] / ([\text{Ddx}] + [\text{Dtx}])$

## 2.4 Producción de metabolitos tóxicos

### 2.4.1 Ácidos grasos

Se concentraron 2L (5,000 cél mL<sup>-1</sup>) de cada especie de *Chattonella* cultivadas por duplicado en cada aclimatación por centrifugación (3,000 rpm por 15 minutos). La extracción de lípidos, se realizó por el método descrito por Folch *et al.*, (1957), con modificaciones descritas en Cequier *et al.* (2008), con el uso de una solución de extracción de diclorometano-metanol (2:1).

Los lípidos extraídos fueron saponificados con una solución metanólica al 90% 0.3N de KOH durante 30 minutos en baño maría a 60°C. Posteriormente se agregó agua y hexano, y se eliminaron los lípidos insaponificables (la fase superior). Enseguida se adicionó agua, hexano y se acidificó con una solución 6N de HCl para recuperar los lípidos saponificables. Para la metilación se utilizó trifloruro de boro (BF<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub> OH) al 14% en metanol en baño maría por 15 minutos a 60°C, se extrajo la capa superior de hexano con los esteres de ácidos grasos, se secaron bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis (Morris, 1986).

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases con el método descrito por Vizcaíno-Ochoa *et al.* (2010). Los esteres metilados se disolvieron en hexano grado HPLC en una relación de 100 ug µL<sup>-1</sup> y se analizaron en un cromatógrafo de gases GC (Agilent 7890A) con una columna capilar (123-3232, DB-FFAP, de 30 m de longitud, 0.320 mm de diámetro y 0.25 µm de espesor de película, Agilent J&W, GC columns), con un detector de flamas ionizado y como gas transportador se usó el nitrógeno a un flujo de 3 mL min<sup>-1</sup>. Se utilizó un volumen de inyección de 1 µL, con una dilución de 100:1 (split ratio). La rampa de temperatura inició con 120 °C , con aumentos de 9 °C por minuto hasta llegar a los 190 °C, a partir de los 190 °C incrementó a 3 °C por minuto hasta alcanzar los 230 °C; por último se mantuvo a 230 °C por 4 minutos.

La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención de una mezcla de tres diferentes estándares de AG (37 Component FAME Mix, Supelco (Sigma Cat. 47885-U), PUFA No.3 Menhaden oil, Supelco (Sigma Cat. 47085) y PUFA No.1 Marine Source,

Supelco (Sigma Cat. 47033)) con los tiempos de retención de los ésteres extraídos de cada una de las muestras. El porcentaje de cada uno de los ácidos grasos se calculó con base al total de ácidos grasos identificados. Para estos cálculos se utilizó el programa Chem Station versión B.04.01 (Agilent, EUA). Los ácidos grasos identificados se agruparon y clasificaron en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados n-6 y n-3 de acuerdo al número de carbonos y al grado de insaturación (Sargent *et al.*, 2002).

#### 2.4.2 Peroxidación lipídica

Se evaluó la peroxidación de lípidos de las tres especies de *Chatttonella* en las dos intensidades de luz al medir el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los niveles de TBARS se determinaron basados en la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), con modificaciones del método de Hodges *et al.* (1999).

Por centrifugación (3,000 rpm por 15 minutos), se concentraron por duplicado 200 mL (10,000  $\text{cél mL}^{-1}$ ) de cada tratamiento antes y después de ser expuestas a  $1,400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 30 minutos. En tubos para centrifuga de 2 mL se colocaron 0.2 g del pellet colectado de cada muestra, se agregó una perla de aluminio de 0.5 mm y 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Con el propósito de romper el tejido se dieron pulsos en un “Bead Beater” (Bisopec Products Inc.) durante 15 segundos a 500 rpm por dos ocasiones. Posterior a esto, se centrifugaron las muestras a 6,000 rpm por 10 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se le añadió 1 mL de la solución de TCA + TBA al 0.65% para preparar las muestras. Para las referencias se tomó 1 mL del sobrenadante de la muestra, y se le agregó 1 mL de TCA 20%. Los negativos fueron preparados con 2 mL de TCA 20% y otro con 2 mL de la solución TBA + TCA.

Las muestras, referencias y los negativos fueron agitados y enseguida calentados (a 95 °C) en un baño térmico por 30 minutos. Se dejaron enfriar los tubos en hielo. Se homogeneizaron por vortex, y se centrifugó por 10 minutos a 6,000 rpm. Se analizaron 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en 440, 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU. Se consideró el coeficiente de extinción molar de MDA de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Hodges *et al.* 1999). Los equivalentes de MDA (Eq.

MDA) se calcularon con las absorbancias de las muestras (+TBA) y las referencias (-TBA), con base a la siguiente ecuación:

$$\text{Eq MDA (nmol mL}^{-1}\text{)} = [(A-B) / 155\ 000] \times 10^6 \quad (7)$$

Donde:  $A = (\text{Abs}_{532+\text{TBA}} - \text{Abs}_{600+\text{TBA}}) - (\text{Abs}_{532-\text{TBA}} - \text{Abs}_{600-\text{TBA}})$  y  $B = (\text{Abs}_{440+\text{TBA}} - \text{Abs}_{600+\text{TBA}}) \times 0.0571$

### 2.4.3 Producción de ROS

Se evaluó la producción del anión superóxido de las tres especies en las dos condiciones de aclimatación antes y después de ser expuestas a  $1,400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 30 minutos. Para esto se utilizó el método de quimioluminiscencia descrito por (Godrant *et al.*, 2009). En placas de 96 pozos se agregaron  $3 \mu\text{L}$  de Xantina (X) a  $5 \text{ mM}$  al fondo sin tocar las paredes. Se añadieron  $135 \mu\text{L}$  del cultivo, y enseguida se agregaron  $5 \mu\text{L}$  de la sonda quimioluminiscente específica MCLA a  $125 \mu\text{M}$ . Las mediciones de luminiscencia se tomaron en un lector de microplacas Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies). Se utilizaron  $3 \mu\text{L}$  de superóxido dismutasa (SOD) a  $5 \text{ kU mL}^{-1}$  como control negativo. Se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de  $0.1, 0.7$  y  $1.5 \text{ U. L}^{-1}$  de Xantina Oxidasa (XO).

## 2.5 Análisis estadísticos

Las diferencias significativas entre los tratamientos experimentales se analizaron con el software R versión 1.0.153 (Boston, EUA). Se tomaron en consideración los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas con las pruebas de Shapiro-Wilks y de Bartlett, respectivamente. Se realizaron pruebas de t-student para identificar diferencias entre aclimataciones, y pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías cuando se comparó entre cepas, así como pruebas no paramétricas (Wilcoxon Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Identificación molecular

Se utilizaron tres marcadores moleculares para la identificación y análisis filogenético de las cepas de *Chattonella* aisladas de la Bahía de Todos Santos, B. C. Se amplificaron aproximadamente 620 pares de bases (pb) para la región del ITS1-5.8S-ITS2, 680 pb para el LSU, y el PCR del COI resultó en un producto de 520 pb. Las secuencias de los productos obtenidos se compararon con las que encuentran en la base de datos del NCBI, de esta forma se confirmó que las cepas pertenecen al género *Chattonella*.

El análisis filogenético las cepas CBTSA y CBTSB realizado con las secuencias del ITS1-5.8S-ITS2 y el LSU del ADNr, y las secuencias de nucleótidos reportadas en el NCBI para otras cepas resultó en dos clados claramente diferenciados para el género *Chattonella*. El primer clado incluye a las variedades *ovata*, *antiqua* y *marina*, de la especie *C. marina*, y el otro solo incluye a *C. subsalsa* (Figs. 1 y 2). Con valores de remuestreo mayores al 92% se observó que las especies de la BTS pertenecen al primer clado de *C. marina*. No se identificaron diferencias entre las secuencias de las cepas de la BTS y las de distintas regiones geográficas con los marcadores ITS1-5.8S-ITS2 y LSU.

Al utilizar la herramienta blast con las secuencias del gen del COI, se observó que la cepa CBTSA presenta un 100% de similitud con cepas de *Chattonella marina var. antiqua* reportadas para otras regiones del mundo incluidas en la base de datos del NCBI. El árbol filogenético que se construyó con las secuencias del gen COI, muestra que BTSA pertenece al clado de *C. marina*, y que está altamente relacionada con *C. marina var. antiqua*, con valores de remuestreo mayores al 86% con una de las cepas de esta variedad aislada de Japón (Fig. 3).

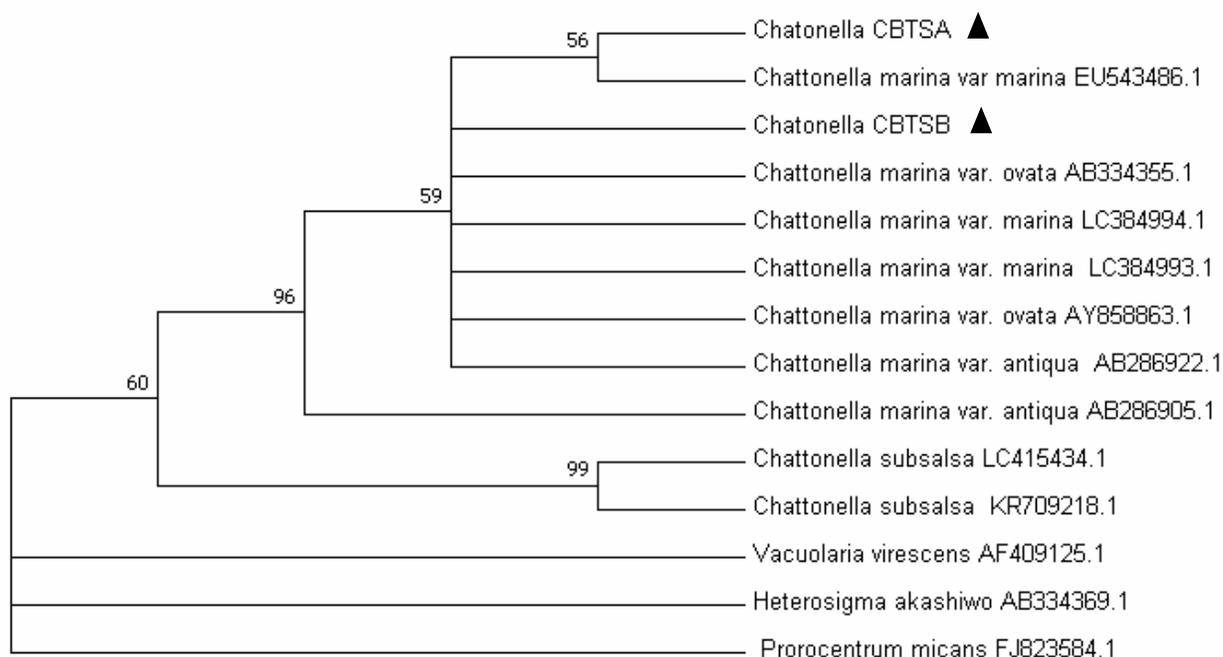
Por otra parte, la cepa BTSB presenta una similitud menor al 90% con las secuencias de la región COI de cepas de *Chattonella* representadas en la base de datos del NCBI. Por esto, en el análisis filogenético no se agrupó en el clado de *C. marina*; sin embargo, tampoco pertenece al clado de *C. subsalsa*. Esto indica que la cepa CBTSB puede ser una especie de *Chattonella* no reportada anteriormente (Fig. 3).

Se estimó la divergencia evolutiva entre las cepas de la BTS y las cepas de otras regiones del mundo con el método de Kimura 2. Este análisis demuestra que las cepas de la BTS no corresponden a la misma especie al tener una distancia de 0.068 (Tabla 2). Sin embargo, esta divergencia evolutiva entre CBTSA y *C. marina* var. *antiqua* (DQ294726.1) aislada de Japón es igual a cero, lo que indica una relación filogenética entre estas. En contraste, con cepas de la especie *C. subsalsa* tiene una divergencia de 0.13, y con las demás rafidofitas esta divergencia es mayor (Tabla 2).

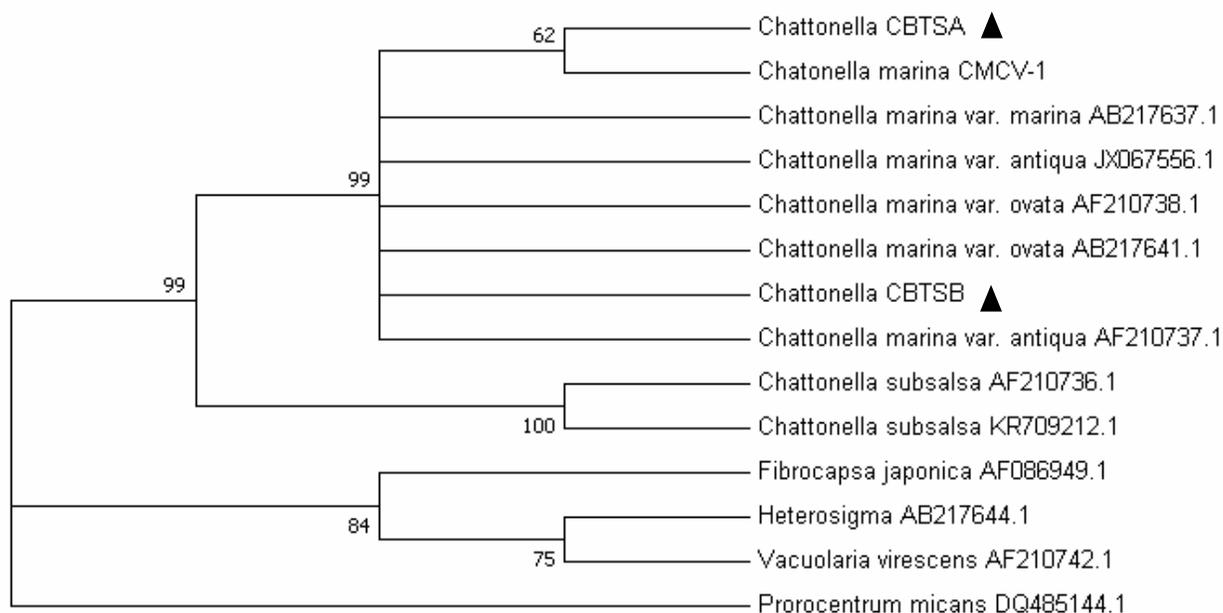
La cepa CBTSB presentó una divergencia mayor a 0.068 con las variedades de *C. marina* y con las cepas de *C. subsalsa* fue mayor a 0.16. Lo que indica, al igual que el análisis filogenético realizado con el método Neighbor-Joining, que la cepa CBTSB puede ser una especie de *Chattonella* no reportada anteriormente (Tabla 2). De acuerdo a estos resultados, CBTSA se denominará como de *C. marina* var. *antiqua*, y CBTSB como *Chattonella* sp. en los resultados y discusiones subsecuentes.

**Tabla 2.** Divergencia evolutiva del gen COI de las cepas de *Chattonella* aisladas de la BTS con otras cepas, especies de rafidofitas y del dinoflagelado *P. micans*, método de Kimura-2.

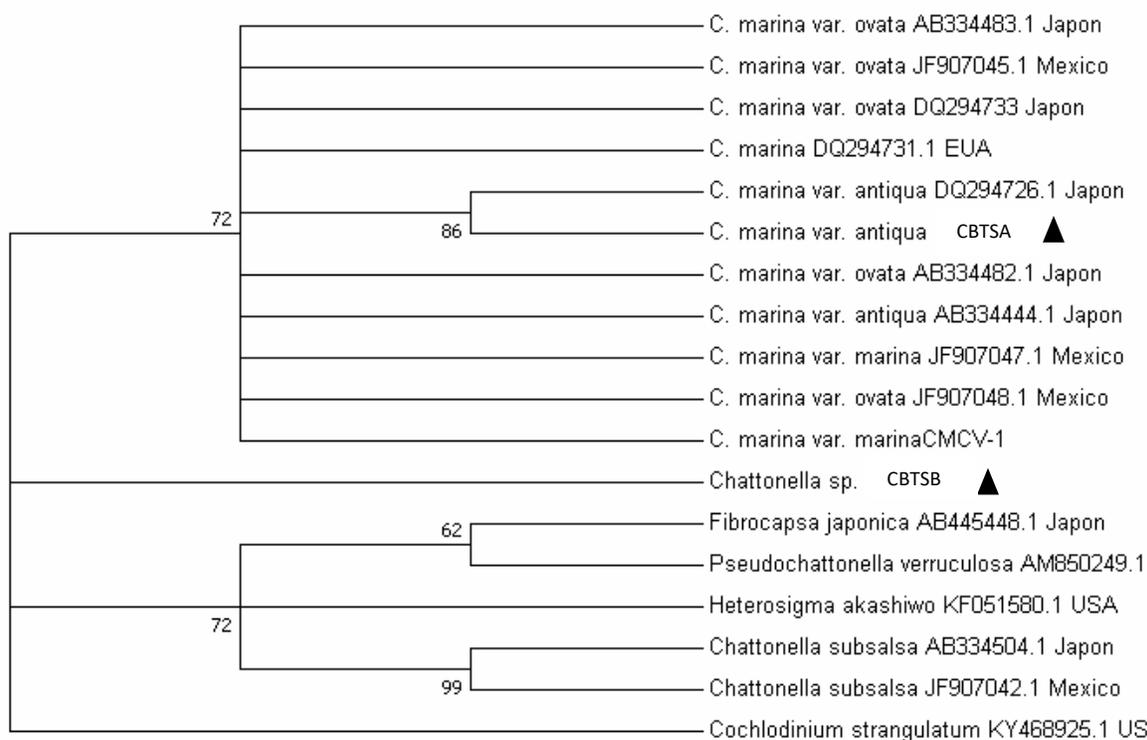
	CBTSA	CBTSB
CBTSB	0.068	-
<i>C. mar. var ovata</i> AB334494.1 México	0.009	0.071
<i>C. mar. var ovata</i> AB334482.1 Japón	0.012	0.068
<i>C. mar. var. marina</i> JF907047.1 México	0.012	0.068
<i>C. mar. var. marina</i> DQ294731.1 EUA	0.006	0.068
<i>C. mar. var. antiqua</i> AB334444.1 Japón	0.016	0.071
<i>C. mar. var. antiqua</i> DQ294726.1 Japón	0.000	0.068
<i>C. subsalsa</i> JF907042.1 México	0.135	0.162
<i>C. subsalsa</i> AB334504.1 Japón	0.139	0.165
<i>Heterosigma akashiwo</i> KF051580.1 EUA	0.174	0.181
<i>Fibrocapsa japonica</i> AB445448.1 Japón	0.230	0.230
<i>Prorocentrum micans</i> EU916883.1 EUA	0.592	0.610



**Figura 1.** Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador ITS del ADNr. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de *Chattonella* aisladas en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con *Prorocentrum micans* como grupo externo



**Figura 2 .** Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador LSUdel ADNr. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de *Chattonella* aisladas en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con *Prorocentrum micans* como grupo externo



**Figura 3.** Árbol filogenético de especies de rafidofitas construido con base al marcador COI. El árbol fue construido con valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de Neighbor-Joining (NJ). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. Se resalta la posición de las cepas de *Chattonella aisladas* en la Bahía de Todos Santos (triángulo negro). El árbol se enraizó con *Cochlodinium strangulatum* como grupo externo.

### 3.2 Características de crecimiento poblacional

La tasa específica de crecimiento ( $\text{día}^{-1}$ ) y el tiempo de generación ( $\text{día}$ ) de *C. marina* var. *antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* cultivadas en condiciones de luz baja ( $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y de luz alta ( $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se presentan en la Tabla 3. Las tasas de crecimiento más bajas para las tres cepas se registraron en luz baja.

Las cepas de la BTS presentaron características de crecimiento similares en las dos condiciones de aclimatación. La tasa de crecimiento en luz alta no fue significativamente diferente entre las dos cepas (t-Student,  $p > 0.05$ ). La  $\mu$  de *C. mar.* var. *antiqua* fue de  $1.0 \pm 0.07 \text{ día}^{-1}$  y de  $0.67 \pm 0.13 \text{ día}^{-1}$  para *Chattonella* sp. (Tabla 3). Las tasas de crecimiento en luz alta fueron aproximadamente 4 veces mayores que las registradas en luz baja, y tampoco se presentaron diferencias significativas en esta condición para las dos cepas de la BTS (t-Student,  $p > 0.05$ ). Estas cepas presentaron una fase de acondicionamiento de cuatro días y una fase de

crecimiento exponencial de cuatro días en luz alta (Fig. 1 B), mientras que en luz baja tuvieron una fase de acondicionamiento de cinco días, y una fase de crecimiento exponencial de diez días (Fig. 3 A). En contraste, *C. subsalsa* presentó características de crecimiento diferentes a las de las cepas de la BTS, la fase de acondicionamiento tuvo una duración de ocho días en ambas aclimataciones, y presentó una fase exponencial de once y siete días en luz baja y luz alta, respectivamente (Fig. 4 A y B). Asimismo, la diferencia en el crecimiento entre las dos condiciones de luz fue de solo 0.03 día<sup>-1</sup> para esta cepa (Tabla 3).

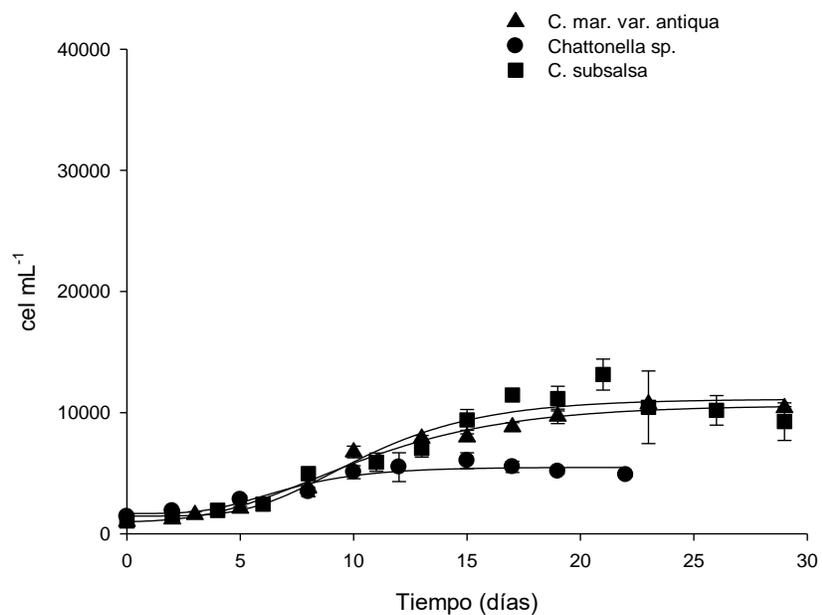
**Tabla 3.** Tasa específica de crecimiento (día<sup>-1</sup>) y tiempo de generación (día) de *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* cultivadas en luz baja (LB, 43 μmol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) y luz alta (LA, 300 μmol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) descrito por el modelo de crecimiento de Gompertz.

Cepa	Luz	Tasa de crecimiento (día <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (días)	Abundancia máxima (cel mL <sup>-1</sup> )
<i>C. mar. var. antiqua</i>	LB	0.21 ± 0.03*	1.43 ± 0.21	10,704 ± 100
	LA	1.00 ± 0.07*	0.30 ± 0.02	36,072 ± 736
<i>Chattonella</i> sp	LB	0.39 ± 0.08*	0.77 ± 0.14	6,031 ± 660
	LA	0.67 ± 0.13*	0.45 ± 0.03	33,567 ± 465
<i>C. subsalsa</i>	LB	0.24 ± 0.02	1.25 ± 0.12	10,441 ± 2,997
	LA	0.27 ± 0.05	1.11 ± 0.46	20,511 ± 1,500

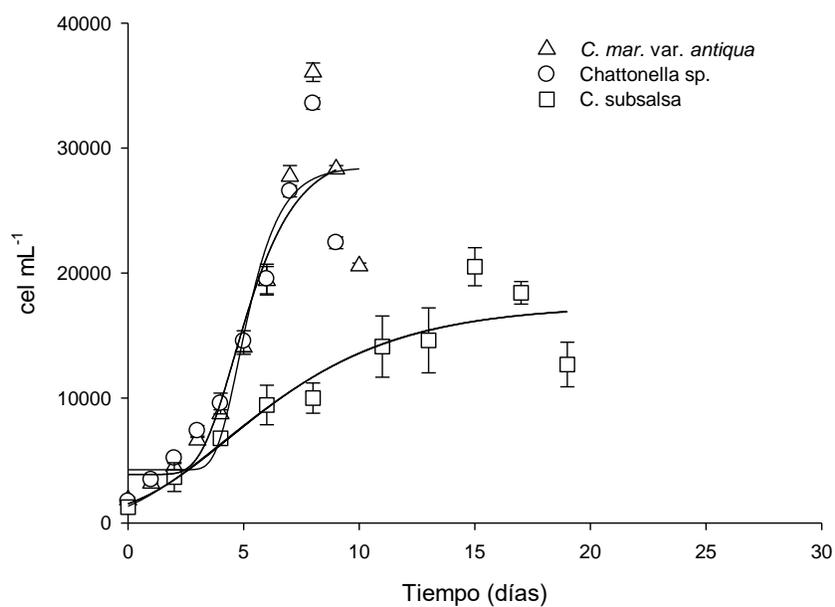
\* representan diferencias significativas (p<0.05) según la prueba t-Student

Otra diferencia importante, fue que *C. mar. var. antiqua* y *Chattonella* sp. alcanzaron aproximadamente el doble de la abundancia celular que *C. subsalsa* en ambas condiciones de aclimatación (Tabla 3; Fig. 4 A y B). La similitud en las características y cinética de crecimiento entre las cepas de la BTS indican que presentan una fisiología fotosintética que permite aclimataciones similares a las condiciones de luz probadas en este estudio, la cual difiere de las respuestas de *C. subsalsa*.

A)



B)



**Figura 4.** Abundancia celular de *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella sp.* (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) en condiciones de luz baja (símbolos cerrados) (A) y de luz alta (símbolos abiertos) (B). Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día. El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas.

### 3.3 Características fotosintéticas

El crecimiento en los organismos autótrofos depende de la tasa fotosintética. Por lo tanto, se caracterizó la fisiología fotosintética de las cepas mediante la medición de la evolución de oxígeno a diferentes irradiancias (curvas P vs. E) (Fig. 5). Las relaciones P vs E indican características fisiológicas diferentes (aclimatación) en respuesta a las dos condiciones luz probadas.

En ninguna cepa se observó una reducción de la tasa fotosintética a irradiancias altas (fotoinhibición), aun cuando las células se expusieron a irradiancias mayores de 2500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Por lo tanto, los parámetros fotosintéticos se calcularon a partir del ajuste de los datos al modelo de la tangente hiperbólica (Jassby y Platt 1976). La respiración en oscuridad y los parámetros fotosintéticos derivados de la relación P vs E se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Parámetros fotosintéticos de especies de *Chattonella* cultivadas en dos intensidades de luz. Se presenta el promedio y desviación estándar (tres mediciones independientes) de la tasa fotosintética máxima ( $P_{\text{max}}$ ) y tasa de respiración en oscuridad (R) en  $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ , la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en  $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1} (\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}$ , y la irradiancia de saturación ( $E_k$ ) y de compensación ( $E_c$ ) en  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Cepa	Luz	R	$\alpha$	$P_{\text{max}}$	$E_k$	$E_c$
C. mar. var antiqua	LB	$0.15 \pm 0.07$	$0.010 \pm 0.002^*$	$5.14 \pm 0.48^*$	$500 \pm 74^*$	$14.5 \pm 2.4^*$
	LA	$0.21 \pm 0.08$	$0.005 \pm 0.0004^*$	$3.75 \pm 0.47^*$	$803 \pm 78^*$	$65.7 \pm 15.3^*$
<i>Chattonella</i> sp	LB	$0.12 \pm 0.03^*$	$0.009 \pm 0.001^*$	$6.01 \pm 0.37$	$655 \pm 26^*$	$16.9 \pm 9.9^*$
	LA	$0.42 \pm 0.07^*$	$0.005 \pm 0.001^*$	$4.86 \pm 0.76$	$885 \pm 60^*$	$37.0 \pm 13.3^*$
C. subsalsa	LB	$0.38 \pm 0.02$	$0.022 \pm 0.003^*$	$11.06 \pm 2.0^*$	$499 \pm 45^*$	$11.9 \pm 3.1^*$
	LA	$0.43 \pm 0.10$	$0.006 \pm 0.001^*$	$3.76 \pm 0.59^*$	$667 \pm 44^*$	$44.6 \pm 11^*$

LB, luz baja. LA, luz alta. \* representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba t-Student.

Se observaron diferencias entre las cepas y entre las condiciones de aclimatación en los parámetros fotosintéticos. La eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) fue dependiente de la luz. Se identificaron diferencias significativas entre las dos aclimataciones para las tres cepas (t-Student,  $p < 0.05$ ). En luz baja la eficiencia fotosintética de *C. subsalsa* ( $0.022 \text{ nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1} (\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}$ ) fue significativamente más alta (mayor al 45%) que el de las otras dos cepas (ANOVA,  $p < 0.05$ ), mientras que en la aclimatación de luz alta no se observaron

diferencias significativas entre las cepas (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Las diferencias en la eficiencia fotosintética se reducen al normalizar este parámetro por la concentración celular de Chl  $a$ . Solo en *C. marina* var. *antiqua*, la diferencias entre las aclimataciones fue significativa (t-Student,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

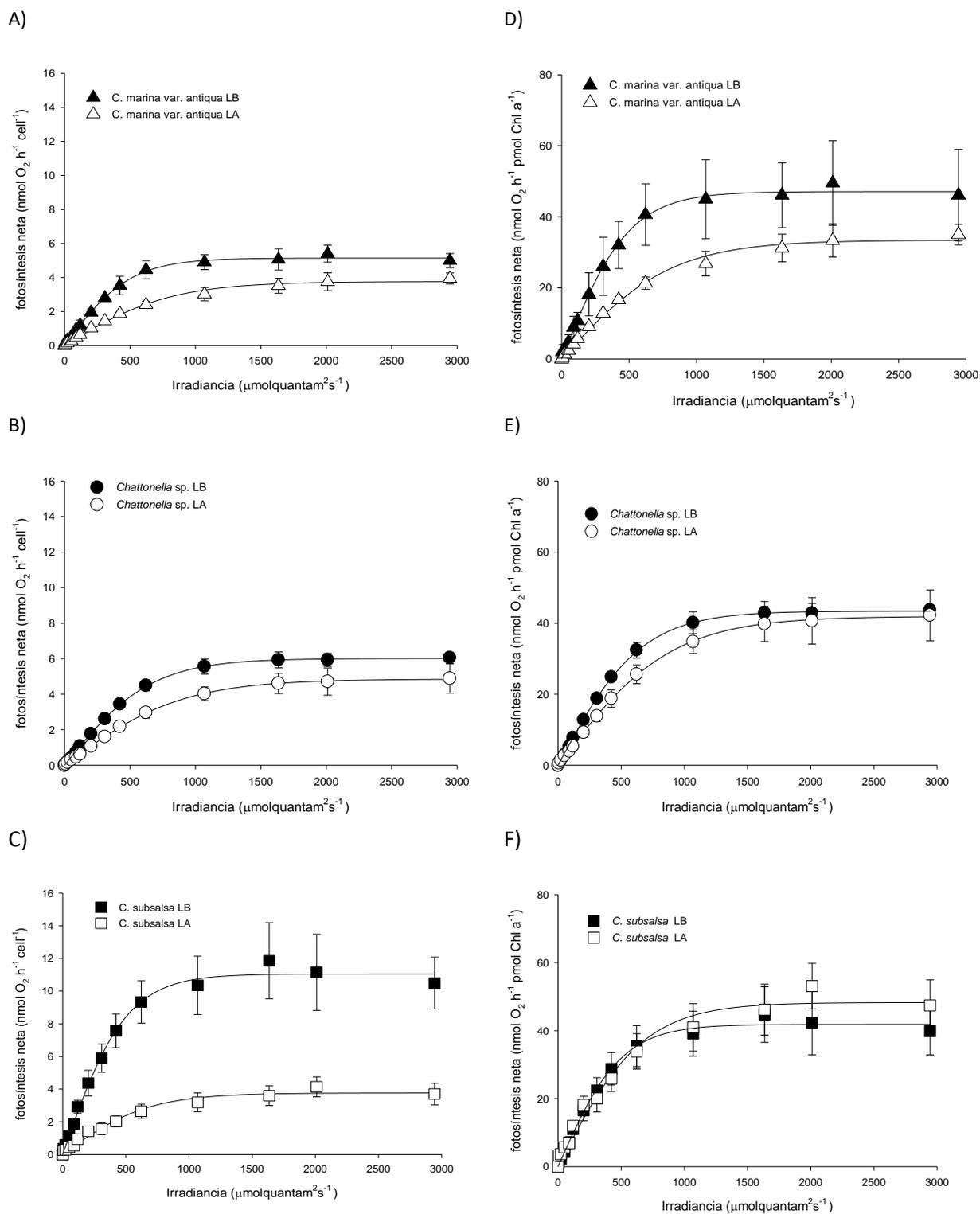
En las cepas aclimatadas a luz baja se observó una fotosíntesis neta por célula ( $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ ) mayor que en las aclimatadas a luz alta (Fig. 5 A-C). Sin embargo, esta diferencia no fue significativas para *Chattonella* sp. (t-Student,  $p > 0.05$ ). *C. subsalsa* presentó una  $P_{\text{max}}$  2.9 veces más alta en luz baja respecto a luz alta. Esta diferencia fue menor en las cepas de la BTS; 1.4 veces menor en luz alta respecto a luz baja para *C. mar.* var. *antiqua*, y 1.2 veces en *Chattonella* sp.

Este resultado es contrario a lo esperado, por lo que se analizó la respuesta fotosintética normalizada por la concentración de Chl  $a$  en células aclimatadas a las dos condiciones de luz. No hubo diferencias significativas en las relaciones P vs E entre las dos condiciones para las tres cepas normalizadas por la concentración de Chl  $a$  (t-Student,  $p > 0.05$ ) (Fig. 5 D-F).

**Tabla 5.** Parámetros fotosintéticos de las especies de *Chattonella* en las dos condiciones de estudio normalizados con el contenido de Chl  $a$  en pmol. Se presentan los valores promedio y desviación estándar de la tasa fotosintética máxima ( $P_{\text{max}}$ ) y tasa de respiración en oscuridad (R) en  $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ pmol Chl } a^{-1}$ , y la pendiente inicial de la fotosíntesis o eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en  $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ pmol Chl } a^{-1} (\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1})^{-1}$ .

Cepa	Luz	R	$\alpha$	$P_{\text{max}}$
<i>C. mar.</i> var. <i>antiqua</i>	LB	$1.48 \pm 0.62$	$0.10 \pm 0.03^*$	$47.13 \pm 11$
	LA	$1.90 \pm 0.77$	$0.04 \pm 0.002^*$	$33.38 \pm 4.21$
<i>Chattonella</i> sp.	LB	$0.79 \pm 0.29^*$	$0.07 \pm 0.003$	$43.40 \pm 2.7$
	LA	$3.6 \pm 0.66^*$	$0.05 \pm 0.004$	$41.97 \pm 6.54$
<i>C. subsalsa</i>	LB	$1.44 \pm 0.13$	$0.08 \pm 0.01$	$38.21 \pm 2.7$
	LA	$5.38 \pm 1.17$	$0.07 \pm 0.01$	$48.24 \pm 6.88$

LB, luz baja. LA, luz alta. \* representan cambios significativos ( $p < 0.05$ ) entre aclimataciones por cada especie según la prueba de t-Student.



**Figura 5.** Curvas P-E (fotosíntesis-irradiancia) de *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella sp.* (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) en células aclimatadas a condiciones de luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). La fotosíntesis neta se presenta en  $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$  (A, B y C) y normalizada por el contenido de Chl *a* en  $\text{pmol}$  (C, D y E).

La respiración (R) en las cepas varió de 0.15 a 0.43 nmol O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> cel<sup>-1</sup>, sin presentar diferencias significativas entre aclimataciones (t-student, p> 0.05) para *C. mar. var. antiqua* y *C. subsalsa*. Se observó una alta irradiancia de compensación (E<sub>c</sub>) de 11.9 a 16.9 en luz baja y de 37 a 65.7 μmol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> en luz alta (t-Student, p> 0.05). Solo las células de *Chattonella* sp. presentaron diferencias significativas en E<sub>c</sub> entre luz alta y baja (t-Student, p< 0.05). La irradiancia de saturación (E<sub>k</sub>) mostró una relación con la luz de aclimatación. Fue menor para las cepas aclimatadas a luz baja (499 a 655 μmol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). Las células de *Chattonella* sp. a luz baja presentaron una E<sub>k</sub> mayor que las otras dos cepas (t-Student, p< 0.05). Las cepas de la Bahía de Todos Santos (*C. mar. var. antiqua* y *Chattonella* sp.) presentaron un E<sub>k</sub> mayor que *C. subsalsa* de la Bahía de la Paz. Esto significa que toleran una irradiancia mayor en ambas condiciones de aclimatación. Al normalizar los parámetros por el contenido de Chl *a* las diferencias se hacen mínimas y no significativas (t-Student, p> 0.05), excepto en α de *C. mar. var. antiqua*, y en R de *Chattonella* sp. en donde las diferencias entre las aclimataciones fueron significativas (t-Student, p< 0.05) (Tabla 5).

### 3.3.1 Concentración de pigmentos

El perfil pigmentario fue similar entre las tres cepas analizadas. Se detectó Chl *a*, fucoxantina, β caroteno, Chl *c*1 y *c*2, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, diadinoxantina y diatoxantina. La Clorofila *a* fue el pigmento principal (0.078 a 0.114 pmol cel<sup>-1</sup>) para las tres cepas, seguido de la fucoxantina (0.045 a 0.13 pmol cel<sup>-1</sup>) (Tabla 6)

No se observaron cambios significativos en la concentración de estos pigmentos al cultivarlas en luz alta y baja para las células de *C. mar. var. antiqua* (t-Student, p> 0.05). Para *Chattonella* sp. solo se presentaron diferencias significativas en la concentración de Chl *a* que fue 64.5% mayor en luz baja respecto a la luz alta (t-Student, p< 0.05). En *C. subsalsa* la concentración de Chl *a* y fucoxantina fueron significativamente diferentes entre luz alta y baja (t-Student, p< 0.05). La concentración de pigmentos fue hasta 3 veces mayor en luz baja para esta cepa (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración de pigmentos en pmol cell<sup>-1</sup>, y la razón molar molar de Chl *c1+c2* y fucoxantina a con respecto a Chl *a* en las tres cepas de *Chattonella* aclimatadas a luz baja (LB) y luz alta (LA).

Cepa	Luz	Chl <i>a</i>	Fucoxantina	$\beta$ caroteno	Chl <i>c1+c2</i> : Chl <i>a</i>	Fuc: Chl <i>a</i>
C. mar. var antiqua	LB	0.114 ± 0.032	0.052 ± 0.014	0.007 ± 0.002	0.09	0.43
	LA	0.112 ± 0.04	0.067 ± 0.017	0.005 ± 0.003	0.08	0.46
<i>Chattonella</i> sp.	LB	0.138 ± 0.02*	0.057 ± 0.01	0.007 ± 0.002	0.12	0.66
	LA	0.089 ± 0.02*	0.045 ± 0.01	0.005 ± 0.003	0.10	0.55
C. subsalsa	LB	0.24 ± 0.05*	0.13 ± 0.03*	0.01 ± 0.003*	0.12	0.62
	LA	0.078 ± 0.005*	0.052 ± 0.004*	0.003 ± 0.0005*	0.09	0.50

LB, luz baja. LA, luz alta. \* representan cambios significativos ( $p < 0.05$ ) según la prueba de t-Student.

*C. subsalsa* presentó un mayor cambio en la concentración de pigmentos por célula en las dos aclimataciones de luz. Esta respuesta de aclimatación que refleja su plasticidad a diferentes irradiancias, mientras que en las cepas de la BTS no es tan clara esta respuesta.

La relación Chl *c*: Chl *a* no presentó diferencias entre los tratamientos, varió de 0.09 a 0.12 en luz baja, y de 0.08 a 0.10 en luz alta. Por otra parte la relación Fuc: Chl *a* fue menor en LB comparada con luz alta para *C. mar. var. antiqua*, mientras que en las otras dos cepas se presentó el patrón inverso (Tabla 6).

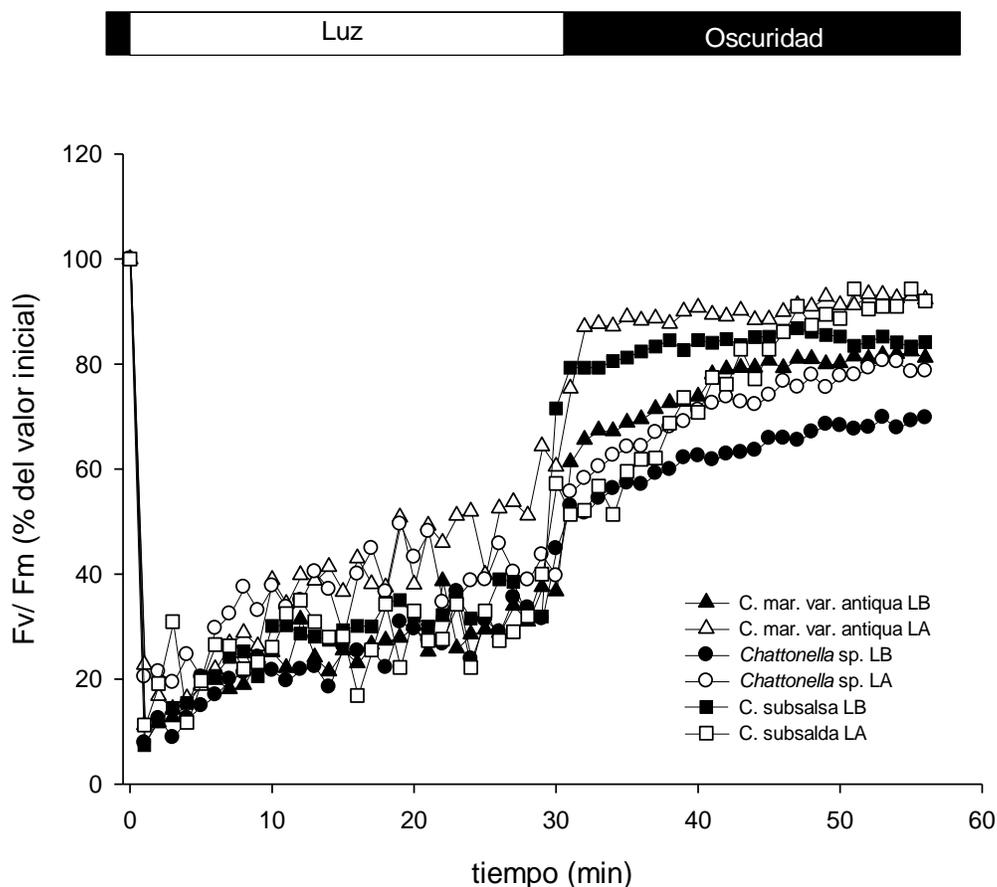
Algunos carotenoides son utilizados para la fotoprotección, por lo que los resultados de la evaluación de la concentración de los estos pigmentos se describen en la siguiente sección.

### 3.4 Mecanismos de fotoprotección

#### 3.4.1 Evaluación de la eficiencia cuántica máxima

Se midió la variación de la emisión de fluorescencia de la Chl *a* del FSII en respuesta a cambios de condiciones de luz, como un indicador de los diferentes procesos que están involucrados en la regulación de la actividad fotosintética. Se evaluó el cambio de la eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ) durante la exposición a la luz saturante por 30 minutos ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$

<sup>1</sup>), y posteriormente en oscuridad por 30 minutos como indicador de la recuperación del daño del FSII en las células aclimatadas a las dos condiciones de luz (Fig. 6).



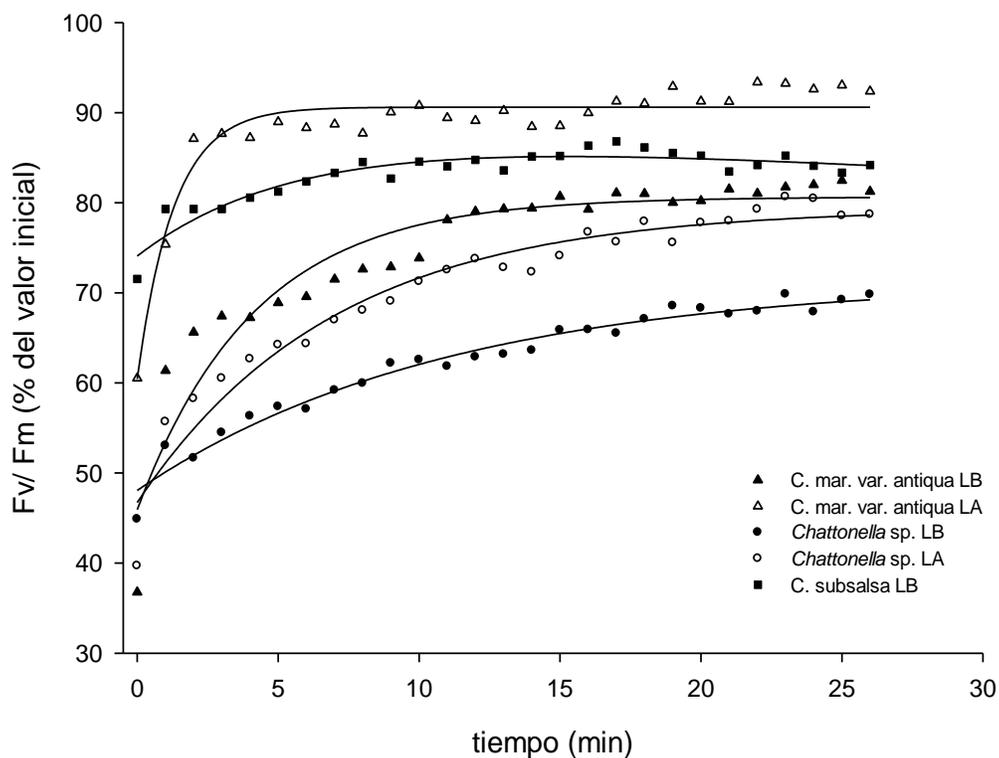
**Figura 6.** Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) durante la exposición a luz saturante ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y en oscuridad en células de *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella sp.* (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) aclimatadas a luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a luz saturante.

La eficiencia cuántica efectiva del FSII ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) disminuyó de manera inmediata hasta un 80% del Fv/Fm durante la exposición a la luz saturante para las células aclimatadas a luz alta. Fv/Fm inicial fue en promedio de  $0.62 \pm 0.01$  para las tres cepas en esta aclimatación. La  $\Phi_{\text{FSII}}$  se recuperó hasta un 50% durante el periodo de exposición a la luz en esta aclimatación. En cuanto a las células aclimatadas a luz baja, la  $\Phi_{\text{FSII}}$  ( $0.7 \pm 0.02$  valor inicial) también disminuyó de manera inmediata hasta un 90% del valor de Fv/Fm durante la exposición a la luz saturante. Posteriormente, se recuperó un 10% durante el periodo de exposición a la luz.

La recuperación de Fv/Fm en oscuridad representa la disminución de los procesos involucrados en la disipación térmica y la reparación del daño acumulado en FSII durante la exposición a luz saturante (Fig. 7). Al iniciar el periodo de oscuridad la recuperación de Fv/Fm fue diferente para cada cepa y en cada condición de aclimatación. No se observa un patrón claro tanto de la velocidad de recuperación y la recuperación máxima entre las tres especies y las dos aclimataciones. *Chattonella* sp. aclimatada a luz baja, presentó la menor recuperación de Fv/Fm (69% del valor inicial), es decir, el mayor daño en el FSII. Asimismo, presentó el  $t_{1/2}$  de recuperación más lento de 8 minutos (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Las células de *C. mar* var. *antiqua* aclimatadas a luz alta presentaron una recuperación de hasta un 90% del valor inicial de Fv/Fm rápidamente, con un  $t_{1/2}$  de 2 minutos. En contraste, a las células aclimatadas a la luz baja les tomó el doble de tiempo (4 min.) y recuperaron hasta un 80% del valor inicial.

En el periodo de oscuridad, el Fv/Fm en *C. subsalsa* aclimatadas a LB tuvo una recuperación de hasta un 80% del valor inicial, con una  $t_{1/2}$  de 4 minutos. Las células de esta cepa aclimatadas a LA, presentaron una respuesta distinta a las demás, el Fv/Fm aumentó de manera exponencial en oscuridad hasta lograr el 90% del valor inicial. Sin embargo, por la naturaleza de los datos, no se logró ajustar al modelo propuesto por Hanelt (1998).



**Figura 7.** Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) del PSII en oscuridad, posterior a la exposición a luz saturante ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella* sp. (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) aclimatadas a luz baja (símbolos cerrados) y luz alta (símbolos abiertos). La línea representa el ajuste al modelo propuesto por Hanelt (1998). No se presenta la recuperación de *C. subsalsa* aclimatada al alta luz.

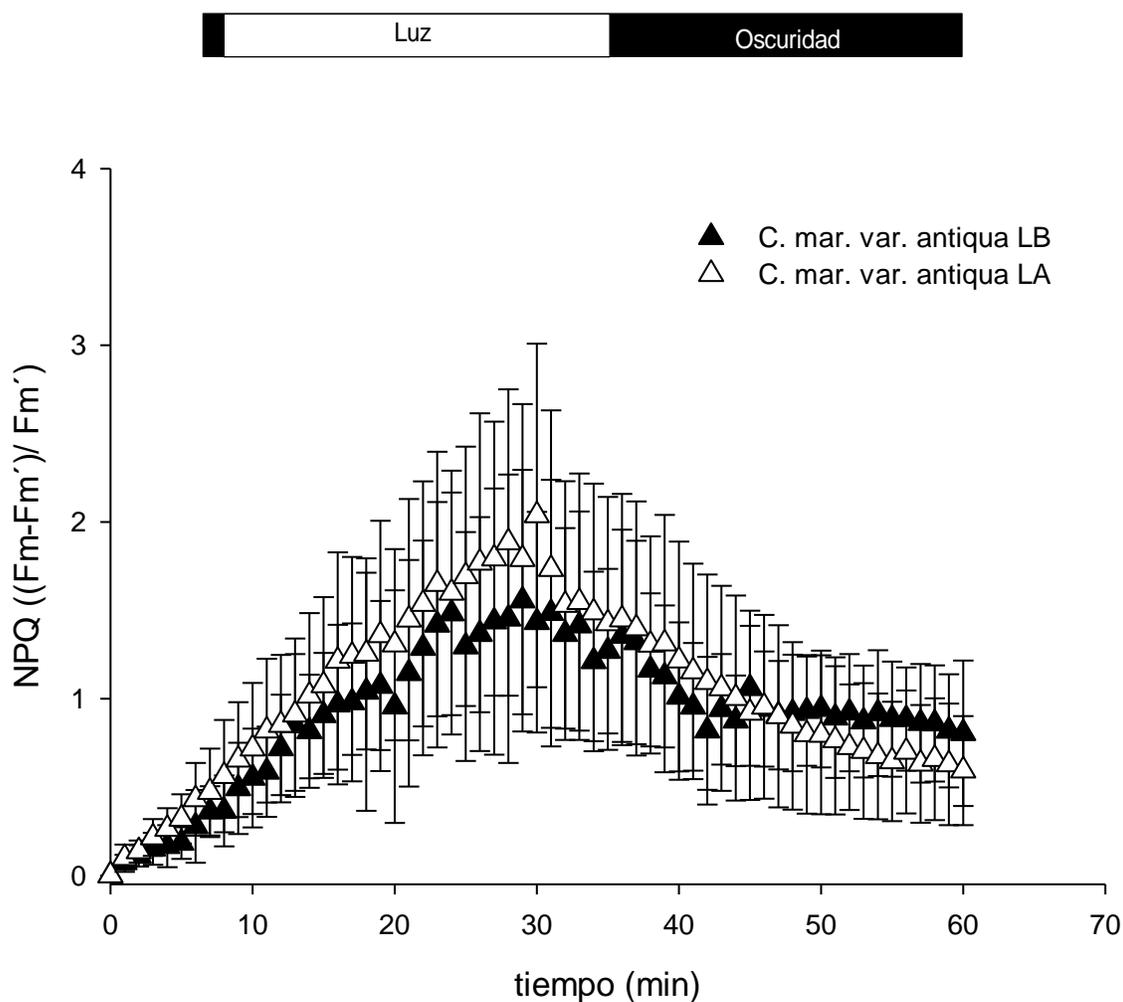
### 3.5 Inducción y disipación de NPQ

Se caracterizó la cinética de inducción de NPQ en luz saturante y su disipación en oscuridad para las tres cepas de *Chattonella* aclimatadas a las dos condiciones de luz. En *C. mar. var. antiqua* se observó un incremento en el NPQ con el tiempo de exposición a luz saturante hasta alcanzar el valor máximo a los 30 min de exposición a luz saturante (Fig. 8). La inducción y disipación del NPQ no varió entre las aclimataciones de luz (t-Student,  $p > 0.05$ ). El NPQ máximo alcanzado fue de  $1.43 \pm 0.62$  en luz baja y  $2.04 \pm 0.97$  en luz alta.

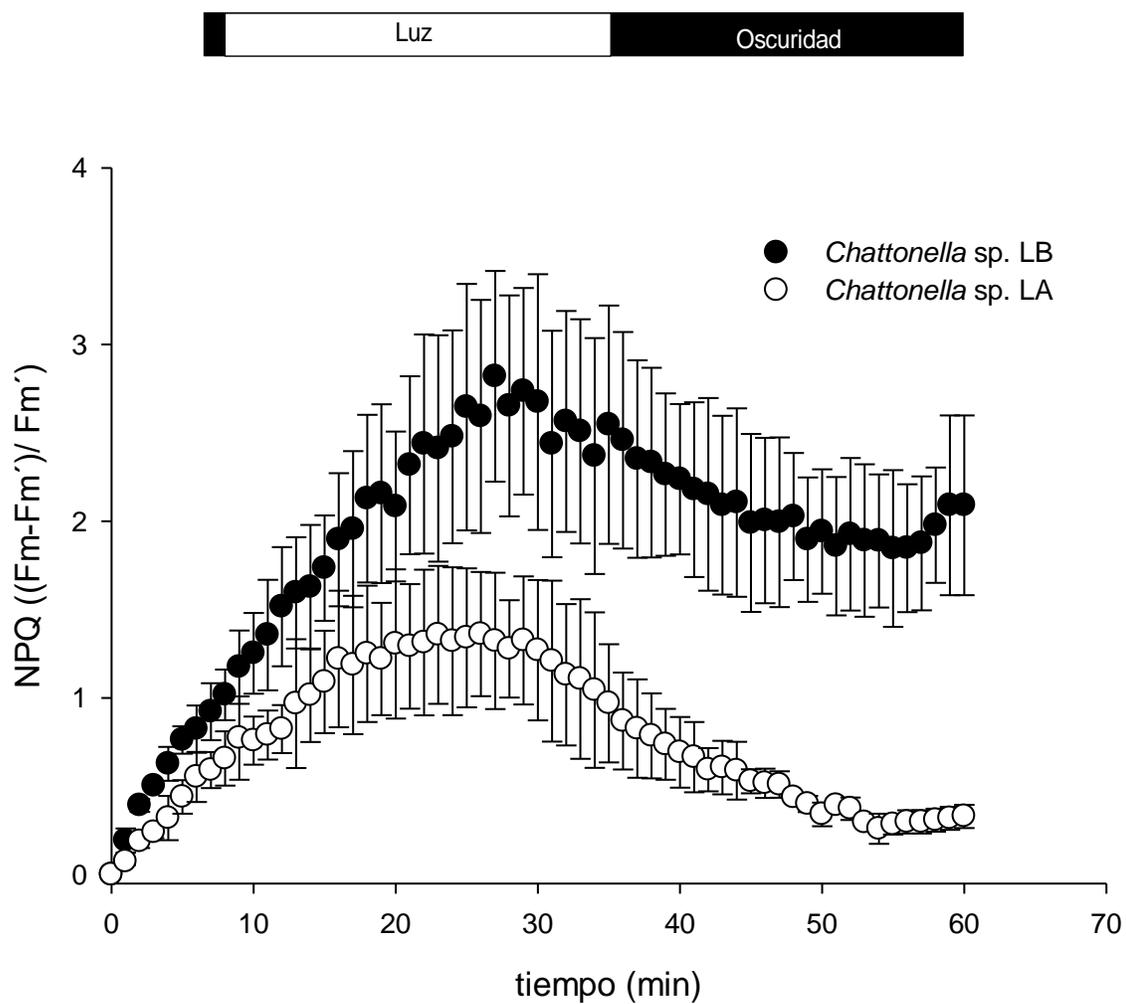
En las células de *Chattonella* sp. se observaron diferencias significativas en la cinética de inducción y disipación de NPQ entre las células aclimatadas a luz alta y baja (t-Student,  $p < 0.05$ ) (Fig. 9). Las células aclimatadas a luz baja presentaron una mayor inducción de NPQ, que

aumentó linealmente del valor inicial (0), hasta el valor máximo de  $2.67 \pm 0.72$  y su disipación fue lenta. Se disipó solo un 20% del NPQ máximo. Las células aclimatadas a luz alta alcanzaron un NPQ menor en comparación a las aclimatadas a luz baja, de tan solo de  $1.3 \pm 0.4$ .

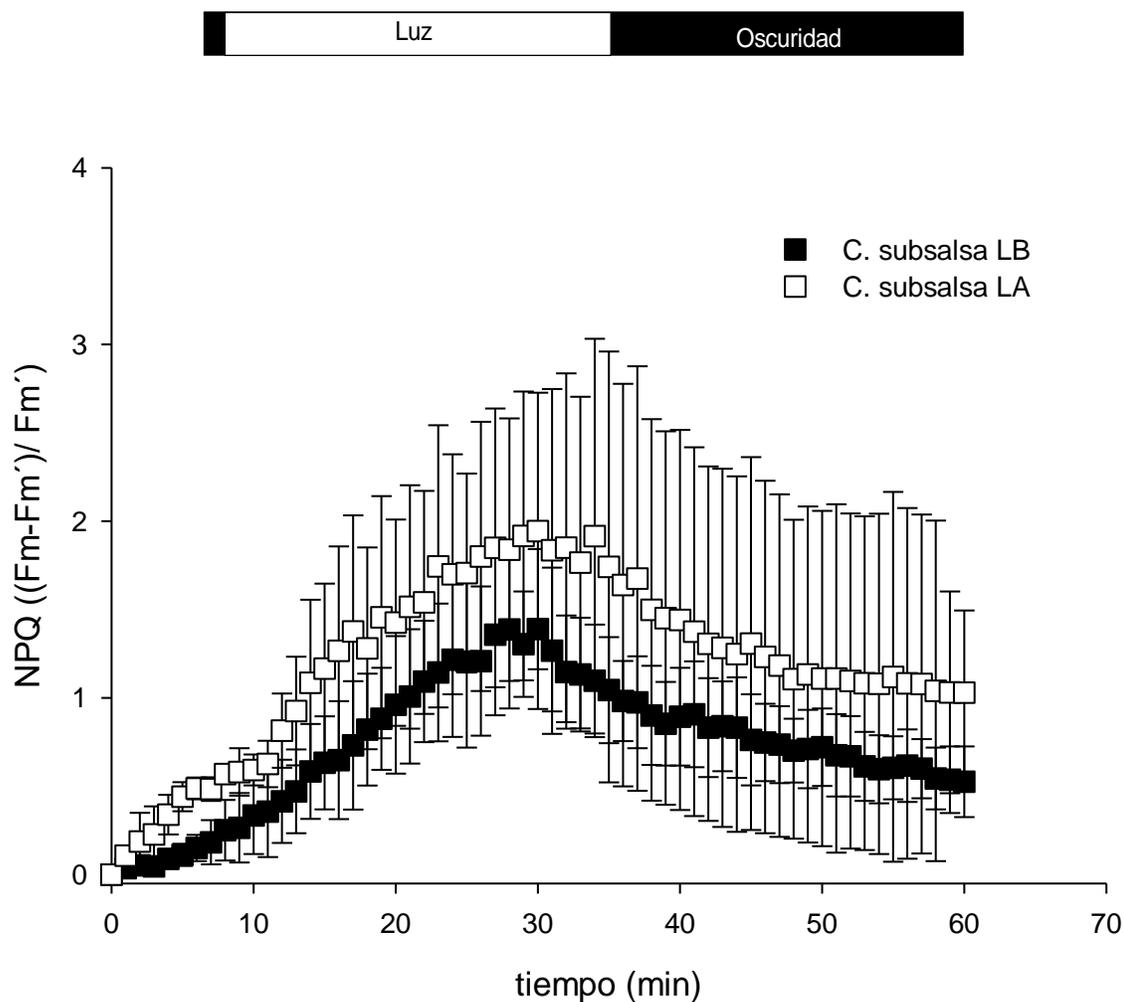
La cinética de disipación también fue diferente, se detectó una reducción de un 60% a los 30 min en oscuridad. En *C. subsalsa* el NPQ aparentemente fue mayor en células aclimatadas a luz alta en comparación a luz baja; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las dos aclimataciones (t-student,  $p > 0.05$ ) (Fig. 10). El valor máximo de NPQ fue de  $1.4 \pm 0.5$  y  $1.94 \pm 0.8$  en luz baja y alta, respectivamente. La cinética de disipación de NPQ también fue similar entre las dos aclimataciones.



**Figura 8.** Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella marina* var. *antiqua* aclimatadas a  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Baja, símbolos cerrados) y  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Alta, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar.



**Figura 9.** Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella* sp. aclimatadas a  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Baja, símbolos cerrados) y  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Luz Alta, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar.



**Figura 10 .** Inducción y disipación de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *Chattonella subsalsa* aclimatadas a  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LB; símbolos cerrados) y  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (LA, símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas con su desviación estándar.

### 3.5.1 Interconversión de pigmentos carotenoides

Se analizó la interconversión de los pigmentos carotenoides involucrados en el ciclo de las xantofilas (CX), para caracterizar la activación/desactivación de este ciclo. Las tres cepas presentaron pigmentos del ciclo que involucra la interconversión de violaxantina a anteraxantina y después a zeaxantina, y el ciclo de la diadinoxantina a diatoxantina (Tabla 7).

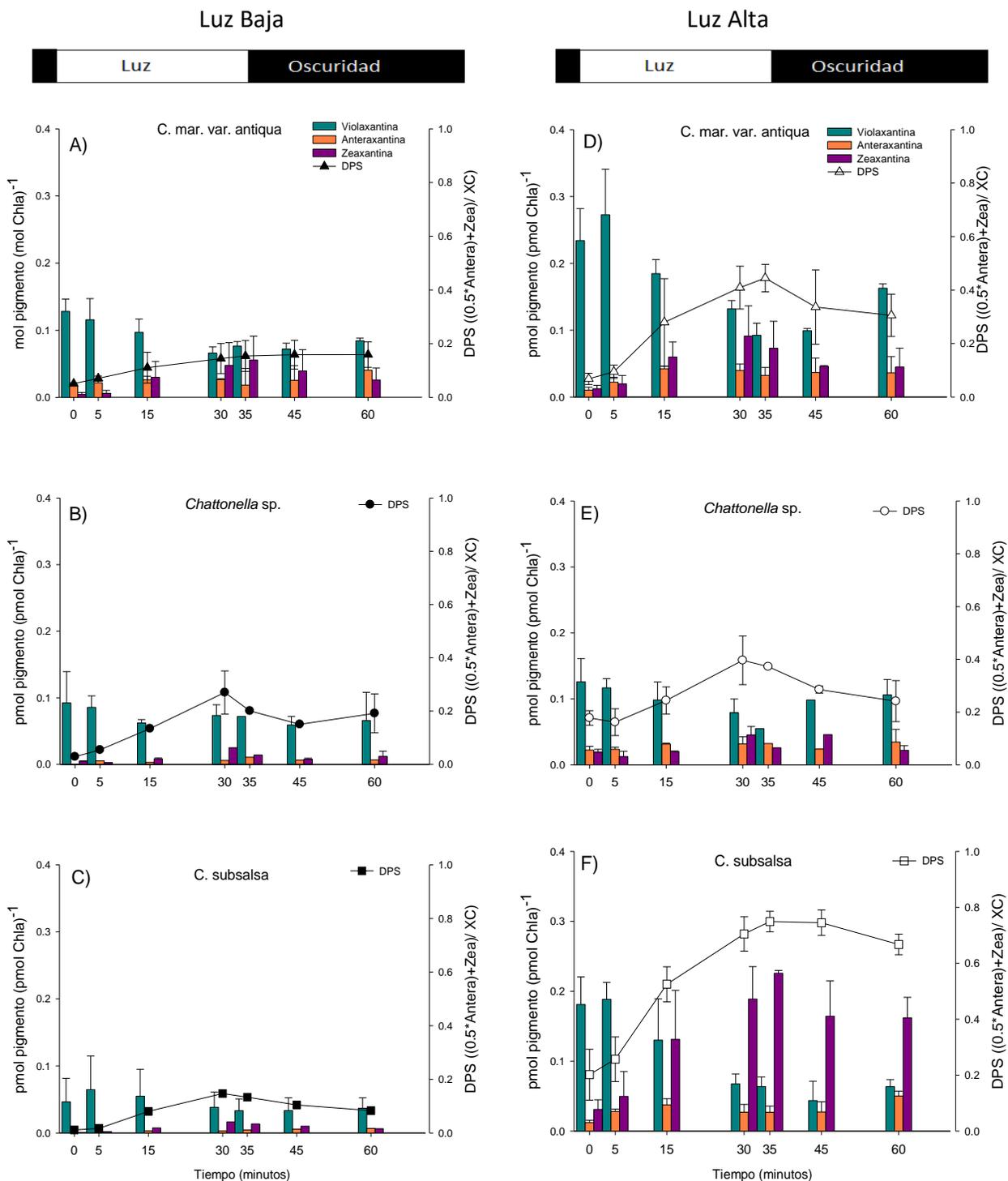
La concentración inicial de los pigmentos de los dos ciclos se presenta en la Tabla 7. Después de la fucoxantina (Tabla 6), la violaxantina (Viol) fue el pigmento carotenoide más abundante para las tres cepas con concentraciones de 0.046 a 0.24 mol Viol mol Chl  $a^{-1}$ , seguido de la anteraxantina (Ant). El contenido de los pigmentos carotenoides fue diferente con las irradiancias de aclimatación en las tres cepas (t-Student,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 7.** Concentración de pigmentos carotenoides de los ciclos de las xantofilas presentes en las cepas de *Chattonella* aclimatadas en las dos aclimataciones de luz. La concentración se presenta normalizada a la concentración de clorofila  $a$  (mol de pigmento mol de Chl  $a^{-1}$ ). Se presenta asimismo, la concentración total de los pigmentos de ambos ciclos ( $\Sigma CX$ ).

Cepa	Luz	Viol	Ant	Zea	Diadi	Diato	$\Sigma CX$
<i>C. mar.</i> <i>var. antiqua</i>	LB	0.13 $\pm$ 0.01	0.005 $\pm$ 0.003	0.018 $\pm$ 0.001	0.003 $\pm$ 0.00	ND	0.15 $\pm$ 0.04
	LA	0.23 $\pm$ 0.04	0.012 $\pm$ 0.005	0.01 $\pm$ 0.004	0.08 $\pm$ 0.01	0.005 $\pm$ 0.002	0.35 $\pm$ 0.08
<i>Chattonella</i> <i>sp.</i>	LB	0.09 $\pm$ 0.04	0.005 $\pm$ 0.001	0.0002 $\pm$ 0.00	ND	ND	0.10 $\pm$ 0.03
	LA	0.13 $\pm$ 0.03	0.019 $\pm$ 0.005	0.023 $\pm$ 0.006	0.03 $\pm$ 0.01	0.009 $\pm$ 0.000	0.21 $\pm$ 0.11
<i>C. subsalsa</i>	LB	0.05 $\pm$ 0.03	0.0001 $\pm$ 0.00	0.001 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.05
	LA	0.19 $\pm$ 0.04	0.031 $\pm$ 0.014	0.012 $\pm$ 0.003	0.04 $\pm$ 0.01	ND	0.27 $\pm$ 0.04

ND= No se detectó el pigmento. Se observaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) según la prueba de t-Student entre las aclimataciones para las tres cepas en todos los pigmentos carotenoides

La concentración más alta de pigmentos carotenoides fotoprotectores expresada como la suma de los pigmentos del XC ( $\Sigma CX$ ) se detectó en las cepas aclimatadas a luz alta (Tabla 7). En todas las cepas y aclimataciones se detectaron cambios en la concentración de estos pigmentos durante el tiempo de exposición a la luz saturante (Figs. 11 y 12).



**Figura 11.** Cambios en la concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (XC) violaxantina, anteraxantina y zeaxantina (barras) y cambios en estado de desepoxidación del XC (DPS) (líneas) durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *C. mar. var. antiqua* (triángulos, A y D), *Chattonella sp.* (círculos, B y E) y *C. subsalsa* (cuadros, C y F). aclimatadas a Luz Baja (símbolos cerrados, A, B y C) y Luz Alta (símbolos abiertos, D, E y F) Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar.

Se caracterizó la variación de la concentración de los pigmentos fotoprotectores durante los 30 minutos de exposición a luz saturante y 30 minutos posteriores en oscuridad en las células de las tres cepas aclimatadas a las dos condiciones de luz. La interconversión de estos pigmentos está relacionada con las reacciones de des-epoxidación en luz, y con las de epoxidación en oscuridad. Se presenta en las figuras 11 y 12 la variación de la concentración de los diferentes pigmentos detectados normalizada a la concentración de la Chl  $\alpha$  y el cambio del estado de desepoxidación (DPS) del CX en las condiciones de experimentación.

Para *C. marina* var. *antiqua* en ambas aclimataciones se observó una disminución significativa en la concentración de Viol a los 30 minutos de exposición a luz saturante, y un incremento en oscuridad (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ). Se presentó una alta variabilidad en las concentraciones de los pigmentos ya que se promediaron los resultados de diferentes días de experimentación para cada cepa ( $n = 3$ ), por lo que no se detectan cambios significativos en la concentración de Ant y Zea (Kruskall-Wallis,  $p > 0.05$ ). Sin embargo, durante la exposición a luz saturante se detectó la síntesis de estos pigmentos asociada con la desepoxidación de la Vio. Esto está representado en el cambio de DPS. Este parámetro, aumentó de  $0.015 \pm 0.003$  hasta  $0.16 \pm 0.05$  en células aclimatadas a LB después de 30 min de exposición a luz saturante. En células aclimatadas a luz alta el cambio de DPS fue mayor. El DPS de  $0.06 \pm 0.02$  aumentó a  $0.30 \pm 0.08$  a los 30 min de exposición a la luz saturante. Después de pasar de luz saturante a oscuridad, la disminución del DPS no ocurrió de manera inmediata. En las células de LB el DPS no disminuyó, y en LA disminuyó después de los 15 minutos en oscuridad (Fig.11 A y D).

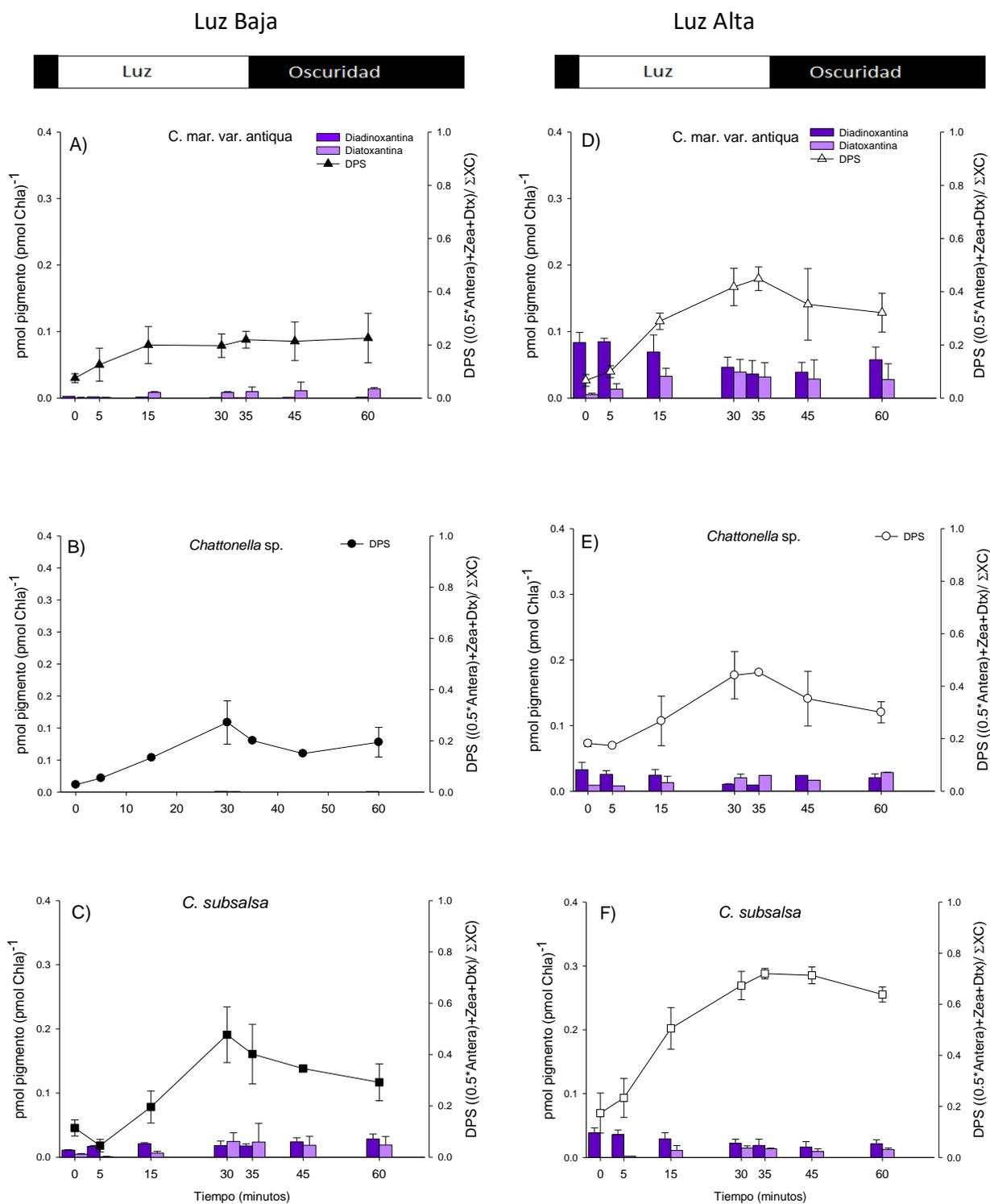
Para la cepa de *Chattonella* sp. se observó un patrón similar tanto en los cambios de DPS, como en la concentración de pigmentos del XC. Aunque no se presentaron cambios significativos en la concentración de Viol-Ant-Zea durante la exposición de luz actínica ni después en la luz baja (Kruskall-Wallis  $p > 0.05$ ), se detectó más Zea a los 30 minutos de exposición a luz saturante (Fig. 11 B). Presentaron un DPS inicial de 0.03 y alcanzaron un DPS de  $0.27 \pm 0.08$  a los 30 min de exposición a la luz saturante, y al finalizar los 30 minutos en oscuridad el DPS disminuyó a  $0.18 \pm 0.08$ . En *Chattonella* sp. aclimatada a luz alta, la variación en la concentración de los pigmentos asociados al XC fue más evidente. La concentración de Viol disminuyó durante el periodo de exposición a la luz saturante y aumentó en la oscuridad (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ) (Fig. 9 E).

Presentaron un DPS mayor que las aclimatadas a luz baja, el cambio de este parámetro fue gradual hasta alcanzar su máximo de  $0.39 \pm 0.09$  a los 30 min de exposición a la luz saturante. Posteriormente, en oscuridad disminuyó de manera gradual hasta  $0.24 \pm 0.07$  después de 30 minutos (Fig. 11 E).

En lo que respecta a *C. subsalsa*, el cambio en la concentración de los pigmentos en respuesta a la luz actínica fue similar que en las otras cepas para la aclimatación a luz baja. En ambas aclimataciones la disminución de Viol fue significativa, asociada con un incremento estadísticamente significativo de Ant y Zea (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ) (Figs. 11 C y F). Se detectó un DPS máximo de 0.15 en luz baja, mientras que en luz alta el valor fue de 0.7 a los 30 minutos de exposición a la luz saturante. Este fue el DPS más alto registrado en las tres cepas y asimismo, se observó una cinética de inducción diferente. El DPS se incrementó de manera exponencial durante la exposición a luz saturante, y disminuyó poco en oscuridad. El DPS presentó un valor de 0.08 al finalizar el tiempo de oscuridad a luz baja y de 0.67 en las aclimatadas a luz alta (Figs. 11 C y F).

Como se describió anteriormente, se detectaron los pigmentos Dtx y Ddx en las tres cepas (Tabla 7), los cuales también presentan cambios en su concentración por procesos enzimáticos (Fig. 12). Para las tres cepas de *Chattonella* en la aclimatación de luz alta se detectó un aumento significativo respecto al valor inicial en la concentración del pigmento fotoprotector Dtx durante la exposición a la luz (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en Ddx en ninguno de los tratamientos (Kruskall-Wallis,  $p > 0.05$ ) (Fig. 12).

Al incluir los pigmentos Dtx y Ddx en el cálculo del DPS, no se observaron cambios en la cinética del DPS (Fig. 12). En *C. subsalsa*, se observaron los valores de DPS más altos en las dos aclimataciones, lo que indica que la cantidad de síntesis de pigmentos fotoprotectores en la exposición a luz alta es mayor en esta cepa (Figs. 12 C y F).

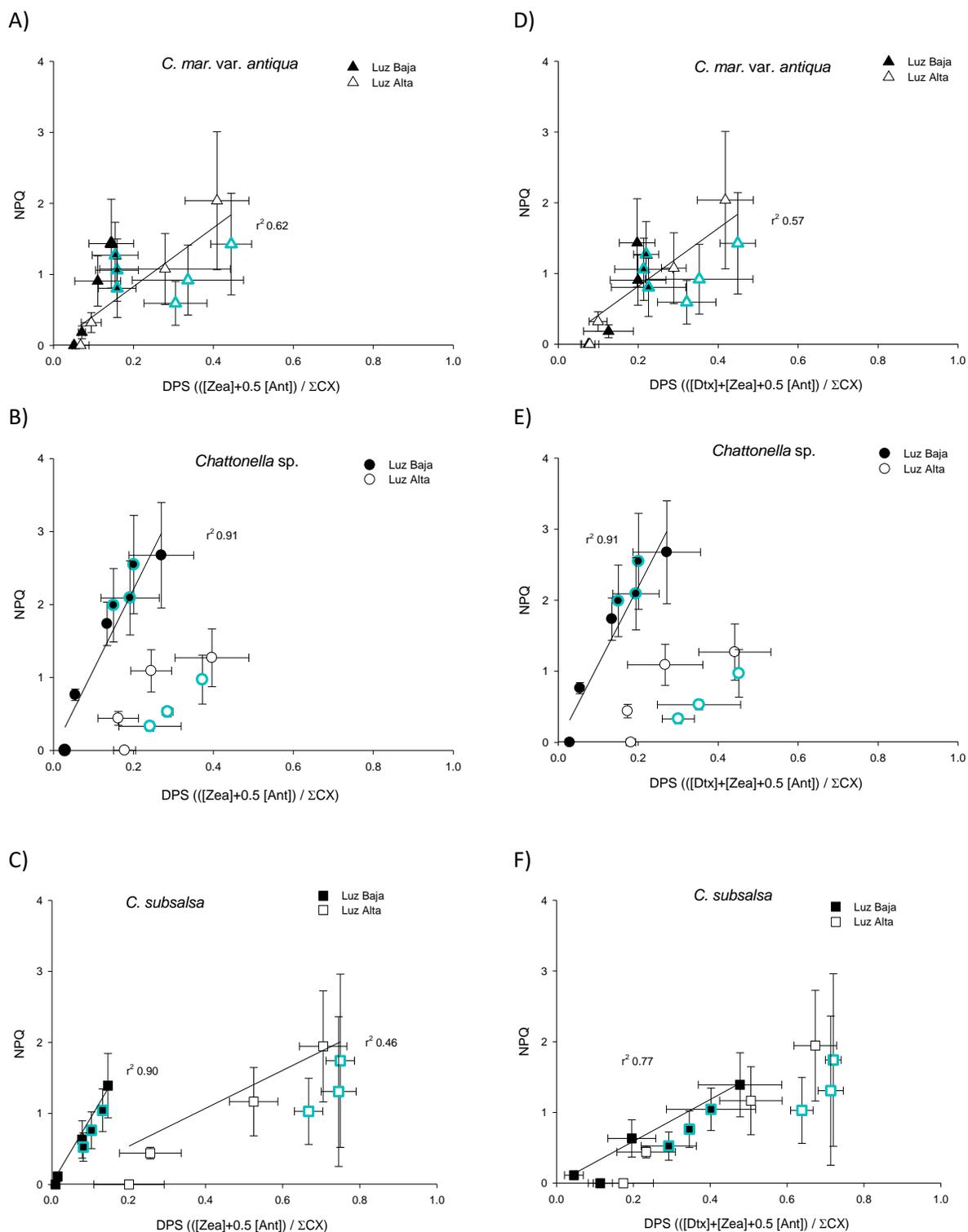


**Figura 12.** Concentración de Diadinoxantina (A y C) y Diatoxantina normalizados por la concentración de Chl  $\alpha$  (barras), y los cambios del grado de desoxidación (DPS) (líneas) de los pigmentos durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Luz Baja (símbolos cerrados, A, B y C) y Luz Alta (símbolos abiertos, D, E y F) de las cepas *C. mar. var. antiqua* (triángulos, A y D), *Chattonella* sp. (círculos, B y E) y *C. subsalsa* (cuadros, C y F). Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar.

El aumento del DPS en células durante la exposición a la luz indica una respuesta fotoprotectora ya que expresa la razón de pigmentos des-epoxidados (pigmentos involucrados en la fotoprotección) con relación al total de pigmentos del XC (con potencial fotoprotector). Por lo tanto, se analizó la relación entre esta variable y el NPQ de las tres cepas en las dos aclimataciones. Se analizó la relación entre el DPS y NPQ mediante un modelo de regresión lineal de acuerdo a la relación reportada entre estas variables para otras cromofitas. No se encontró un patrón homogéneo de la relación DPS y en las tres cepas (Fig. 13).

En *C. mar. var. antiqua*, se observó que la formación de NPQ en las células aclimatadas a luz alta depende del cambio del DPS. Existe una relación lineal entre estas variables incluyendo el cambio de estas en oscuridad después de exposición a luz saturante ( $r^2=0.62$ ,  $p < 0.05$ ). En contraste, en células aclimatadas a luz baja los pigmentos desepoxidados no juegan un papel importante en el control de este proceso. El incremento del NPQ fue independiente del cambio en el DPS (Fig. 13 A). Al incluir los pigmentos Ddx y Dtx en el cálculo del DPS no se detectó un cambio en la relación a (Fig. 13 D). Para las células de *Chattonella sp.* aclimatadas a luz baja se identificó la dependencia más alta de la formación de NPQ con la síntesis de pigmentos des-epoxidados ( $r^2 0.91$ ,  $p < 0.05$ ).

Por el contrario, en las células aclimatadas a luz alta el incremento del NPQ no fue independiente del cambio en el DPS ( $p > 0.05$ ) (Figs. 13. B y E). Para esta cepa, el considerar los pigmentos de CX de la Ddx Dtx tampoco cambio las relaciones de NPQ a DPS. En contraste a esta observación, en *C. subsalsa*, la síntesis de Dtx es importante para la formación de NPQ. La relación NPQ y DPS que es claramente diferente entre las dos aclimataciones al considerar solo la conversión de Viol a Zea (Fig. 13 C) pero es similar cuando se incluyen los pigmentos Ddx y Dtx en el cálculo de DPS ( $r^2 = 0.77$ ; Fig.13 F). La varianza explicada mediante el modelo lineal aumenta si no se considera el cambio de NPQ y DPS en oscuridad después de exposición de las células a luz saturante (Fig. 13 F).



**Figura 13.** Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) y el estado de deepoxidación del conjunto de pigmentos del ciclo de xantofilas (DPS) durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en *C. mar. var. antiqua* (triángulos), *Chattonella* sp. (círculos) y *C. subsalsa* (cuadros) aclimatadas a Luz Baja (símbolos cerrados) y Luz Alta (símbolos abiertos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas y su desviación estándar. El DPS que considera el ciclo violaxantina azeaxantina se presenta en los paneles A, B, y C, y el DPS que incluye a la diadinoxantina y diatoxantina se presenta en los paneles D, E y F. El borde azul señala muestras en oscuridad (tiempo de recuperación).

### 3.5.2 Inducción de NPQ en presencia de un inhibidor del CX

La dependencia del NPQ sobre la síntesis de pigmento desepoxidados se analizó también mediante el uso del dithiothreitol (DTT) que es un inhibidor de la Viol/Ddx desepoxidasa. El DTT causó un efecto negativo en la capacidad de inducir NPQ en las tres cepas.

Este efecto fue mayor en las células aclimatadas a luz alta para *C. mar. var. antiqua*. El NPQ fue 50.6% menor en células incubadas con este inhibidor (0.88 en el control y 0.43 en células con DTT), mientras que en luz baja, la disminución fue menor al 7%.

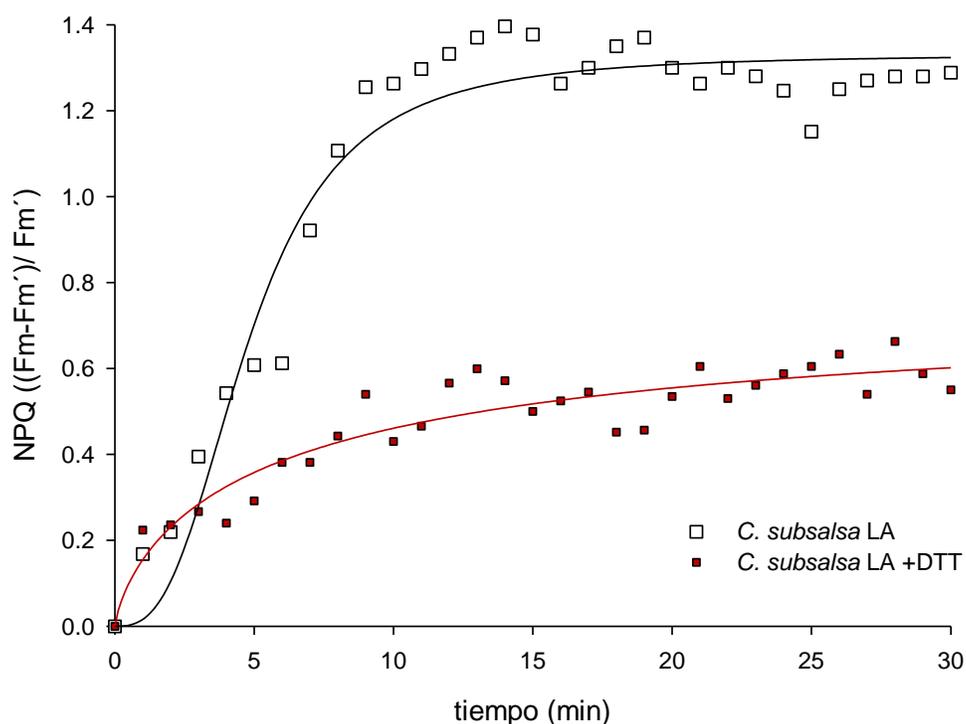
En *C. subsalsa* se identificó el mismo patrón, un mayor efecto negativo en LA con respecto a LB. El NPQ máximo en células aclimatadas a luz baja tratadas con DTT fue de 0.99, mientras que el NPQ en el control fue de 1.04, lo que representa una reducción del 4.4 %. En contraste, el NPQ fue 57.3% menor en las células aclimatadas a luz alta tratadas con DTT (0.55), respecto al control (1.29). Como ejemplo del efecto negativo del DTT, en la figura 14 se presenta la inducción del NPQ en células de *C. subsalsa* incubadas con y sin este inhibidor.

Por otra parte, las células de *Chattonella* sp. presentaron el patrón inverso. El efecto negativo fue mayor en células aclimatadas a luz baja. El NPQ máximo detectado en células tratadas con DTT fue de 0.87, que representa una disminución de aproximadamente un 47.7% del control (1.67). Por otra parte, en luz alta el valor de NPQ máximo fue de 1.09 en células tratadas con DTT y en el control el NPQ fue de 1.52 lo que representa una disminución de solo un 28.40%.

La disminución del NPQ en células tratadas con DTT estuvo asociada a una reducción en la formación de pigmentos desepoxidados. El DTT inhibió casi por completo el DPS ya que se detectó una disminución del 90 al 97% del DPS en el control (Tabla 8).

**Tabla 8.** NPQ y DPS a los 30 min de exposición a luz saturante en células de las cepas de estudio incubadas con (DTT) y sin DTT (control).

Cepa	Luz	DPS		NPQ		
		Control	DTT	Control	DTT	Disminución (%)
<i>C. mar. var antiqua</i>	LB	0.60	0.04	2.83	2.65	6.56
	LA	0.65	0.03	0.88	0.43	50.63
<i>Chattonella sp.</i>	LB	0.58	0.02	1.67	0.87	47.74
	LA	0.68	0.07	1.52	1.09	28.41
<i>C. subsalsa</i>	LB	0.31	0.01	1.04	0.99	4.36
	LA	0.44	0.06	1.29	0.55	57.29



**Figura 14.** Inducción de NPQ durante 30 min de exposición a luz saturante ( $1,400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en *Chattonella subsalsa* aclimatadas a luz alta ( $190 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (cuadros abiertos) y células tratadas con DTT (cuadros rojos).

### 3.5.3 Producción de metabolitos con potencial tóxico

#### 3.5.4 Ácidos grasos

La composición de ácidos grasos (AG) expresada como el porcentaje del total de AG identificados se muestra en la tabla 9. La composición fue similar entre las cepas; sin embargo, se observaron diferencias entre las aclimataciones. Los AG más abundantes fueron los del grupo de los saturados. Los porcentajes mayores se presentaron en LB en las tres cepas. Por el contrario, los AG poliinsaturados se presentaron en mayor proporción en luz alta.

El ácido Palmítico (C16:0) fue el AG saturado con el mayor porcentaje del total de AG, con un 43.01% en *Chattonella* sp. en luz baja. Mientras que en para *C. mar. var. antiqua* y *C. subsalsa* se identificó un porcentaje menor del 20.2% de este AG en esta condición de aclimatación. De los ácidos monosaturados, el ácido palmitoleico (C16:1) fue el más abundante para las tres cepas (6.35% en promedio), con la excepción de *Chattonella* sp. luz baja (2.44%). El ácido eicosapentaenoico (C20:5 (n3)) fue el más abundante de los AG poliinsaturados, con 26.3% para *C. mar. var. antiqua* a luz alta y 18.06% en luz baja. En *Chattonella* sp. y *C. subsalsa*, el AG C20:5 (n3) en luz alta correspondió a un 22%, mientras que en luz baja fue diferente la concentración del ácido, representó un 6.59 y 25.01%, para *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* respectivamente

En la tabla 10 se muestra la concentración en  $\text{ng mL}^{-1}$  de los ácidos grasos con mayor abundancia. C16:0 y C20:5 (n3) fueron los AG con una mayor concentración para las tres cepas. En general, para *C. mar. var. antiqua* se observó una concentración de estos dos AG en promedio 8 veces mayor en luz alta comparada con luz baja. Sin embargo, para *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* se identificó que en luz baja existe una concentración 4 veces mayor en promedio que en luz alta.

**Tabla 9.** Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja (LB, 43  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA, 300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Los valores representan el promedio de dos mediciones. Se resaltan los ácidos grasos con el mayor porcentaje identificado.

Ácidos grasos		<i>C. mar. var. antiqua</i>		<i>Chattonella</i> sp.		<i>C. subsalsa</i>	
		LB	LA	LB	LA	LB	LA
Saturados	C12:0	0.33	0.14	0.30	0.14	0.09	0.15
	C13:0	0.16	0.08	0.06	0.04	0.04	0.07
	<b>C14:0</b>	<b>16.63</b>	<b>5.12</b>	<b>6.93</b>	<b>4.91</b>	<b>30.02</b>	<b>9.48</b>
	C15:0	0.53	0.33	1.62	0.30	0.38	0.50
	<b>C16:0</b>	<b>20.16</b>	<b>16.62</b>	<b>43.01</b>	<b>22.86</b>	<b>18.22</b>	<b>22.05</b>
	C17:0	0.29	0.16	1.02	0.41	0.84	0.13
	<b>C18:0</b>	<b>1.63</b>	<b>1.28</b>	<b>2.72</b>	<b>2.09</b>	<b>2.24</b>	<b>1.40</b>
	C20:0	0.07	0.08	0.07	0.06	0.11	0.08
	<b>C21:0</b>	<b>3.48</b>	<b>2.82</b>	<b>0.60</b>	<b>2.65</b>	<b>3.80</b>	<b>2.70</b>
	C22:0	0.07	0.02	0.00	0.14	0.03	0.20
	C20:2	0.11	0.07	0.00	0.03	0.09	0.09
C23:0	1.15	0.11	0.23	2.23	3.90	3.20	
Monosaturados	C14:1	0.87	1.14	0.33	0.71	0.28	1.17
	C15:1	0.08	0.06	0.08	0.05	0.07	0.02
	<b>C16:1</b>	<b>7.01</b>	<b>6.51</b>	<b>2.44</b>	<b>5.41</b>	<b>6.40</b>	<b>6.44</b>
	C17:1	0.66	1.48	1.83	0.84	1.30	1.57
	<b>C18:1<math>\omega</math>9</b>	<b>1.38</b>	<b>0.12</b>	<b>0.80</b>	<b>2.28</b>	<b>2.01</b>	<b>1.10</b>
	C20:1 $\omega$ 9	0.07	0.09	0.00	0.06	0.15	0.06
Poliinsaturados	<b>C18:3<math>\omega</math>3</b>	<b>2.93</b>	<b>3.51</b>	<b>1.79</b>	<b>5.02</b>	<b>3.36</b>	<b>3.65</b>
	<b>C20:5<math>\omega</math>3</b>	<b>18.06</b>	<b>26.29</b>	<b>6.59</b>	<b>22.00</b>	<b>25.01</b>	<b>22.10</b>
	C22:6 $\omega$ 3	1.48	2.93	0.76	2.54	0.00	1.63
	C18:2 $\omega$ 6t	0.04	0.03	0.27	0.02	0.04	0.47
	C18:3 $\omega$ 6	0.74	0.38	0.91	0.35	1.19	0.47
	C20:3 $\omega$ 6	0.13	2.61	0.00	2.50	0.22	2.63
	C20:4 $\omega$ 6	0.08	0.61	0.00	0.53	0.64	0.59
	DHA/EPA	0.08	0.11	0.12	0.12	0.00	0.07
$\Sigma$ Saturados	44.59	26.82	56.55	35.88	59.77	40.06	
$\Sigma$ Monosaturados	10.48	9.40	6.12	9.67	12.10	10.35	
$\Sigma$ Poliinsaturados	23.47	36.36	10.32	32.96	30.47	31.53	

**Tabla 10.** Concentración (ng mL<sup>-1</sup>) de los principales ácidos grasos de *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja (LB, 43  $\mu$ mol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) y luz alta (LA, 300  $\mu$ mol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). Se presentan el promedio de dos mediciones. Se presenta la relación que existe entre la concentración a luz baja con la de la luz alta.

	<i>C. mar. var. antiqua</i>			<i>Chattonella</i> sp.			<i>C. subsalsa</i>		
	LB	LA	LB:LA	LB	LA	LB:LA	LB	LA	LB:LA
C14:0	2.20	15.83	0.14	4.00	2.31	1.73	4.21	1.59	2.65
<b>C16:0</b>	<b>7.01</b>	<b>20.03</b>	<b>0.35</b>	<b>18.25</b>	<b>14.15</b>	<b>1.29</b>	<b>10.46</b>	<b>1.37</b>	<b>7.63</b>
C18:0	0.55	14	0.36	1.50	0.91	1.66	0.57	0.21	2.74
C21:0	0.32	4.50	0.07	0.01	0.18	0.06	1.10	0.37	2.95
C16:1	2.62	7.73	0.34	4.19	0.90	4.66	3.05	0.66	4.61
C18:1n9	0.18	1.51	0.12	1.47	0.19	7.89	0.61	0.08	7.99
C18:3n3	1.48	3.76	0.39	3.34	0.51	6.53	1.53	0.33	4.68
<b>C20:5n3</b>	<b>11.02</b>	<b>23.01</b>	<b>0.48</b>	<b>13.61</b>	<b>1.76</b>	<b>7.74</b>	<b>7.57</b>	<b>2.34</b>	<b>3.23</b>

### 3.5.5 Producción de anión superóxido

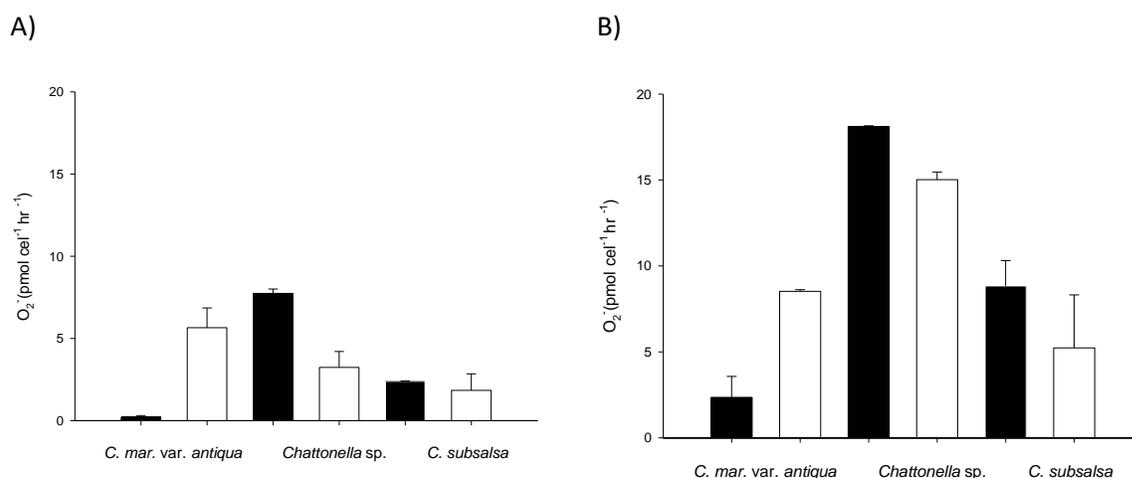
Se cuantificó la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) de las tres cepas en ambas aclimataciones de luz. Las cuantificaciones se realizaron en células adaptadas a oscuridad (condiciones iniciales), y después de 30 min de exposición a luz saturante (1400  $\mu$ mol quanta m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) (Fig. 15), en un tratamiento similar al experimento de inducción de NPQ y cambio en la eficiencia cuántica del FSII.

Las células de *C. mar. var. antiqua* en LB fueron las que presentaron la menor producción inicial de  $O_2^-$  ( $0.21 \pm 0.09$  pmol  $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>). En esta misma aclimatación, las células de *Chattonella* sp. presentaron la mayor tasa de producción de este radical ( $7.74 \pm 0.26$  pmol  $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>) (Fig. 15 A).

Después de la exposición por 30 min a luz saturante, la producción de  $O_2^-$  aumentó para las tres cepas en las dos condiciones de aclimatación. Nuevamente, en *Chattonella* sp. se presentó la mayor tasa de producción, de  $18.1 \pm 0.05$  y  $15.01 \pm 0.4$  pmol  $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> para células aclimatadas a luz baja y alta, respectivamente. Las células de *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja, también presentaron una producción más alta de  $O_2^-$  que en las aclimatadas a luz alta, después del estrés lumínico. En contraste, *C. mar. var. antiqua* presentó un patrón inverso. La tasa de

producción del anión superóxido fue  $5.2 \pm 3.08 \text{ O}_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  en luz baja y de  $8.8 \pm 1.5 \text{ O}_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  en luz alta (Fig. 15 B).

El incremento en el nivel de tasa de producción de  $\text{O}_2^-$  después de la exposición a luz saturante es un indicador de estrés lumínico, y una posible vía de desexcitación, probablemente relacionada con la capacidad de fotoprotección y reflejará la respuesta de aclimatación de las cepas de *Chattonella*.

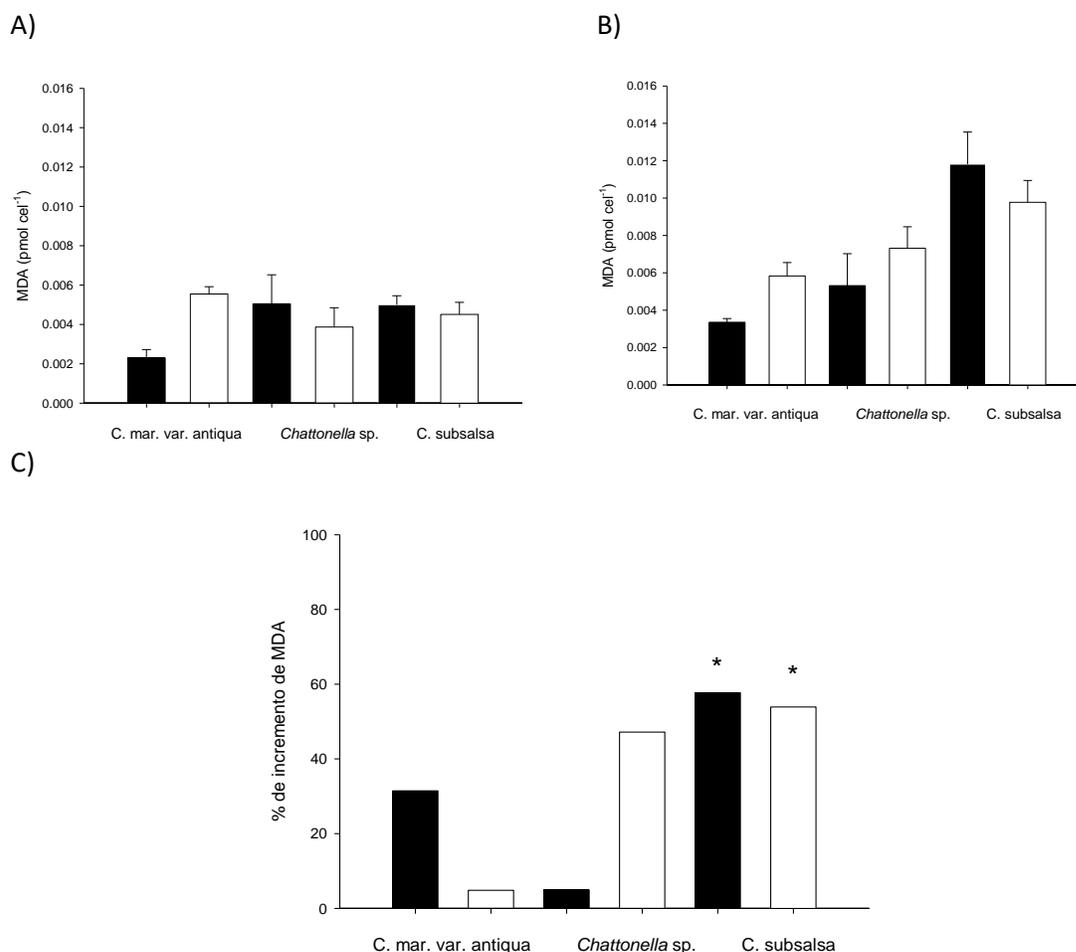


**Figura 15.** Producción del anión superóxido ( $\text{pmol O}_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ) en *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella sp.* y *C. subsalsa* aclimatados a luz baja (barras negras,  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (barras blancas,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), en oscuridad (A) y después de 30 min de exposición a luz saturante de  $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (B).

### 3.5.6 Peroxidación lipídica

Se identificó la concentración de malonaldehído (MDA) como equivalente de la peroxidación lipídica en *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella sp.* y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja y alta. De igual manera que en los experimentos anteriores, se evaluó la concentración de MDA en oscuridad antes de iniciar la iluminación (Fig. 16 A), y después de 30 min de exposición a luz saturante de  $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 16 B).

Las células de las tres cepas presentaron una concentración inicial similar de  $0.006 \text{ pmol MDA cell}^{-1}$  en ambas aclimataciones (Fig. 16A). Después de 30 minutos de exposición a luz saturante, la concentración de MDA se incrementó hasta los  $0.012 \text{ pmol cell}^{-1}$  para *C. subsalsa* en luz baja (Fig. 16 B).



**Figura 16.** Concentración de MDA ( $\mu\text{mol cell}^{-1}$ ) en *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella sp.* y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja (LB,  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y luz alta (LA,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) en oscuridad (A) y después de 30 min de exposición a luz saturante (B). La diferencia en la concentración de MDA entre los dos tratamientos se presenta como porcentaje del incremento de la concentración detectada en oscuridad (C). Los asteriscos representan un incremento significativo según la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ).

La diferencia en la concentración de MDA entre los dos tratamientos se presenta como porcentaje de incremento del valor medido en oscuridad (Fig. 16 C). Se detectó un incremento importante en las células de *C. mar var. antiqua* aclimatadas a luz baja a (30%) y *C. subsalsa* (60%). Este último fue el mayor registrado para todas las condiciones. En las células de *Chattonella sp.* aclimatadas a luz alta también se presentó un incremento significativo en MDA (50%) después de exponer las células a luz saturante. Estos niveles de MDA representan la peroxidación lipídica probablemente asociado al daño oxidativo causado por la luz saturante.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Identificación molecular

Para el género *Chattonella* el uso de los marcadores moleculares es fundamental para su correcta identificación, debido a la gran similitud morfológica entre especies. El análisis filogenético realizado con las secuencias del ITS1-5.8S-ITS2 y el LSU del ADNr demostró que no existen diferencias entre las cepas de la BTS con otras regiones geográficas. Por lo tanto, las especies de la BTS pertenecen al clado que incluye a las variedades *ovata*, *antiqua* y *marina*, de la especie *C. marina*, el cuál fue identificado por Demura *et al.* (2009), y nombrado como “chamo”.

Se ha reconocido que existe una alta homogeneidad genética entre *C. marina*, *C. antiqua*, y *C. ovata* en las regiones D1/D2 del LSU-rDNA e ITS1-ITS2, por lo que se ha propuesto que se trata de variedades de una misma especie (Bowers *et al.*, 2006; Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006; Kamikawa *et al.*, 2009). Incluso Attaran-Fariman y Bolch (2014) reportan que una baja variación genética es una característica de las rafidofitas. Esto es importante, porque la región del ITS es comúnmente utilizada para el análisis filogenético de especies de distintos grupos algales (diatomeas, dinoflagelados). Mediante el análisis de la variación de este marcador se logra distinguir las variaciones inter e intraespecífica de especies fitoplanctónicas, sin embargo, esto no funciona para el grupo de las rafidofitas ( Zoller y Lutzoni, 2003; Leskinen *et al.*, 2004; Orsini *et al.*, 2004).

Al utilizar la región del COI, se identificó que existe una divergencia genética entre las cepas de la BTS. El análisis de las relaciones filogenéticas con este marcador demostró que BTSA pertenece a *C. marina*, y se incluye en el clado chamo, ya que presentó un 100% de similitud con *C. mar. var. antiqua*. Por el contrario, la cepa BTSE no se agrupó con este clado, presenta una alta divergencia genética con las variedades de *C. marina* (0.07). Asimismo, presenta una alta divergencia con *C. subsalsa* (0.16). Es por esto, que se considera que la cepa CBTSB puede ser una especie de *Chattonella* no descrita anteriormente o de la cual no hay secuencias. La identificación de especies nuevas en la actualidad se basa en pruebas moleculares. Por ejemplo, en otros géneros se han descrito nuevas especies a partir de análisis filogenéticos con el uso de

marcadores moleculares. Lundholm *et al.* (2006), describieron dos especies nuevas de *Pseudo-nitzschia*, al identificar distancias genéticas mayores a 0.075.

De acuerdo a los resultados se identificó a la cepa CBTSA como *C. mar. var. antiqua*, mientras que a CBTSB al no corresponder con las especies reportadas anteriormente, se le denominó *Chattonella* sp., hasta no realizar más estudios que prueben inequívocamente que es una especie no descrita.

## 4.2 Características de crecimiento poblacional

Las cepas de *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aisladas del Pacífico mexicano y del Golfo de California crecieron en las condiciones de luz probadas en este trabajo. La cantidad de la luz que recibe el fitoplancton es esencial para el crecimiento poblacional. La duplicación celular aumenta conforme la intensidad aumenta, pero existe una irradiancia máxima que pueden tolerar los organismos. La tasa máxima de crecimiento se presenta cuando los organismos se cultivan a una intensidad cercana a la irradiancia de saturación, y disminuye en intensidad mayores debido a la fotoinhibición. Por lo tanto, la caracterización de la fisiología fotosintética a irradiancias extremas (limitantes y saturantes), permite identificar la fotoaclimatación y plasticidad de las especies fototróficas (Dubinsky y Stambler, 2009; He *et al.*, 2015; Singh y Singh, 2015).

El género *Chattonella* se ha registrado a diferentes profundidades por lo que las células están expuestas a cambios en la cantidad de luz que reciben, pero generalmente se concentran en la superficie (Tilney *et al.*, 2015). En laboratorio se ha reportado que *Chattonella* puede crecer en irradiancias de 15 a 600  $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ , así como en temperatura desde los 15 hasta los 32.5 °C (Zhang *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2010; Imai y Yamaguchi, 2012). Esto indica una plasticidad fisiológica importante del género, y representa una ventaja ecológica.

La intensidad de luz a la que puede crecer *Chattonella* difiere entre especies, variedades e incluso entre cepas. Por ejemplo, Marshall y Hallegraeff (1999), reportan que *C. marina* aislada

del sur de Australia, considerada una cepa adaptada a luz alta, no creció a irradiancias menores de  $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En contraste, *C. mar. var. ovata* aislada de Japón, creció a irradiancias de  $15 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Yamaguchi *et al.*, 2010).

En este trabajo se registró crecimiento poblacional en cepas de *Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y el Golfo de California a una irradiancia de  $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (tratamiento de LB), pero este fue menor respecto a la condición de LA ( $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para las cepas de la BTS. En contraste, la tasa de crecimiento de *C. subsalsa* fue similar en ambos tratamientos. Lo cual indica que las cepas de la BTS se fotoaclimataron a ambas condiciones, mientras que *C. subsalsa* no se aclimató, lo cual puede estar asociado con sus características fotosintéticas ( $E_k$  más bajo) (He *et al.*, 2015; Singh y Singh, 2015).

En LB, la tasa de crecimiento fue de  $0.28 \pm 0.09 \text{ día}^{-1}$  en promedio para las tres cepas, y de 3.5 a 4 días el tiempo de generación, que fue menor a lo reportado para *C. mar. var. antiqua* ( $0.67 \text{ día}^{-1}$ ) y para *C. mar. var. marina* ( $0.52 \text{ día}^{-1}$ ) cultivadas a una irradiancia similar (Imai y Yamaguchi, 2012). Sin embargo, la temperatura y el fotoperiodo que utilizaron Imai y Yamaguchi, (2012) fueron distintos a los utilizadas en este trabajo, por lo que las diferencias pueden ser en respuesta a estas variables.

Por otro lado, una de las características más importantes del género es que a irradiancias altas (hasta  $600 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) no se observa una reducción en su tasa de crecimiento poblacional (Zhang *et al.*, 2006). En el presente trabajo no se probó una irradiancia tan alta; sin embargo,  $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (LA), corresponde a una condición de luz estresante para el crecimiento de distintas especies de microalgas en laboratorio (Bartual *et al.*, 2002; Arredondo-Vega *et al.*, 2017).

En esta condición se observaron diferencias en el crecimiento entre las cepas de la BTS y la aislada de la Bahía de La Paz (Fig. 3B). *C. mar. var. antiqua* y *Chattonella* sp. presentaron una  $\mu$  de  $0.8 \pm 0.1 \text{ div día}$ , y  $0.37 \pm 0.08 \text{ día}^{-1}$  tiempo de generación. Estos valores son más bajos que los reportados en esta irradiancia para *C. mar. var. ovata* ( $1.2\text{-}1.5 \text{ div día}^{-1}$ ), *C. mar. var. antiqua* ( $1.2$

div día<sup>-1</sup>) y *C. mar. var. marina* (1.18 div día<sup>-1</sup>) (Zhang *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2010; Imai y Yamaguchi, 2012).

*C. subsalsa* presentó una tasa de crecimiento de 0.27 día<sup>-1</sup> y 1.1 días de tiempo de generación en LA. Mendoza-Flores (2011) reporta una tasa de crecimiento de 0.39 y tiempo de generación 0.77 para esta misma cepa, pero, en condiciones de cultivo diferentes; de 150  $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$  y  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Por otra parte, *C. subsalsa* aislada de E. U. A. presentó una tasa de crecimiento de 0.7 día<sup>-1</sup> a 300  $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$  y 20 °C (Zhang *et al.*, 2006).

Las diferencias en las características y cinética de crecimiento entre las cepas de la BTS y la de la Bahía de La Paz, indican que las cepas de BTS presentan una fisiología fotosintética que le permite aclimatarse a las condiciones de luz probadas en este estudio.

### 4.3 Características fotosintéticas

La afinidad de *Chattonella* a irradiancias altas parece ser una característica particular del género. Sin embargo, no es claro como la capacidad fotosintética es regulada de acuerdo a la cantidad de luz a la que están expuestas y se desconocen las características de fotoprotección en luz saturante. En este trabajo, se describieron las características fotosintéticas y de fotoprotección en células aclimatadas a 300  $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ , y se contrastaron con una irradiancia baja (43  $\mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ ), condiciones extremas en las que como se describió anteriormente, se observó crecimiento de las cepas probadas.

Las características fotosintéticas derivadas de las relaciones fotosíntesis-irradiancia (P-E) no mostraron diferencias importantes entre las especies con las que se trabajó. Las diferencias mayores se detectaron en función de la irradiancia. Esto puede significar una respuesta adaptativa en la que las células de las tres cepas realizaron cambios en los componentes del aparato fotosintético, con un posible incremento en abundancia de las unidades fotosintéticas en la condición de LB (Falkowsky y LaRoche, 1991; Geider y Osborne, 1992).

Se identificó mayor fotosíntesis neta ( $P_{\max}$ ) por célula ( $\text{nmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cel}^{-1}$ ), así como una mayor eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en células aclimatadas a luz baja. La respuesta de  $P_{\max}$  es el inverso al que ha sido caracterizado en diversos grupos algales, que generalmente es mayor en células aclimatadas a una irradiancia alta (Geider y Osborne, 1992; McIntyre *et al.*, 2002). Las diferencias en  $P_{\max}$  disminuyeron al normalizar por Chl *a*, al igual que como lo reportan Falkowski y Roche (1991). En este sentido, se puede interpretar que las células son más eficientes para realizar fotosíntesis en LB, porque el contenido de Chl *a* es mayor en proporción que en LA. En contraste, Tilney *et al.* (2015), identificaron que *C. subsalsa* presentó un  $P_{\max}$  4 veces mayor en superficie comparado con una profundidad de 2 metros, lo cual indica que el  $P_{\max}$  fue proporcional a la cantidad de luz que reciben las células.

Una característica particularmente importante identificada en las cepas fue que presentaron un  $E_k$  alto. Este parámetro es independiente de la unidad de normalización en la que se exprese la tasa fotosintética. La  $E_k$  fue en promedio para las tres cepas de  $551 \pm 90$  y  $785 \pm 110 \mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$  a luz baja y alta, respectivamente. Este  $E_k$  es mayor que lo reportado anteriormente para diversos grupos;  $306 \pm 13$  para *Skeletonema marina* cultivada a  $250 \mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ ;  $370 \pm 17.5$  y  $276 \pm 14.4$  para *Phaeodactylum tricornutum* cultivada a 200 y  $50 \mu\text{mol quanta m}^2\text{s}^{-1}$ , y de  $514.58 \pm 79.26$  en luz amarilla para *Amphora* sp. (Halac, 2008; Chandrasekaran *et al.*, 2014; Romero-Romero, 2015).

Los valores altos de la irradiancia de saturación ( $E_k$ ) identificados para *C. mar.* var. *antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* en este trabajo explican el comportamiento de *Chattonella* en el medio natural. Se ha identificado que migran a la superficie del mar durante las horas de irradiancia solar más alta, y posteriormente regresan a profundidades mayores (Handy *et al.*, 2005). Este es un comportamiento inverso al de la gran mayoría de los grupos algales, al utilizar la migración vertical para evitar la exposición a luz saturante (Kingston, 1999). Este comportamiento puede estar relacionado con los mecanismos de fotoprotección, ya que como se comentó no se observaron diferencias entre aclimataciones en la eficiencia para realizar fotosíntesis.

### 4.3.1 Concentración de pigmentos

Las cepas de *Chattonella* de la región de estudio presentaron el perfil de pigmentos típico reportado para el género, y en general para las rafdofitas (Mostaert *et al.*, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2012; Klöpffer *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2019). Las especies presentaron clorofila a, c1 y c2, además de los pigmentos accesorios fucoxantina,  $\beta$  caroteno, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, diadinoxantina y diatoxantina. No se presentaron diferencias entre el perfil pigmentario de las tres cepas analizadas, lo cual confirma que no es posible utilizar la composición pigmentaria como un marcador específico de las especies de este género (Klöpffer *et al.*, 2013).

La Chl *a* presentó una concentración de 0.078 a 0.24 pmol cel<sup>-1</sup>; equivalente a 0.09 a 0.26 ng cel<sup>-1</sup>. La concentración de este pigmento por célula para *Chattonella* es muy variable entre diferentes trabajos. Kok *et al.* (2019) reporta de 0.003 a 0.03 ng Chl *a* cel<sup>-1</sup> para cepas de *C. subsalsa* aisladas de Singapur, un orden de magnitud menor al que encontramos en este trabajo. Por otra parte, Band-Schmidt *et al.* (2012) reportan valores mayores (de 0.26 a 0.495 pmol cel<sup>-1</sup>) para cepas aisladas en el Golfo de California.

La fucoxantina fue el pigmento accesorio dominante (0.045 a 0.13 pmol Chl *a* cel<sup>-1</sup>; equivalente a 0.01 a 0.08 ng Chl *a* cel<sup>-1</sup>) lo cual concuerda con lo reportado anteriormente (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall y Newman (2002); Band-Schmidt *et al.*, 2012; Klöpffer *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2019).

Se observaron cambios significativos en la concentración de estos pigmentos en células de *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatadas a luz alta y baja. La concentración de Chl *a* fue mayor en luz baja. Marshall y Newman (2002), identificaron una disminución del contenido de Chl *a* en cepas de *C. marina* aisladas de Australia y Japón cuando fueron aclimatadas a luz alta (500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), comparado a la aclimatación de luz baja (<150  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

En *C. marina* var. *antiqua* no se observaron cambios en la concentración de pigmentos entre las dos aclimataciones probadas. La variación en la concentración pigmentaria es una de las expresiones fenotípicas más evidentes de aclimatación en organismos fotosintéticos (Geider y

Osborne, 1992). En organismos aclimatados a irradiancias bajas se presenta un incremento en el tamaño del complejo antena en las unidades fotosintéticas y por lo tanto se produce un aumento en el contenido de pigmentos, y de esta forma tiende a incrementar la tasa de absorción de luz (Falkowsky y LaRoche, 1991; Geider y Osborne, 1992). Esta baja plasticidad en el ajuste de la concentración de pigmentos involucrados principalmente en la absorción de luz o de estructura de las antenas pigmentarias (no fotoprotectores) indica que *C. marina* var. *antiqua* presenta una afinidad mayor a condiciones de luz alta. Esto se ve reflejado en una menor tasa de crecimiento en esta condición ( $0.21 \text{ día}^{-1}$ ), y la mayor en luz alta ( $1.0 \text{ día}^{-1}$ ). Una respuesta de afinidad a luz alta es la concentración de pigmentos fotoprotectores ( $\Sigma CX$ ). Esta cepa presentó una concentración mayor que las demás cepas en células aclimatadas a alta luz. Estos resultados se discuten en la siguiente sección.

## 4.4 Mecanismos de Fotoprotección

### 4.4.1 Evaluación de la eficiencia cuántica máxima

Las respuestas a la exposición a cambios a irradiancias saturantes y la expresión de mecanismos de fotoprotección ha sido documentada en diatomeas, dinoflagelados y clorofitas (Greene *et al.*, 1992; He *et al.*, 2015; Smerilli *et al.*, 2017). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la repuesta de rafidofitas y particularmente de *Chattonella* a cambios en la irradiancia, así como los mecanismos de fotoprotección que se expresan bajo condiciones de luz saturante.

Con el monitoreo de la fluorescencia de la clorofila a del FSII se identificó que la eficiencia cuántica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) fue en promedio de  $0.7 \pm 0.02$  en luz baja y de  $0.62 \pm 0.01$  en luz alta, para las tres cepas de *Chattonella*. El  $F_v/F_m$  es una medida del potencial de trabajo máximo del FSII y depende de la transferencia de energía a los centros de reacción, y en qué proporción los centros de reacción se encuentren abiertos y funcionales, por lo cual está en función de la aclimatación de los organismos fotosintéticos (Greene *et al.*, 1992). Un valor bajo de esta variable indica que cierta proporción de los centros de reacción está dañado, que a

menudo se asocia a una condición de estrés que mantiene cierta proporción del FSII inactivo (Ragni *et al.*, 2008).

Asimismo, la estructura y composición del aparato fotosintético influyen en la eficiencia de transferencia de energía en las antenas proteico-pigmentarios de FSII y, por lo tanto, el Fv/Fm máximo es diferente entre diferentes grupos algales (Greene *et al.*, 1992). El valor de Fv/Fm de 0.7 para las células aclimatadas a BL es similar al reportado ( $0.68 \pm 0.03$ ) por Qiu *et al.* (2017) en muestras de un florecimiento de *C. marina* en Japón. Este valor máximo de Fv/Fm también es similar al registrado para *Heterosigma akashiwo* (0.64), otra rafdofita, y parece ser una característica de este grupo algal (Hennige *et al.*, 2013). El valor bajo registrado en las células aclimatadas a LA puede indicar una acumulación de daño del FSII como se mencionó. Sin embargo, también puede estar asociado a la regulación de este sistema (“down-regulation”) acumulando pigmentos disipadores de energía como se discutirá posteriormente (Warner y Madden, 2007).

La eficiencia cuántica efectiva del FSII ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) se mide al exponer a un organismo fototrófico a luz y es generalmente menor a Fv/Fm. En la  $\Phi_{\text{FSII}}$  se refleja la proporción de centros de reacción de FSII que se encuentran cerrados (QA, el primer aceptor de electrones, reducido) (Greene *et al.*, 1992; Maxwell y Johnson, 2000). Asimismo, la disminución de esta variable en luz refleja la regulación del FSII, por ejemplo, la inducción de la disipación de calor y la acumulación de daño en este sistema. La  $\Phi_{\text{FSII}}$  disminuyó de manera inmediata un 80% del Fv/Fm durante la exposición a la luz saturante para las células aclimatadas a luz alta, y hasta un 90% para las aclimatadas a luz baja. Lo cual señala una reducción mayor de los centros de reacción del FSII en estas últimas.

Al mantener a las células en una irradiancia saturante se inducen los procesos involucrados en la disipación térmica y los mecanismos de fotoprotección, asimismo se acumula daño por el estrés lumínico. El daño en los centros de reacción, es reparado al final del fotoperiodo en condiciones de baja intensidad lumínica o en oscuridad (Anderson y Barber, 1996) y se ve reflejado en una recuperación del Fv/Fm. Los diferentes procesos descritos se vieron reflejados en los cambios

en las cepas de *Chattonella* expuestas a luz saturante por 30 minutos ( $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), y posteriormente en oscuridad por 30 minutos.

La recuperación rápida del Fv/Fm en oscuridad está relacionado con la oxidación del el PSII y pérdida del gradiente de protones en la membrana tilacoide ( $\Delta\text{pH}$ ), proceso que ocurren en segundos. La recuperación de Fm (aumento de Fv/Fm) se induce en luz pero que se disipa a una tasa más lenta, por la pérdida del NPQ inducido por la presencia de pigmentos fotoprotectores. Es decir, refleja la epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (ver sección 4.4.2). Por último, la recuperación más lenta del Fv/Fm se relaciona con la reparación de los FSII afectados durante la exposición a luz saturante.

En las tres cepas en ambas aclimataciones no se detectó la componente de recuperación del Fv/Fm más rápida (segundos). Se observó que las células aclimatadas a luz alta presentaron una recuperación mayor y en menor tiempo de la eficiencia fotosintética comparada con las aclimatadas en luz baja. Esto se asocia a una mayor expresión de los mecanismos de fotoprotección en células aclimatadas a luz alta. La recuperación de Fv/Fm más lenta está relacionada con daño del FSII, y su lenta reparación (Halnet, 1998). En este caso, *Chattonella* sp. en LB fue en la que se identificó el mayor daño, mientras que en *C. mar. var. antiqua* en LA, la recuperación ocurrió en el menor tiempo, lo cual está relacionado probablemente con la inducción de la disipación térmica que puede disipar el exceso de energía reduciendo el daño del FSII.

#### **4.4.2 Inducción y disipación de NPQ**

El análisis de cambio en la fluorescencia máxima de la clorofila del FSII a está relacionado con los procesos que afectan esta variable independientemente de la fotoquímica (producción de calor) en las cepas de *Chattonella* y que tiene una función de fotoprotección. Se identificó la disipación del exceso de energía en forma de calor (NPQ) al exponer a las cepas a luz saturante. Este es el primer trabajo donde se caracteriza la inducción de NPQ y mecanismos asociados para el género. Warner y Madden (2007) reportaron que *C. subsalsa* aislada de la costa este de E.U.A.

no presentó cambios significativos en NPQ al ser expuesta a luz alta (600 quanta  $m^2s^{-1}$ ). Sin embargo, estos autores no caracterizaron la inducción rápida de este proceso y en este trabajo se utilizó luz saturante de 1400 quanta  $m^2s^{-1}$ , lo cual es más del doble de lo que Warner y Madden (2007) probaron.

El valor promedio de NPQ (1.83 en LB y 1.76 en LA) identificado para las cepas de *Chattonella* es mayor al que reportan Hennige *et al.* (2013) para la rafidofita *Heterosigma akashiwo* (de 0.1 a 0.6) en 6 horas de exposición a luz alta. Sin embargo, es menor al NPQ que se ha registrado para otros grupos algales; algas verdes (2), dinoflagelados (6) y del mismo filo Heterokontophyta como diatomeas (0.61-3.5) y algas pardas (6.81) (Casper-Lindley y Björkman, 1998; Colombo-Pallotta *et al.*, 2006; Halac, 2008; Chandrasekaran *et al.*, 2014; Stamenković, *et al.*, 2014; Murillo-Martínez, 2015;).

Por otra parte, no se identificaron diferencias significativas en el NPQ expresado entre ambas aclimataciones. Esto está asociado a la alta variabilidad en las mediciones, debido a que las células no pudieron ser agitadas a altas revoluciones, y en momentos no se logró la homogeneidad en la concentración de estas al pasar por el sensor de fluorescencia. Sin embargo, el NPQ fue más alto en luz alta para *C. mar.* var. *antiqua* y particularmente en *C. subsalsa*, lo cual es una respuesta típica de aclimatación en estas condiciones. Al existir estrés por luz, los organismos aclimatados a luz alta priorizan la expresión de los mecanismos de fotoprotección en comparación a los aclimatados a luz baja (Goss y Lepetit, 2015).

#### **4.4.3 Interconversión de pigmentos carotenoides**

El exceso de energía absorbido se disipa a través de la formación de sumideros de energía que reducen la presión en los fotosistemas. La síntesis de los pigmentos desepoxidados forman parte de estos sumideros de energía, y son sinterizadas a través del ciclo de las xantofilas que es uno de los principales mecanismos de formación de NPQ que puede llegar a disipar hasta el 75% de la energía de los fotones absorbidos (Armbruster *et al.*, 2014). Al igual que la caracterización del NPQ, existen pocos reportes de la interconversión de pigmentos del CX para *Chattonella*.

Marshal y Newman (2002), identificaron diferencias en la concentración de Viol y Zea entre aclimataciones de luz en *C. marina* aislada de Japón, por lo que propusieron que utilizan el ciclo de xantofila en altas intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Las tres cepas de estudio presentaron pigmentos del ciclo que involucra la interconversión de Viol a Ant y después a Zea, también se identificaron los carotenoides del ciclo de la Ddx a Dtx. Las diatomeas y dinoflagelados bajo distintos tratamientos de luz específicos también presentan ambos ciclos, sin embargo el ciclo de Ddx a Dtx es el más importante (Goss y Lepetit, 2015).

En luz baja no se detectó a la Dtx en oscuridad, pero sí se identificó este pigmento cuando se expusieron las células a luz saturante. Trabajos anteriores de pigmentos carotenoides en *Chattonella* no incluyen a Dtx (Mostaert *et al.*, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2012; Klöpffer *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2019). Sin embargo, en esos trabajos *Chattonella* no fue expuesta a condiciones de estrés lumínico.

En la aclimatación de LA se presentó la mayor concentración de carotenoides asociados a la fotoprotección. El CX fue hasta 4.5 mayor en esta condición que en LB para *C. subsalsa*. Asimismo, el DPS fue más alto en LA en comparación con luz baja. Esto se ha reportado comúnmente en organismos aclimatados a luz alta; acumulan más pigmentos del CX para proteger al FSII de manera más eficiente que las células con poca luz (Ragni *et al.*, 2008; Büchel, 2019).

Los valores de DPS al exponer a las células a luz saturante fueron bajos (menor al 60%), los más altos se identificaron para *C. subsalsa* en luz alta. Los valores son similares a los reportados para diatomeas, de entre 33 y 50% (Olaizola *et al.*, 1994). Pero menores a los que reportan en microalgas verdes (hasta 80%) (García-Mendoza *et al.*, 2002).

Por otra parte, la relación del NPQ y el estado de desepoxidación (DPS), no presentó un patrón homogéneo para las tres cepas. La relación lineal entre estos dos parámetros es un indicador de la capacidad de fotoprotección de las células, y representa la proporción de pigmentos relativos al XC que están involucrados en el proceso de disipación de energía como calor.

Para *C. marina. var. antiqua* en luz alta la formación de NPQ depende del cambio del DPS. Por el contrario, para *Chattonella* sp. aclimatada a luz alta el incremento del NPQ fue independiente del cambio en el DPS, mientras que en luz baja se identificó la dependencia más alta de la formación de NPQ con la síntesis de pigmentos desepoxidados. Por su parte, en *C. subsalsa*, la síntesis de Dtx es importante para la formación de NPQ. La relación NPQ y DPS que es claramente diferente entre las dos aclimataciones al considerar solo la conversión de Vio a Zea, es similar cuando se incluyen los pigmentos Ddx y Dtx en el cálculo de DPS. En otros grupos, se ha identificado una asociación importante entre DPS y NPQ, por ejemplo en la microalga verde *C. fusca* y la macroalga *M. pyrifera*, los cambios entre estos parámetros sugieren que la formación los pigmentos carotenoides constituye un componente importante de NPQ (García-Mendoza *et al.*, 2002, Ocampo-Alvarez *et al.*, 2012).

La adición de DTT, permitió identificar que efectivamente existe una dependencia del NPQ sobre la síntesis de pigmento desepoxidados para *C. marina. var. antiqua* y *C. subsalsa* en LA, y *Chattonella* sp. en LB. El DTT inhibió casi por completo el DPS, y el NPQ disminuyó un 50%. Esto indica que la síntesis de los pigmentos Ant, Zea y Dtx, por medio de la actividad de las enzimas violaxantina y diadinoxantina desepoxidasa permiten la disipación del exceso de energía del FSII durante la exposición a luz saturante. El efecto del DTT sobre la inducción de NPQ en células aclimatadas a LB fue bajo excepto en *Chattonella* sp.

En plantas superiores y en microalgas verdes, se ha reportado que una proporción importante de NPQ permanece en muestras tratadas con DTT. Esa proporción de NPQ ha sido asociada con la formación del gradiente de protones (Müller y Niyogi, 2001). Sin embargo, en *Chattonella* este proceso no controla el NPQ ya que no se observó una disminución inmediata (y aumento de Fv/Fm) del NPQ en la transición de luz saturante a oscuridad. La disipación del NPQ controlado por el  $\Delta pH$  se disipa en segundos una vez que desaparece este gradiente en oscuridad (Nilkens *et al.*, 2010) . El modelo de control del NPQ parece ser similar al propuesto para algas pardas (García-Mendoza y Ocampo-Alvarez, 2011; Ocampo-Alvarez *et al.*, 2012) y depende solamente de la acumulación de Zea y Dtx.

## 4.5 Producción de metabolitos tóxicos

### 4.5.1 Ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos (AG) caracterizado para las cepas de *Chattonella* de la región coincide con lo reportado anteriormente para este género, y otras rafdofitas (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2002c; Band-Schmidt *et al.*, 2012; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013).

Los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3) fueron los más abundantes, con concentraciones similares entre las cepas. Sin embargo, se identificó que en luz baja se presentaron las mayores concentraciones. Este resultado difiere a lo reportado por Dorantes-Aranda *et al.* (2013) para *C. marina* aisladas de Australia y Japón, que presentaron los niveles más altos de AG en células aclimatadas a intensidades altas de luz (500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Los AG son importantes para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares, y en organismos, como los peces, son precursores de activadores biológicos del metabolismo (Tocher, 2003; Vizcaíno-Ochoa *et al.*, 2010). Sin embargo, la toxicidad de *Chattonella* es causada, al menos en parte, por los ácidos grasos que producen, principalmente por el efecto negativo de los ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5 $\omega$ 3), araquidónico (20:4 $\omega$ 6), octadecatetraenoico (OTA, 18:4 $\omega$ 3) y el docosahexaenoico (DHA, 22:6 $\omega$ 3) (Marshall *et al.*, 2002c; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013). El efecto tóxico de estos compuestos actúa sinérgicamente con la producción de ROS (Marshall *et al.*, 2003).

Las concentraciones de los AG de mayor importancia de las cepas en este estudio son similares a las reportadas anteriormente. Las concentraciones del EPA (6.6 a 26.3%) y DHA (máximo de 2.93%) fueron similares a lo reportado por Band-Schmidt *et al.*, (2012) y Dorantes-Aranda *et al.*, (2013) de 8.5 a 27.6% y 0.6 a 3.6 %, respectivamente. La concentración de EPA fue mayor que lo reportado para el dinoflagelado *Alexandrium catenella* (3.2 a 4.2%), mientras que fue menor que el de DHA (16 a 20%) (Mardones *et al.*, 2015). Por otra parte, la concentración del ácido araquidónico (20:4 $\omega$ 6) (0 a 0.06%) fue menor a lo reportado anteriormente (0.6 a 5.5%), mientras que el ácido octadecatetraenoico (OTA, 18:4 $\omega$ 3) no se identificó en las cepas de

estudio, pero en otros trabajos se ha encontrado hasta en un 21.8% (Band-Schmidt *et al.*, 2012; Dorantes-Aranda *et al.*, 2013).

El ácido palmítico (C16:0), por otro lado, fue el AG con mayor abundancia (de 16 al 43%) y es del grupo de los saturados. Este AG es común en la mayoría de las microalgas marinas, incluidas las tóxicas y no tóxicas (Marshall *et al.*, 2002c). El porcentaje identificado en este trabajo fue mayor a lo reportado para cepas de *Chattonella* (11 -24.9%) por Band-Schmidt *et al.* (2012) y Dorantes-Aranda *et al.* (2013), e incluso mayor que lo reportado para el dinoflagelado *Alexandrium catenella* (21.4 a 35.83%) (Mardones *et al.*, 2015).

Una concentración alta de AG representa una mayor probabilidad de reaccionar con las ROS, lo que definiría un alto potencial de toxicidad del género. Estos resultados estarían relacionados con las mortandades de atunes cultivados que causaron las cepas de la BTS en 2016 (García-Mendoza *et al.*, 2018).

#### 4.5.2 Anión superóxido

El anión superóxido ( $O_2^-$ ) producido por *Chattonella* representa una de las ROS de mayor importancia por su efecto ictiotóxico. *Chattonella marina* produce hasta 100 veces más  $O_2^-$  que la mayoría de los grupos algales (Marshall *et al.*, 2002c).

En el fitoplancton, los cloroplastos, mitocondrias, el peroxisoma y la superficie celular son los sitios principales donde se producen las ROS. Diaz y Plummer (2018), mencionan que es poco probable que los procesos intracelulares como la fotosíntesis sea una fuente directa del anión superóxido extracelular derivado biológicamente, ya que el  $O_2^-$  no cruza fácilmente las membranas biológicas. Sin embargo, en las tres cepas de *Chattonella* en las dos condiciones de aclimatación, se observó un incremento en el nivel de producción de  $O_2^-$  después de la exposición a luz saturante. Esto sugiere que la producción de ROS depende de la fotosíntesis y probablemente sea una posible vía de desexcitación del potencial de reducción que se acumularía por este proceso en el aparato fotosintético.

La mayor producción de  $O_2^-$  se detectó en *Chattonella* sp. ( $18.1 \pm 0.05$  y  $15.01 \pm 0.4$  pmol  $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> para células aclimatadas a luz baja y luz alta, respectivamente). Esto se asocia con una menor capacidad de fotoprotección por el CX en las células aclimatadas a luz alta. Aunque existió inducción de NPQ y cambios en el DPS, la recuperación más baja del Fv/fm en oscuridad después del tratamiento de estrés por luz se observó en esta cepa.

Por otra parte, las células de *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja, también presentaron una producción más alta de  $O_2^-$  que las aclimatadas a luz alta, después del estrés lumínico. Sin embargo, la producción del anión fue mucho menor que en *Chattonella* sp. Probablemente, esto se relaciona con que la síntesis de Dtx es necesario para la formación de NPQ, y que presentaron el DPS más alto de todas las cepas, brindando estos mecanismos una mayor capacidad de fotoprotección.

Es importante señalar que se identificó una producción del anión de hasta  $7.74 \pm 0.26$  pmol  $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en oscuridad (condición inicial), antes de ser expuestas a luz. Lo cual sugiere que también existen mecanismos no fotosintéticos para la producción del superóxido (Oda *et al.*, 1998; Diaz y Plummer, 2018). En otros géneros, como en el dinoflagelado *Symbiodinium* spp., y en la diatomea *Thalassiosira* spp. también se ha identificado que producen el anión superóxido en oscuridad (Saragosti *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2016. Sin embargo, se desconoce cómo es que las células producen altos niveles de  $O_2^-$  bajo aparentemente condiciones fisiológicas óptimas.

*C. marina* var. *antiqua* presentó un patrón inverso en la producción del anión en comparación a las demás cepas. La producción del anión superóxido fue  $8.8 \pm 1.5$   $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en luz alta y de  $5.2 \pm 3.08$   $O_2^-$  cell<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup> en luz baja. En esta cepa se observó la menor producción del anión. Se considera que la baja concentración inicial de  $O_2^-$  contribuyó a que no se alcanzaran valores similares a los de las otras cepas después de los 30 minutos de exposición a luz saturante, porque probablemente no ha desarrollado los mecanismos no fotosintéticos que producen  $O_2^-$

Se ha propuesto que la fotosíntesis está involucrada indirectamente en la producción extracelular de este ROS al suministrar NADPH a la NADPH oxidoreductasa localizada en la superficie celular (así como en la membrana de los cloroplastos), y esta a su vez produce el  $O_2^-$  (Marshall *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2007; Saragosti *et al.*, 2010). Esto concuerda con lo detectado en este trabajo. Por lo tanto, el consumo de NADPH mediante la producción de  $O_2^-$  representaría un sumidero (“sink”) de electrones producido en el aparato fotosintético y representaría una vía indirecta de fotoprotección al disminuir la presión en este sistema en condiciones de luz estresante. Esto reduciría la formación de estados excitados de la clorofila de larga vida (Chl  $a^3$ ) que pueden interactuar con el  $O_2^-$ , y producir ROS cerca del FSII (Berne *et al.*, 2018).

#### 4.5.3 Peroxidación lipídica

Se evaluó la concentración de malonaldehído (MDA) como equivalente de la peroxidación lipídica en *C. mar. var. antiqua*, *Chattonella* sp. y *C. subsalsa* aclimatadas a luz baja y alta. La peroxidación lipídica se produce cuando los ROS reaccionan con los ácidos grasos en las células y las membranas celulares, esta peroxidación es citotóxica y puede dañar el ADN y las enzimas (Keppler *et al.*, 2006).

Después de 30 minutos de exposición a luz saturante, la concentración de MDA se incrementó para las tres cepas. El incremento más bajo de MDA (30%) se detectó en las células de *C. mar. var. antiqua*. Esto indica que la luz saturante causó el menor daño oxidativo en esta cepa, lo que concuerda con los resultados de la recuperación de la eficiencia cuántica máxima del FSII (Fv/Fm). En esta cepa se observó la mayor recuperación de hasta un 80 y 90% del valor inicial de Fv/Fm, con un  $t_{1/2}$  de entre 2 y 4 minutos. Asimismo, la producción del anión superóxido fue la más baja de 5.2 a 8.8  $O_2^- \text{ cell}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ , por lo que la probabilidad de que exista la peroxidación lipídica disminuye.

Por otra parte, en *C. subsalsa* en ambas aclimataciones y *Chattonella* sp. en luz alta se presentó un incremento significativo en MDA (50 y 60%) después de exponer las células a luz saturante.

Estas cepas presentaron una recuperación de Fv/Fm más lenta y menor, que probablemente estuvo asociada a la acumulación de la peroxidación lipídica asociado al daño oxidativo causado por la luz saturante.

Esta respuesta ha sido documentada anteriormente en otros grupos. Por ejemplo, en la diatomea marina *Thalassiosira pseudonana*, el aumento relativo de irradiancia tuvo un efecto negativo en Fv/Fm, acompañada con un incremento en la peroxidación lipídica, al duplicarse la concentración de MDA bajo radiación UVA y triplicar la concentración al adicionar UVB (Rijstenbil, 2002).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Las cepas aisladas de la Bahía de Todos Santos CBTSA y CBTSB se identificaron como *Chattonella marina* var. *antiqua* y *Chattonella* sp., respectivamente, al utilizar la región del COI. Esta última, probablemente es una especie no descrita anteriormente.

*C. mar.* var. *antiqua* y *Chattonella* sp. expresaron respuestas de aclimatación que se reflejaron en un crecimiento poblacional diferente en las irradiancias de cultivo probadas. La tasa de crecimiento y abundancia celular máxima fue mayor en luz alta ( $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) en comparación a luz baja ( $43 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). En *C. Subsalsa* la tasa de crecimiento fue similar en ambos tratamientos.

Las especies presentaron diferencias en las características fotosintéticas entre las condiciones de cultivo, como una respuesta de fotoaclimatación. La fotosíntesis máxima fue más alta en la condición de LB, por un posible incremento en la abundancia de las unidades fotosintéticas, reflejado con el aumento en el contenido de Chl *a*, pero no una regulación de actividad enzimática de la fijación de carbono inorgánico. Esto representa una afinidad a altas irradiancias, que se comprobó al detectar una luz de saturación alta en células cultivadas en las dos aclimataciones.

Las tres especies presentaron una inducción y disipación de (NPQ) dependiente del estado de desepoxidación (DPS) de los carotenoides de los dos ciclos de las xantofilas identificados. La expresión de este proceso representa un mecanismo de fotoprotección en luz saturante.

No se encontraron diferencias en la concentración y el perfil de ácidos grasos entre las especies. La concentración de AG y del anión superóxido fue mayor en células aclimatadas a luz baja. Sin embargo, la exposición a luz saturante se observó un incremento en el nivel de producción de  $\text{O}_2^-$  lo que indica que la producción de esta ROS depende de la fotosíntesis.

Aunque se observaron mecanismos de fotoprotección también se observó un daño oxidativo, como un incremento en la peroxidación lipídica, por lo que se considera que la producción del anión superóxido es una posible vía de desexcitación del potencial de reducción que se acumula en el aparato fotosintético.

## Literatura citada

- Ahumada-Fierro, N. V. 2017. Caracterización de aislados de *Chattonella* spp. de la Bahía de Todos Santos, y evaluación de su efecto sobre estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas*. Tesis de Licenciatura. UABC.
- Almazán-Becerril, A., García-Mendoza, E. 2008. Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: a nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas* 34, 29–43.
- Anderson B. , Barber, J. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. En Baker N. (ed). *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 101-121
- Armbruster, U., Carrillo, L. R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtman, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J. A., Kramer, D. M., Jonikas, M. C. 2014. Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. *Nature Communications*, 5, 1–8. doi:10.1038/ncomms6439
- Arredondo-Vega, B O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M., Gómez-Anduro, G. A. 2017. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR.
- Attaran-Fariman, G., Bolch, C. J. S. 2014. Morphology and genetic affinities of a novel *Chattonella* isolate (Raphidophyceae) isolated from Iran’s south coast (Oman sea). *Turkish Journal of Botany*, 38(1), 156–168. doi:10.3906/bot-1210-33
- Band-Schmidt, C. J., Martínez-López, A., Bustillos-Guzmán, J. J., Carreón-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N. O., Zenteno-Savín, T., Mendoza-Flores, A., González-Acosta, B., Hernández-Sandoval, F. H., Tomas, C. 2012. Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia*, 693(1), 81–97. doi:10.1007/s10750-012-1088-y
- Band-Schmidt, C J, Martínez-López, A., Gárate-Lizarraga, I. 2005. First record of *Chattonella marina* in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*, 28(May), 6–7.
- Band-Schmidt, Christine J., Morquecho, L., Hernández-Becerril, D. U., Reyes-Salinas, A., Bravo-Sierra, E. 2004. Raphidophyceans on the coasts of Mexico. *Hydrobiologia*, 515, 79–89. doi:10.1023/B:HYDR.0000027320.00977.8b
- Bartual, A., Lubián, L. M., Gálvez, J. A., Niell, F. X. 2002. Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wislouch) (Cryptophyceae) | Efecto de la irradiancia en el crecimiento, fotosíntesis, contenido pigmentario y consumo de nutri. *Ciencias Marinas*, 28(4), 381–392.

- Beer, S., Björk, M., Beardall, J. 2014. Photosynthesis in the marine environment (Vol. 1). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Berne, N., Fabryova, T., Istaz, B., Cardol, P., Bailleul, B. 2018. The peculiar NPQ regulation in the stramenopile *Phaeomonas* sp. challenges the xanthophyll cycle dogma. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(7), 491–500. doi:10.1016/j.bbabi.2018.03.013
- Blankenship, R. 2002. Molecular Mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science Ltd.
- Bowers, H. A., Tomas, C., Tengs, T., Kempton, J. W., Lewitus, A. J., Oldach, D. W. 2006. Raphidophyceae [chadefaud ex silva] systematics and rapid identification: Sequence analyses and real-time PCR assays. *Journal of Phycology*, 42(6), 1333–1348. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00285.x
- Bravo-Sierra, E. 2004. Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. *Revista de Biología Tropical*, 52(SUPPL. 1), 5–16.
- Büchel, C. 2019. Light harvesting complexes in chlorophyll c-containing algae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, (March), 148027. doi:10.1016/j.bbabi.2019.05.003
- Casper-Lindley, C., Björkman, O. 1998. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynthesis Research*, 56(3), 277–289. doi:10.1023/A:1006037516479
- Chandrasekaran, R., Barra, L., Carillo, S., Caruso, T., Corsaro, M. M., Dal Piaz, F., Graziani, G., Corato, F., Pepe, D., Manfredonia, A., Orefice, I., Ruban, A. V., Brunet, C. 2014. Light modulation of biomass and macromolecular composition of the diatom *Skeletonema marinoi*. *Journal of Biotechnology*, 192(Part A), 114–122. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.10.016
- Cho, K., Sakamoto, J., Noda, T., Nishiguchi, T., Ueno, M., Yamasaki, Y., Yagi, M., Kim, D., Oda, T. 2016. Comparative studies on the fish-killing activities of *Chattonella marina* isolated in 1985 and *Chattonella antiqua* isolated in 2010, and their possible toxic factors. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(4), 811–817. doi:10.1080/09168451.2015.1116929
- Colombo-Pallotta, M. F., García-Mendoza, E., Ladah, L. B. 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (laminariales, Phaeophyceae) *Phycological Society of America*. 42. 1225–1234. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00287.x
- Colombo-Pallotta, M. F. 2006. Fotosíntesis y fotoprotección en *Macrocystis pyrifera* en escala espacial y temporal. Tesis de Doctorado. CICESE

- Cortés–Altamirano, R., Sierra, A., Barraza-Guardado, R. 2006. Mortandad de peces debido a microalgas nocivas y tóxicas: Cinco casos de marea roja en la costa continental del Golfo de California (2003-2004). pp. 79-90. En S Salas, M.A. Cabrera, J. Ramos, D. Flores y J. Sánchez (eds). Memorias Primera Conferencia de Pesquerías Costeras en América Latina y el Caribe. Evaluando, Manejando y Balanceando Acciones. Mérida, Yucatán, México. Octubre 4-8, 2004.
- Demura, M. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Journal of Phycology*, 3(6), 518–535. doi:10.2216/08-98.1.Three
- Diaz, J. M., Plummer, S. 2018. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *Journal of Plankton Research*, 00, 1–12. doi:10.1093/plankt/fby039
- Diaz, M. R., Jacobson, J. W., Goodwin, K. D., Dunbar, S. A., Fell, J. W. 2010. Molecular detection of harmful algal blooms (HABs) using locked nucleic acids and bead array technology. *Limnology and Oceanography, Methods / ASLO*, 8(JUNE), 269–284. doi:10.4319/lom.2010.8.269
- Dorantes-Aranda, J. J., Nichols, P. D., David Waite, T., Hallegraeff, G. M. 2013. Strain variability in fatty acid composition of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) and its relation to differing ichthyotoxicity toward rainbow trout gill cells. *Journal of Phycology*, 49(2), 427–438. doi:10.1111/jpy.12053
- Dorantes-Aranda, J. J., Parra, L. M. G. de la, Alonso-Rodríguez, R., Morquecho, L. 2009. Hemolytic activity and fatty acids composition in the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Bahía de La Paz, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 58(9), 1401–1405. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.06.007
- Dubinsky, Z., Stambler, N. 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: Mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2–3), 163–176. doi:10.3354/ame01345
- Falkowski, P. G., LaRoche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*. 27, 8-14.
- Falkowski, P. G., Raven, J. A. 2007. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford, UK. 375 P
- Farber, A., Young, A. J., Ruban, A. V, Horton, P., Jahns, P. 1997. Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants (the relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching). *Plant Physiology*, 115(1 997), 1609–1618. doi:10.1104/PP.115.4.1609

- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- García-Mendoza, E., Cáceres-Martínez, J., Rivas, D., Fimbres-Martínez, M., Sánchez-Bravo, Y., Vásquez-Yeomans, R., Medina-Elizalde, J. 2018. Mass mortality of cultivated northern bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis* associated with *Chattonella marina* in Baja California, Mexico.
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A., Núñez-Vázquez, E. J. (eds.). 2016. *FloreCIMIENTOS ALGALES NOCIVOS EN MÉXICO*. Ensenada, México. CICESE. 438 p.
- García-Mendoza, E., Matthijs, H. C. P., Schubert, H., Mur, L. R. 2002. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions. *Photosynthesis Research*, 74(3), 303–315. doi:10.1023/A:1021230601077
- García-Mendoza, E., Ocampo-alvarez, H. 2011. Biology Photoprotection in the brown alga *Macrocystis pyrifera*: Evolutionary implications. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 104(1–2), 377–385. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.04.004
- Geider, R. J. y Osborne, B. A. 1992. *Algal Photosynthesis: The measurement of algal gas Exchange*. Chapman and Hall. Gran Bretaña. 256 pp.
- Godrant, A., Rose, A. L., Sarthou, G., Waite, T. D. 2009. New method for the determination of extracellular production of superoxide by marine phytoplankton using the chemiluminescence probes MCLA and red-CLA. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 682–692. doi:10.4319/lom.2009.7.682
- Goss, R., Lepetit, B. 2015. Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*, 172, 13–32. doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004
- Greene, R. M., Geider, R. J., Kolber, Z., Falkowski, P. G. 1992. Iron-Induced Changes in Light Harvesting and Photochemical Energy Conversion Processes in Eukaryotic Marine Algae. *Plant Physiology*, 100(2), 565–575. doi:10.1104/pp.100.2.565
- Guillard, R.R.L. Hargraves, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycology* 32: 234-236.
- Halac, S. 2008. Efecto de la radiacion ultravioleta sobre los mecanismos de fotoproteccion en una diatomea marina. Tesis de Maestría. CICESE
- Hallegraeff, G. M., Y. Hara, 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson y A. D. Cembella (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris: 365–371

- Hallegraeff, G., Dorantes-Aranda, J. J., Mardones, J., Seger, A. 2017. Review of Progress in our Understanding of Fish-Killing Microalgae: Implications for Management and Mitigation. *Marine and Fresh-Water Harmful Algae. Proceedings of the 17th International Conference on Harmful Algae*, (February), 148–153.
- Handy, S. M., Coyne, K. J., Portune, K. J., Demir, E., Doblin, M. A., Hare, C. E., Cary, S. C., Hutchins, D. A. 2005. Evaluating vertical migration behavior of harmful raphidophytes in the Delaware Inland Bays utilizing quantitative real-time PCR. *40(Whereat 2003)*, 121–132.
- Hanelt, D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Marine Biology* 131(2): 361-369
- He, Q., Yang, H., Wu, L., Hu, C. 2015. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219–228. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.021
- Hennige, S. J., Coyne, K. J., Macintyre, H., Liefer, J., Warner, M. E. 2013. The photobiology of *Heterosigma akashiwo*. Photoacclimation, diurnal periodicity, and its ability to rapidly Exploit exposure to high light. *Journal of Phycology*, 49(2), 349–360. doi:10.1111/jpy.12043
- Hodges, D. E.; Delong, J. E.; Forney, C. F.; Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and othes interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611.
- Horiguchi T. 2016. Raphidophyceae (Raphidophyta). en: Archibald J. et al. (eds) *Handbook of the Protists*. Springer, Cham
- Hosoi-Tanabe, S., Otake, I., Sako, Y. 2006. Phylogenetic analysis of noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, and *C. verruculosa* (Raphidophyceae) based on the rRNA gene family. *Fisheries Science*, 72, 1200–1208. doi:10.1111/j.1444-2906.2006.01277.x
- Imai, I., Yamaguchi, M. 2012. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae*, 14, 46–70. doi:10.1016/j.hal.2011.10.014
- Jassby A.D., Platt T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 21: 540-547.
- Jüttner, F. 2001. Liberation of 5 , 8 , 11 , 14 , 17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in acute grazer toxicity of freshwater diatom bio- films was determined using *Thamnocephalus platyurus* Packard *ournal of Phycology*, 37, 744–755.

- Jüttner, F. 2005. Evidence that polyunsaturated aldehydes of diatoms are repellents for pelagic crustacean grazers. *Aquatic Ecology*, 39(3), 271–282. doi:10.1007/s10452-005-3419-9
- Kamikawa, R., Masuda, I., Demura, M., Oyama, K., Yoshimatsu, S., Kawachi, M., Sako, Y. 2009. Mitochondrial Group II Introns in the Raphidophycean Flagellate *Chattonella* spp. Suggest a Diatom-to-Chattonella Lateral Group II Intron Transfer. *Protist*, 160(3), 364–375. doi:10.1016/j.protis.2009.02.003
- Kamikawa, R., Masuda, I., Oyama, K., Yoshimatsu, S., Sako, Y. 2007. Genetic variation in mitochondrial genes and intergenic spacer region in harmful algae *Chattonella* species. *Fisheries Science*, 73(4), 871–880. doi:10.1111/j.1444-2906.2007.01408
- Katano, T., Yoshida, M., Lee, J., Han, M.-S., Hayami, Y. 2009. Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. *Phycologia*, 48(6), 473–479. doi:10.2216/08-102.1.Chattonella
- Kepler, C. J., Lewitus, A. J., Ringwood, A. H., Hoguet, J., Staton, T. 2006. Sublethal cellular effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 312, 141–147. doi:10.3354/meps312141
- Kim, D., Nakamura, A., Okamoto, T., Komatsu, N., Oda, T., Iida, T., Ishimatsu, A., Muramatsu, T. 2000. Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: Possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1524(2–3), 220–227. doi:10.1016/S0304-4165(00)00161-6
- Kim, D., Nakashima, T., Matsuyama, Y., Niwano, Y., Yamaguchi, K., Oda, T. 2007. Presence of the distinct systems responsible for superoxide anion and hydrogen peroxide generation in red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *Journal of Plankton Research*, 29(3), 241–247. doi:10.1093/plankt/fbm011
- Kim, D., Oda, T. 2010. Possible Factors Responsible for the Fish-Killing Mechanisms of the Red Tide Phytoplankton, *Chattonella marina* and *Cochlodinium polykrikoides*. *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, Eds., A. Ishimatsu and H.-J. Lie, pp. 245–268
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kingston, M.B., 1999. Effect of light on vertical migration and photosynthesis of *Euglena proxima* (Euglenophyta). *Journal of Phycology*. 35, 245–253

- Klinbunga, S., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., Yoosukh, W. 2003. Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Marine Biotechnology*, 5(1), 27–36. doi:10.1007/s10126-002-0047-4
- Klöpffer, S., John, U., Zingone, A., Mangoni, O., Kooistra, W. H. C. F., Cembella, A. D. 2013. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? *European Journal of Phycology*, 48(1), 79–92. doi:10.1080/09670262.2013.771412
- Kok, J. W. K., Yeo, D. C. J., Leong, S. C. Y. 2019. Growth, pigment, and chromophoric dissolved organic matter responses of tropical *Chattonella subsalsa* (Raphidophyceae) to nitrogen enrichment. *Phycological Research*, 67(2), 134–144. doi:10.1111/pre.12360
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874
- Lalli, C., Parsons, T. 1997. *Biological oceanography: An introduction*. Elsevier, Amsterdam. 313 p
- Lavaud, J., Goss, R. 2014. The Peculiar Features of Non-Photochemical Fluorescence Quenching in Diatoms and Brown Algae. En: Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee (eds) *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration (Including Bioenergy and Related Processes)*, vol 40. Springer, Dordrecht.
- Leskinen, E., Alström-Rapaport, C., Pamilo, P. 2004. Phylogeographical structure, distribution and genetic variation of the green algae *Ulva intestinalis* and *U. compressa* (Chlorophyta) in the Baltic Sea area. *Molecular Ecology*, 13(8), 2257–2265. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02219.x
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Miller, P. 2006. Inter and intraespecific variation of the *Pseudonitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses1 *Journal of Phycology*,
- Mardones, J. I., Dorantes-Aranda, J. J., Nichols, P. D., Hallegraeff, G. M. 2015. Fish gill damage by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* from Chilean fjords: Synergistic action of ROS and PUFA. *Harmful Algae*, 49(October), 40–49. doi:10.1016/j.hal.2015.09.001
- Marshall, J.A., Hovenden, M., Oda, T., Hallegraeff, G. M. 2002a. Photosynthesis does influence superoxide production in the ichthyotoxic alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Journal of Plankton Research*, 24(11), 1231–1236. doi:10.1093/plankt/24.11.1231

- Marshall, J.A., Munday, B., Yoshizawa, Y., Hallegraeff, G.M., 2001. Effect of irradiance on superoxide production by *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australia and Japan. In Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms 2001. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 316–319
- Marshall, J. A., Newman, S. 2002b. Differences in photoprotective pigment production between Japanese and Australian strains of *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(1), 13–27. doi:10.1016/S0022-0981(02)00034-5
- Marshall, J. A., P. D. Nichols, G. M. Hallegraef. 2002c. Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae. *Journal of Applied Phycology*. 14: 255-256.
- Marshall, J. A, Hallegraeff, G. M. 1999. Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. *Journal of Plankton Research*, 21(10), 1809–1822.
- Marshall, J. A., Nichols, P. D., Hamilton, B., Lewis, R. J., Hallegraeff, G. M. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): The synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, 2(4), 273–281. doi:10.1016/S1568-9883(03)00046-5
- Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. doi:10.1093/jxb/51.345.659
- McIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., Geiner, R. J. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 38(3), 17–38. doi:10.1007/s00203-014-1073-0
- Mendoza-Flores, A. 2011. Identificación de cepas del género *Chattonella* (clase Raphidophyceae) aisladas del Golfo de California a partir de la región 5.8S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y del gen Citocromo C Oxidasa Subunidad 1 (COI). 1. Tesis de licenciatura UABCS
- Morris, K. 1986. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. American Elsevier Pub. 345 pp
- Mostaert, A. S., Karsten, U., Hara, Y., Watanabe, M. M. 1998. Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: A chemotaxonomic re-evaluation. *Phycological Research*, 46(4), 213–220. doi:10.1046/j.1440-1835.1998.00138.x
- Muller P, L. Ping, Niyogi, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125: 1558– 1566.

- Murillo-Martínez, R. 2015. Efecto de la intensidad de la luz sobre los mecanismos de disipación no fotoquímica y producción de toxinas paralizantes en cepas de *Gymnodinium catenatum*. Tesis de maestría CICESE.
- Nafisyah, A. L., Dewi, E., Kazumi, M., Mirni, M. 2018. Cryptic occurrence of *Chattonella marina* var. *marina* in mangrove sediments in Probolinggo, East Java Province, Indonesia. Fisheries Science, 1985(Khoo 1985). doi:10.1007/s12562-018-1219-0
- Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., Jahns, P. 2010. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1797(4), 466–475. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.001
- Niyogi, K. K. 1999. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50(1), 333–359. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.333
- Ocampo-Álvarez, H., García-Mendoza, E., Govindjee. 2012. Antagonist effect between violaxanthin and de-epoxidated pigments in nonphotochemical quenching induction in the qE deficient brown alga *Macrocystis pyrifera*. Biochimica et Biophysica Acta 1827 427–437
- Oda, T., Akaike, T., Sato, K., Ishimatsu, A., Takeshita, S., Muramatsu, T., Maeda, H. 1992. Hydroxyl radical generation by red tide algae. Archives of Biochemistry and Biophysics, 294(1), 38–43. doi:10.1016/0003-9861(92)90133-H
- Oda, T., Nakamura, A., Okamoto, T., Ishimatsu, A., Muramatsu, T. 1998. Lectin-induced enhancement of superoxide ion production by red tide phytoplankton. Marine Biology, 131(2), 383–390. doi:10.1007/s002270050331
- Okaichi, T., 1983. Marine environmental studies on outbreaks of red tides in neritic waters. Journal of Oceanographic Society of Japan. 39, 267–278.
- Olaizola M., La Roche J., Kolber Z., Falkowski P. 1994. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. Photosynthesis Research. 41: 357-370.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D., Montresor, M. 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. Marine Ecology Progress Series, 271(May), 87–98. doi:10.3354/meps271087
- Pérez-Morales, A., Band-Schmidt, C. J., Ortíz-Galindo, J. L., Sobrino-Figueroa, A. S. 2014. Mortality in the initial ontogeny of *Paralabrax maculatofasciatus* (Actinopterygii, Perciformes, Serranidae) caused by *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). Hydrobiologia, 722(1), 247–261. doi:10.1007/s10750-013-1707-2

- Perrine, Z., Negi, S., Sayre, R. T. 2012. Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. *Algal Research*, 1(2), 134–142. doi:10.1016/j.algal.2012.07.002
- Pohnert, G., Lumineau, O., Cueff, A., Adolph, S., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S. 2002. Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods? *Marine Ecology Progress Series*, 245(December 2002), 33–45. doi:10.3354/meps245033
- Qiu, X., Mukai, Koki, Shimasaki, Y., Tsumaya, M. 2017. Variations in the Expression of Photosynthesis – Related Proteins in Field *Chattonella marina* Cells During a Harmful Algal Bloom. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 62(2), 373–380.
- Ragni, M., Airs, R. L., Leonardos, N., Geider, R. J. 2008. Photoinhibition of PSII in *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) under high light stress: The roles of photoacclimation, photoprotection, and photorepair. *Journal of Phycology*, 44(3), 670–683. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00524.x
- Rijstenbil. 2002. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *Journal of Plankton Research*, 24(12), 1277–1288. doi:10.1093/plankt/24.12.1277
- Romero-Romero, C.C. 2015. Efecto de la absorción y de la composición espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición proximal de *Amphora* sp. y su influencia en la preservación en frío y en la criopreservación. Tesis Maestría en Ciencias. CICESE.
- Saragosti, E., Tchernov, D., Katsir, A., Shaked, Y. 2010. Extracellular production and degradation of superoxide in the coral *Stylophora pistillata* and cultured *Symbiodinium*. *PLoS One*, 5 (9), e12508
- Sargent, J., Tocher, D., Bell, G. 2002. The Lipids. In: Halver J., Hardy, R, (ed). *Fish Nutrition*. Academic Press, U.S.A. 181-257pp
- Singh, S. P., Singh, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444. doi:10.1016/j.rser.2015.05.024
- Smerilli, A., Orefice, I., Corato, F., Gavalís Olea, A., Ruban, A. V., Brunet, C. 2017. Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. *Environmental Microbiology*, 19(2), 611–627. doi:10.1111/1462-2920.13545
- Stacca, D., Satta, C. T., Casabianca, S., Penna, A., Padedda, B. M., Sechi, N., Lugliè, A. 2016. Identification of *Chattonella* (Raphidophyceae) species in long-term phytoplankton samples from Santa Giusta Lagoon, Italy. *Scientia Marina*, 80(1), 17–25. doi:10.3989/scimar.04292.09A

- Stamenković, M., Bischof, K., Hanelt, D. 2014. Xanthophyll cycle pool size and composition in several cosmopolitan strains (Zygnematophyceae, Streptophyta) are related to their geographic distribution patterns. *Protist*, 165(1), 14–30. doi:10.1016/j.protis.2013.10.002
- Subrahmanyam, R. 1954. On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov. (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms of the Malabar Coast. *Indian Journal of Fisheries* 1: 182-203.
- Tilney, C. L., Hoadley, K. D., Warner, M. E. 2015. Comparing the diel vertical migration of *Karlodinium veneficum* (dinophyceae) and *Chattonella subsalsa* (Raphidophyceae): PSII photochemistry, circadian control, and carbon assimilation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 143, 107–119. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.12.023
- Ting, C. S., Owens, T. G. 1994. The effects of excess irradiance on photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, 106(2), 763–770. doi:10.1104/pp.106.2.763
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184
- Van den Hoek, C., D. G. Mann, H. M. Janhs, 1995. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Stuttgart, 623 pp. Van Kooten O. y Snel J.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*. 25: 147-150.
- Van Heukelem, L., Thomas, C.S. 2000. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*, 910, 31-49.
- Van Kooten O., Snel J.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*. 25: 147-150.
- Van Leeuwe, M.A., van Sikkelerus, B., Gieskes, W.W.C., Stefels, J., 2005. Taxon-specific differences in photoacclimation to fluctuating irradiance in an Antarctic diatom and a green flagellate. *Marine Ecology Progress Series*. 288, 9–19.
- Vizcaíno-Ochoa, V., Lazo, J.P., Barón-Sevilla, B., Drawbridge, M.A. 2010. The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture*, 302: 228-234.
- Warner, M. E., Madden, M. L. 2007. The impact of shifts to elevated irradiance on the growth and photochemical activity of the harmful algae *Chattonella subsalsa* and *Prorocentrum minimum* from Delaware. *Harmful Algae*, 6(3), 332–342. doi:10.1016/j.hal.2006.04.007

- Yamaguchi, H., Mizushima, K., Sakamoto, S., Yamaguchi, M. 2010. Effects of temperature, salinity and irradiance on growth of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 9(4), 398–401. doi:10.1016/j.hal.2010.02.001
- Yamaguchi, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, M. 2008. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 7(1), 26–32. doi:10.1016/j.hal.2007.05.011
- Zhang, Y., Fu, F. X., Whereat, E., Coyne, K. J., Hutchins, D. A. 2006. Bottom-up controls on a mixed-species HAB assemblage: A comparison of sympatric *Chattonella subsalsa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland Bays, USA. *Harmful Algae*, 5(3), 310–320. doi:10.1016/j.hal.2005.09.001
- Zoller, S., Lutzoni, F. 2003. Slow algae, fast fungi: Exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi Omphalina and their symbiotic green algae Coccomyxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 629–640. doi:10.1016/S1055-7903(03)00215-X