

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ECOLOGÍA MARINA**

---

**Efecto de la intensidad de la luz sobre los mecanismos de  
disipación no fotoquímica y producción de toxinas paralizantes  
en cepas de *Gymnodinium catenatum***

Presenta:  
**Ramón Murillo Martínez**

Ensenada, Baja California, México

2015

Tesis defendida por  
**Ramón Murillo Martínez**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
Director del Comité

---

Dra. Graciela Guerra Rivas  
Miembro del Comité

---

Dr. Helmut Maske Rubach  
Miembro del Comité

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Miembro del Comité

---

Dr. David Alberto Rivas Camargo  
Coordinador del programa de posgrado en  
Ecología Marina

---

Dr. Jesús Favela Vara  
Director de Estudios de Posgrado

Mayo, 2015

Resumen de la tesis de Ramón Murillo Martínez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

**Efecto de la intensidad de la luz sobre los mecanismos de disipación no fotoquímica y producción de toxinas paralizantes en cepas de *Gymnodinium catenatum*.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
Director de Tesis

La disipación no fotoquímica de energía del fotosistema II (NPQ; por sus siglas en inglés) es uno de los principales mecanismos de fotoprotección de los organismos fotosintéticos cuando la absorción de la luz excede su capacidad de utilización. En los dinoflagelados se conoce poco sobre los mecanismos involucrados en el control del NPQ y no se ha evaluado el papel del ciclo de las xantofilas (CX) en la inducción de este mecanismo de fotoprotección. El CX involucra la conversión del pigmento diadinoxantina (Ddx) a diatoxantina (Dtx) en condiciones de estrés lumínico. La aparición de Dtx es necesaria para la inducción de NPQ en otros organismos fitoplanctónicos como diatomeas, pero no se conoce si estos dos procesos están relacionados en dinoflagelados. Este grupo, además de su importancia ecológica, presenta varias especies que pueden afectar a otros organismos por la formación de florecimientos algales nocivos (FAN) o la producción de toxinas marinas. *Gymnodinium catenatum* es el principal productor de toxinas paralizantes (PST) en el Golfo de California, México, y su presencia en los últimos años ha sido reportada a lo largo de todo el Pacífico mexicano. No se conocen las condiciones específicas que promueven los FAN y la producción de toxinas en este organismo. El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de la irradiancia sobre los mecanismos de fotoprotección, crecimiento y producción de PST en cepas de *G. catenatum* aisladas del Golfo de California. Las células fueron aclimatadas a dos diferentes intensidades de luz: Baja Luz (BL,  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y Alta Luz (AL,  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Se comparó el crecimiento poblacional entre estas dos condiciones de cultivo y se evaluó la producción de PST, inducción y disipación de NPQ así como la interconversión de los pigmentos del CX durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria de cada condición de cultivo. La tasa de crecimiento máxima en AL fue de  $0.28 \text{ día}^{-1}$  y se alcanzaron abundancias celulares de  $5,902 \text{ cél mL}^{-1}$ . La tasa de crecimiento fue 50 % menor y la abundancia celular fue 45 % más baja en los cultivos de BL. Las células de *G. catenatum* presentaron una concentración y perfil de PST similar en los dos tratamientos de luz y fases de crecimiento. Los valores máximos de NPQ a los 30 min de exposición a luz saturante fueron diferentes entre tratamientos y fases de crecimiento, presentándose un NPQ mayor en células aclimatadas a BL durante la fase estacionaria. La concentración celular de pigmentos fue diferente entre los tratamientos de luz. Las células aclimatadas a BL presentaron una concentración de clorofila *a* y peridina mayor (15 %) con relación a las de AL, mientras que en estas últimas la concentración de Ddx y Dtx (pigmentos fotoprotectores) fue 18 % más alta. Por lo tanto las células aclimatadas a AL presentaron una capacidad de fotoprotección mayor. Se detectó una dependencia alta ( $r^2$  entre 0.67 y 0.89) de la formación del NPQ sobre la interconversión de los pigmentos del CX durante la exposición a luz saturante en los dos tratamientos de luz y fases de crecimiento. NPQ en oscuridad estuvo asociada ( $r^2 = 0.93$  y  $0.99$ ) a la disminución del Dtx en las células aclimatadas a AL. Sin embargo, esta relación no es igual en las células aclimatadas a BL. Estos resultados demuestran que la recuperación lenta en los

tratamientos de BL en oscuridad está relacionada con los procesos de daño y reparación del FSII que afectan la emisión de fluorescencia. Por lo tanto, se demuestra en el presente trabajo que el NPQ en *G. catenatum* depende mayormente de la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, sin embargo, existe otro mecanismo que afecta asimismo la emisión del FSII que es independiente de este proceso.

Palabras clave: **disipación térmica, ciclo de las xantofilas, toxinas paralizantes, *Gymnodinium catenatum*.**

Abstract of the thesis presented by Ramón Murillo Martínez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

**Effect of light intensity on the non photochemical quenching mechanisms and production of paralytic shellfish toxins in strains of *Gymnodinium catenatum*.**

Abstract approved by:

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
Director de Tesis

The nonphotochemical quenching of photosystem II (PSII) fluorescence (NPQ) is one of the most important photoprotection mechanisms of photosynthetic organisms when light absorption exceeds the capacity for light utilization. In dinoflagellates little is known about the mechanisms involved in the control of NPQ and the role of xanthophyll cycle (XC) on the induction of this photoprotection mechanism has not been evaluated. The XC involves the conversion of the pigment diadinoxanthin (Ddx) into diatoxanthin (Dtx) under light stress. The Dtx appearance is required for induction of NPQ in other phytoplankton organisms such as diatoms, but it is not known if these two processes are related in dinoflagellates. This group, in addition to their ecological importance, has several species that can affect other organisms due to the formation of harmful algal blooms (HAB) or by the production of phycotoxins. *Gymnodinium catenatum* is the main species responsible for the presence of paralytic shellfish toxins (PST) in the Gulf of California, Mexico, and its distribution comprises all the Mexican Pacific coast. The specific conditions that promote HABs and induce the production of toxins in this species are not known. The goal of this study was to characterize the effect of the irradiance on photoprotection mechanisms, growth and production of PST in a strain of *G. catenatum* isolated from the Gulf of California. Cells were acclimated to two different light intensities: Low Light (LL, 120 mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and High Light (HL, 350 mol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). The population growth were compared between these two culture conditions. The PST production, induction and dissipation of NPQ and the interconversion of the XC pigments were evaluated at the exponential and stationary phase of growth at each culture condition. Maximum growth rate in HL was 0.28 day<sup>-1</sup> and maximum cell abundance was of 5,902 cells mL<sup>-1</sup> in HL cultures. A 50 % lower growth rate and a 45 % lower cell abundance was measured in LL cultures. The PST profile of *G. catenatum* cells and the concentration of these toxins were similar in both light treatments (LL and HL) and growth phases. Maximum NPQ after 30 minutes of exposure to saturation light conditions were different between treatments and growth phases. The highest NPQ was detected in cells acclimated to LL and during the stationary phase of growth. The cellular pigment concentration was different between light treatments. The cells acclimated to LL presented a higher chlorophyll *a* and peridinin concentration (15 %) than HL cells. In contrast, Ddx and Dtx (photoprotective pigments) concentration was 18 % higher in HL acclimated cells. Therefore, cells acclimated to HL had a greater photoprotection capacity. NPQ formation was dependent ( $r^2$  between 0.67 and 0.89) on XC pigments interconversion during exposure to saturation light in the two light treatments and growth phases. NPQ dissipation in darkness was related ( $r^2 = 0.93$  and  $0.99$ ) to the disappearance of Dtx in cells acclimated to HL. However, this relationship was not similar in cells acclimated to LL. These results demonstrate that the slow recovery of NPQ in darkness for the LL acclimated cells was probably due to accumulation of PSII damage and its repair that affected the fluorescence emission. Therefore, it is demonstrated in the present work that NPQ in *G.*

*catenatum* depends mainly on the interconversion of the xanthophyll cycle pigments; however, there is another mechanism that affects also the emission of PSII.

Key words: **thermal dissipation, xanthophyll cycle, paralytic shellfish toxins, *Gymnodinium catenatum***

*A mis padres Ramón y Teresa  
por brindarme siempre su apoyo  
y por ser el mejor ejemplo a seguir.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante el curso de mi posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por brindarme la oportunidad de contribuir con mi formación académica y la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Ernesto García Mendoza que bajo su dirección he podido realizar este trabajo, así como a la Dr. Graciela Guerra Rivas, al Dr. Helmut Maske Rubach y la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por el apoyo brindado en cada uno de sus laboratorios y sus comentarios en este trabajo de investigación.

Al Dr. José Jesús Bustillos Guzmán y sus técnicos del CIBNOR por el apoyo en el análisis de toxinas marinas.

A todos los técnicos y estudiantes de los laboratorios Ficotox y Biología Algal por el apoyo otorgado en el análisis y realización de mis experimentos.

A Michelle por compartir y disfrutar esta etapa de nuestras vidas.

A mis amigos y compañeros de maestría Alberto, Rigoberto y Uriel que nos supimos apoyar y divertir durante todo el posgrado.

# Contenido

	Página
<b>Resumen en español</b> .....	ii
<b>Resumen en inglés</b> .....	iv
<b>Dedicatoria</b> .....	vi
<b>Agradecimientos</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	x
<b>Lista de tablas</b> .....	xii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xiii
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Antecedentes .....	6
<b>2. Justificación</b> .....	9
<b>3. Hipótesis</b> .....	10
<b>4. Objetivo general</b> .....	11
4.1 Objetivos específicos .....	11
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	12
5.1 Cultivo de <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	12
5.2 Tasa de crecimiento .....	12
5.3 Mediciones de fluorescencia .....	13

## Contenido (continuación)

5.4	Análisis de pigmentos en <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	14
5.5	Identificación y cuantificación de pigmentos por cromatografía (HPLC) ..	14
5.6	Análisis de toxinas de tipo paralizante (PST) en <i>Gymnodinium catenatum</i>	15
5.7	Identificación y cuantificación de toxinas por cromatografía (HPLC) .....	16
5.8	Análisis estadístico .....	16
<b>6.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>17</b>
6.1	Abundancia celular y tasa de crecimiento de <i>Gymnodinium catenatum</i> cultivados en dos irradiancias .....	17
6.2	Inducción y disipación de NPQ en <i>G. catenatum</i> .....	17
6.3	Concentración de pigmentos en <i>G. catenatum</i> .....	22
6.4	Interconversión de los pigmentos implicados en el Ciclo de las Xantofilas (CX) .....	26
6.5	Relación NPQ y CX .....	31
6.6	Inducción de NPQ en presencia de un inhibidor del CX .....	33
6.7	Concentración de toxinas paralizantes (PST) en <i>G. catenatum</i> .....	34
<b>7.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>37</b>
7.1	Abundancia celular y tasa de crecimiento de <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	37
7.2	Inducción y disipación de NPQ, concentración de pigmentos e interconversión de pigmentos del CX en <i>G. catenatum</i> .....	41
7.3	Concentración de toxinas paralizantes (PST) en <i>G. catenatum</i> .....	46
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>51</b>
	<b>Lista de referencias</b> .....	<b>53</b>

## Lista de figuras

	Página
1. Estructura química de las toxinas paralizantes y toxicidad relativa de cada análogo respecto a la saxitoxina .....	5
2. Crecimiento poblacional de <i>Gymnodinium catenatum</i> cultivado a 120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (BL), y expuesto a 350 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AL) .....	18
3. Inducción y disipación de NPQ en <i>Gymnodinium catenatum</i> aclimatado a 120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (BL) y 350 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AL) durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	19
4. Cambio en la eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) en células de <i>Gymnodinium catenatum</i> aclimatadas a 120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (BL) y 350 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AL) durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	21
5. Concentración de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento ..	23
6. Concentración de clorofila <i>c</i> (Chl <i>c</i> ), perdinina (Per) y dinoxantina (Dnx) en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	25
7. Concentración de diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	26
8. Concentración de diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	28
9. Conjunto de pigmentos del CX ( $\Sigma\text{CX}$ ) en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento.....	29
10. Cambios del grado de desepoxidación (DPS) de pigmentos del CX en <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento .....	30
11. Relación entre NPQ y la concentración de diatoxantina (Dtx) en cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i> aclimatados a Baja Luz y Alta Luz durante la fase	

## Lista de figuras (continuación)

exponencial y estacionaria de crecimiento, durante el periodo de exposición a la luz actínica y en oscuridad .....	32
12. Inducción y disipación de NPQ en <i>Gymnodinium catenatum</i> aclimatadas a Alta Luz (células expuestas a $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante la fase estacionaria de crecimiento y células tratadas con DTT .....	34

## Lista de tablas

	Página
1. Tasa de crecimiento máxima poblacional ( $\mu$ ) y abundancia celular máxima de <i>Gymnodinium catenatum</i> cultivado a 120 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Baja Luz, BL) y a 350 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Alta Luz, AL) .....	18
2. Valores de NPQ a los 30 min de exposición a la luz saturante (800 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en células aclimatadas a dos condiciones de luz y en distintas fases de crecimiento poblacional .....	20
3. Concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas en <i>Gymnodinium catenatum</i> a los 30 min de exposición a la luz saturante en los distintos tratamientos de luz .....	30
4. Toxicidad (pg STXeq $\text{cél}^{-1}$ ) de <i>Gymnodinium catenatum</i> cultivado en dos condiciones de luz .....	35
5. Concentración de PST (pg $\text{cél}^{-1}$ ) en células de <i>Gymnodinium catenatum</i> durante distintos tratamientos de luz .....	36
6. Perfil de PST en células de <i>Gymnodinium catenatum</i> durante distintos tratamientos de luz .....	36
7. Tasas de crecimiento, biomasa máxima de cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i> aisladas de diferentes partes del mundo. Se presentan las condiciones de cultivo y origen de las cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i> . Modificado de Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2014 .....	40
8. Perfil de toxinas paralizantes y toxicidad por célula (pg STXeq $\text{cél}^{-1}$ ) en cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i> aisladas de diferentes regiones del Golfo de California .	49

## Lista de abreviaturas

AL = tratamiento de Alta Luz, cultivos aclimatados a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$

BL = tratamiento de Baja Luz, cultivos aclimatados a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Chl *a* = clorofila *a*

Chl *c* = clorofila *c*

CX = ciclo de las xantofilas

$\Sigma\text{CX}$  = sumatoria de los pigmentos del CX, calculado como  $[\text{Ddx}] + [\text{Dtx}]$

DPS = grado de desepoxidación de los pigmentos del CX, calculado como  $[\text{Dtx} / (\text{Ddx} + \text{Dtx})]$

Ddx = diadinoxantina

Dnx = dinoxantina

Dtx = diatoxantina

DTT = ditiotreitól, inhibidor de la enzima desepoxidasa

FAN = florecimientos algales nocivos

$F_0$  = fluorescencia mínima o basal de la clorofila *a* en células adaptadas a oscuridad

$F_m$  = fluorescencia máxima de la clorofila *a* en células adaptadas a oscuridad

$F_m'$  = fluorescencia máxima en células expuestas a luz

FSI = fotosistema I

FSII = fotosistema II

$F_v/F_m$  = eficiencia cuántica máxima del FSII de células durante el periodo de oscuridad

NPQ = disipación no fotoquímica de energía del FSII

Per = peridina

PST = toxinas de tipo paralizante

SXT = saxitoxina

# 1. Introducción

La luz es un recurso que presenta una variabilidad significativa tanto temporal como espacialmente (Kirk, 1992). Los procesos de mezcla y migración vertical en la columna de agua ocasionan que los organismos fotosintéticos experimenten variaciones en la irradiancia que reciben en lapsos de tiempo impredecibles, lo que puede ser un factor de estrés para su metabolismo (Falkowski y La Roche, 1991). Las algas han desarrollado la capacidad de ajustar su maquinaria fotosintética en respuesta a las variaciones de luz (Blankenship, 2002) y particularmente, las diatomeas es el grupo fitoplanctónico con mayor habilidad para adaptarse a fluctuaciones en la irradiancia (Wagner *et al.*, 2006). Las diatomeas pueden desarrollarse en ambientes costeros, oceánicos o estuarinos, en donde ocurren fluctuaciones frecuentes en la intensidad de la luz, temperatura, concentración de nutrientes, entre otros. Por ello, estos organismos han desarrollado estrategias para controlar la fotosíntesis eficientemente en ambientes de luz variable (Kashino *et al.*, 2002), una de las más importantes es su capacidad elevada de disipación del exceso de energía por medio del ciclo de las xantofilas (CX) (Lavaud *et al.*, 2004). Las diatomeas presentan una capacidad alta de fotoprotección, y cuando son expuestas a luz saturante, presentan una reducción mínima en su eficiencia fotosintética (Lavaud *et al.*, 2007). Asimismo, la concentración de pigmentos del CX que se reportan en algunas especies de este grupo es mucho más alto que en plantas superiores, al igual que los valores de disipación térmica del exceso de energía (Lavaud *et al.*, 2003). Las diatomeas pueden expresar mecanismos rápidos de regulación de la actividad fotosintética, como es el caso de la activación de la enzima diadinoxantina desepoxidasa, que es un mecanismo importante para producir un cambio rápido de función de las antenas colectoras de luz a disipadoras de energía en ambientes de luz variable (Lavaud y Kroth, 2006). En contraste, en el grupo de los dinoflagelados no se ha descrito o se conoce poco sobre la importancia del CX en la disipación térmica del exceso de energía del aparato fotosintético (Warner y Berry-Lowe, 2006). Asimismo, no se ha caracterizado la relación de estos procesos en dinoflagelados planctónicos. Se ha reportado en dinoflagelados simbiotes de coral que la actividad del CX se asocia con el decaimiento en la actividad fotosintética durante el día (Warner y Berry-Lowe, 2006) y en dinoflagelados simbiotes de anémonas existe una relación directa entre la actividad de este ciclo y la disipación de energía (Lombardo-Cifuentes, 2011).

La fotoaclimatación consiste en el ajuste de la función y composición del aparato fotosintético a determinadas condiciones lumínicas, que involucra la síntesis y la degradación selectiva de pigmentos, proteínas de la cadena de transferencia de electrones (LHCSR, PsbS, entre otras) y enzimas del Ciclo de Calvin (RuBisCO) (Geider *et al.*, 1996). Cuando los niveles de luz son altos, ocurre un desbalance entre el número de fotones absorbidos y su utilización para la fotosíntesis, lo que puede causar la fotoinhibición (Ting y Owen, 1994). La fotoinhibición es el daño fotooxidativo que ocurre en el aparato fotosintético, específicamente en el centro de reacción del fotosistema II (FSII) acompañado de una reducción en la tasa de fotosíntesis (Andersson y Barber, 1996). El daño fotooxidativo, es el resultado de la acumulación de energía de excitación que no puede ser canalizada eficientemente hacia la ruta fotoquímica o la producción de calor, con el potencial de generar especies tóxicas de oxígeno (Balaguer *et al.*, 2002).

Los organismos fotosintéticos presentan varios mecanismos de fotoprotección que actúan a distintos niveles en el proceso de transferencia de energía a través de la maquinaria fotosintética. Uno de los principales mecanismos de fotoprotección es la disipación térmica del exceso de energía del aparato fotosintético (Demming-Adams y Adams, 1992). Este proceso se monitorea mediante la señal de fluorescencia emitida por la clorofila *a* del FSII. La reducción de la emisión del FSII independiente de la fotoquímica durante condiciones de luz saturante se utiliza para medir la disipación térmica en este sistema, denominada NPQ (non photochemical quenching, por sus siglas en inglés) (Muller *et al.*, 2001). Mediante el monitoreo de la fluorescencia del FSII es posible realizar mediciones fisiológicas de una manera no invasiva para estimar la disipación térmica y eficiencia cuántica de la actividad fotoquímica de este sistema (Krause y Weis, 1991). La emisión máxima de fluorescencia del FSII se presenta cuando la disipación de energía es mínima o se encuentra inactiva y disminuye en función de la activación de los mecanismos involucrados en el NPQ.

Uno de los procesos más importantes durante la disipación térmica es la activación del CX en condiciones de alta luz, que 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) en el grupo de las algas verdes y plantas superiores o de diadinoxantina (Ddx) a diatoxantina (Dtx) en varios grupos de las cromofitas. Los pigmentos desepoxidados (Zx y Dtx) actúan como

pigmentos fotoprotectores, absorbiendo parte del exceso de energía y la disipan en forma de calor, protegiendo al FSII del daño oxidativo (Niyogi, 1999). En la mayoría de los organismos fotosintéticos eucariontes, la disipación de energía en forma de calor está asociada a la síntesis de pigmentos del CX. Este mecanismo puede llegar a disipar hasta el 75% de los fotones absorbidos y debido a su reversibilidad ofrece una respuesta rápida a las condiciones cambiantes del medio (Niyogi, 1999).

Se ha caracterizado una asociación entre el CX y el NPQ, lo que indica que este ciclo es importante para la disipación térmica en el FSII en varios grupos de organismos fotosintéticos (Olaizola *et al.*, 1994). Sin embargo, existe poca información sobre los mecanismos involucrados en el NPQ de dinoflagelados. Este grupo tiene un papel ecológico importante y varias especies pueden producir toxinas que pueden afectar a otros organismos o impactar a la salud pública al formar florecimientos algales nocivos (FAN). Los FAN son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de mecanismos físicos, químicos y biológicos. Este término ha sido acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) (COI, 1992), para designar a la acumulación de un grupo heterogéneo de microorganismos que pueden ser dañinos para el hombre por sus efectos adversos a la salud humana. Asimismo, afectan las actividades acuícolas, turísticas y de recreación y pueden afectar a poblaciones de organismos marinos de zonas costeras. El término se aplica a cualquier población microalgal, incluso aunque las concentraciones celulares no sean muy elevadas, siempre y cuando su aparición conlleve un efecto nocivo (Reguera, 2002).

No se conocen los factores ambientales que promueven la formación, mantenimiento y decaimiento de florecimientos de la mayoría de las especies tóxicas, asimismo las condiciones específicas que inducen a la producción de toxinas son poco comprendidas (Granéli y Flynn, 2006). Las toxinas marinas de origen algal se denominan ficotoxinas y son producidas por especies de microalgas de distintos grupos filogenéticos como cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados. De las aproximadamente 5,000 especies de fitoplancton registradas en los océanos, se conoce que solamente alrededor de 300 son formadoras de florecimientos algales (Hallegraeff, 1993) y 60 especies, principalmente dinoflagelados, se han asociado a la producción

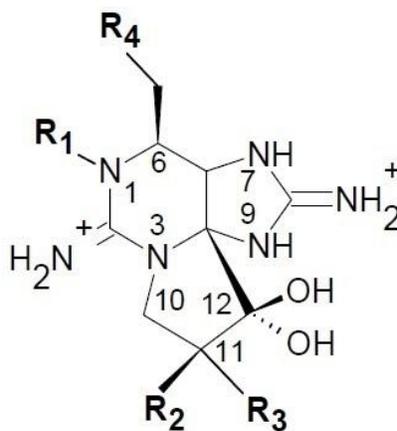
de compuestos bioactivos hidrofílicos o liposolubles que pueden presentar efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos (Zaccaroni y Scaravelli, 2008).

Existen diferentes tipos de toxinas producidas por microalgas. Las ficotoxinas de tipo paralizante (PST, por sus siglas en inglés “Paralytic Shellfish Toxins”) provocan la intoxicación paralizante por consumo de moluscos (PSP, “Paralytic Shellfish Poisoning”). El ácido domoico (AD) es el responsable de la intoxicación amnésica por el consumo de moluscos (ASP, “Amnesic Shellfish Poisoning”). El ácido okadaico y las dinofisistoxinas causan la intoxicación diarreica por consumo de moluscos (DSP, “Diarrhetic Shellfish Poisoning”) y las brevetoxinas provocan la intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos (NSP, “Neurotoxic Shellfish Poisoning”). Los vectores principales de estas toxinas hacia los humanos son los moluscos bivalvos. Asimismo existen las ciguatoxinas (CTX) que se acumulan en peces que al ser consumidos por humanos producen la enfermedad conocida como ciguatera (CFP, “Ciguatera Fish Poisoning”) (Holmes, 1992). Estas toxinas afectan principalmente el sistema nervioso periférico, alterando el transporte de iones en las membranas excitables y actúan como inhibidores metabólicos (Hall, 1991).

Las PST se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas costeras de todo el mundo y son producidas principalmente por especies de los géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium* (Hallegraeff, 1993). Las PST son potentes neurotoxinas solubles en agua que bloquean los canales de sodio dañando el funcionamiento celular y por lo tanto, inhibiendo las señales eléctricas que mantienen la actividad nerviosa y la comunicación sináptica (Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006). La saxitoxina (STX) es la principal toxina paralizante y es absorbida rápidamente a través de la mucosa oral y gastrointestinal. La severidad de los síntomas y la progresión de la intoxicación dependen de la dosis, susceptibilidad del individuo y del grado de eliminación de la toxina (Stafford y Hines, 1995). Las PST están constituidas por un núcleo tetrahidropurínico y presentan un anillo fusionado en posición angular. Se han identificado más de 20 tipos de PST, todas ellas análogas a la STX al existir sustituciones por diferentes radicales en la estructura principal de estas toxinas (Fig. 1). Estructuralmente y en función de los radicales que presenta cada análogo se han establecido 4 grupos de toxinas: carbamato (STX, neoSTX, y gonyautoxinas (GTX 1-4)), N-sulfocarbamato (B 1-2 y C 1-4), decarbamato (dcSTX, dcneoSTX, dcGTX 1-4) y deoxidecarbamato (doSTX, doGTX 2-3) (Shimizu, 2000). Los análogos tienen

toxicidad diferente, la cual está relacionada con el grado de afinidad con el sitio de unión en los canales de sodio donde la STX y neoSTX son las especies que presentan mayor grado de toxicidad (Fig. 1).

*Gymnodinium catenatum* es un dinoflagelado atecado (desnudo) que produce PST y se la ha asociado a intoxicaciones humanas registradas en la bahía de Mazatlán (Mee *et al.*, 1986). La presencia de esta especie en México se ha incrementado durante los últimos años en distintas regiones costeras del Pacífico mexicano, principalmente en el Golfo de California (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2011). Sin embargo, no se conoce cuáles son los factores que influyen sobre el crecimiento y producción de PST al igual que las respuestas de fotoprotección que puede expresar este dinoflagelado. Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca en caracterizar el efecto de la luz sobre el crecimiento, mecanismos de fotoprotección y producción de PST en cepas de *G. catenatum* aisladas del Golfo de California, México.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Carbamato		Decarbamato		N-sulfocarbamato	
			R <sub>4</sub> : OCO-NH <sub>2</sub>	Toxicidad Relativa	R <sub>4</sub> : OH	Toxicidad Relativa	R <sub>4</sub> : OCONH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Toxicidad Relativa
H	H	H	STX	1	dcSTX	0.51	B 1	0.06
OH	H	H	Neo	0.92	dcNeo	0.40	B 2	0.0
OH	OSO <sup>-3</sup>	H	GTX 1	0.99	dcGTX 2	0.65	C 1	0.01
H	OSO <sup>-3</sup>	H	GTX 2	0.36	dcGTX 3	0.75	C 2	0.10
H	H	OSO <sup>-3</sup>	GTX 3	0.64			C 3	0.01
OH	H	OSO <sup>-3</sup>	GTX 4	0.73			C 4	0.06

Figura 1. Estructura química de las toxinas paralizantes y toxicidad relativa de cada análogo respecto a la saxitoxina. Tomado de Oshima, 1995.

## 1.1 Antecedentes

Existe poca información sobre la disipación térmica del exceso de energía en dinoflagelados, por lo tanto, no se conocen los mecanismos de regulación que controlan la respuesta al estrés lumínico. La diferencia tanto en la estructura de las antenas colectoras de luz de los fotosistemas, así como en la composición pigmentaria de los dinoflagelados, indican que los mecanismos de regulación en comparación con otros grupos de microalgas pueden ser distintos, de los cuales las diatomeas son los organismos del fitoplancton en donde se han realizado la mayoría de los estudios sobre el control de NPQ (Goss y Jakob, 2010).

Estudios diversos confirman que existe una capacidad mayor de fotoprotección en microalgas aclimatadas a alta luz (AL) cuando son expuestas a condiciones de luz saturante. Casper-Lindley y Björkman (1998) observaron que el conjunto de pigmentos del CX fue mayor en especies de microalgas aclimatadas a AL en comparación a organismos aclimatados a baja luz (BL). Dimier *et al.* (2007) reportaron un contenido mayor de Dtx y valores máximos de NPQ de 5 a 10 veces más altos en AL en comparación a BL para *Chaetoceros sociales* y *Thalassiosira rotula*. El CX no es el único mecanismo que interviene en la expresión total del NPQ, la síntesis de Zx es fundamental para inducir la disipación térmica. Hasta un 40% de la inducción del NPQ se ha asociado a la síntesis de este pigmento en plantas superiores y algas verdes (Wilhelm y Selmar, 2011). En contraste, el 100% del NPQ en algas pardas (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007) y diatomeas (Olaizola *et al.*, 1994; Lavaud *et al.*, 2004) depende de la síntesis de los pigmentos fotoprotectores Zx y Dtx, respectivamente. En dinoflagelados simbioses de corales se tiene evidencia del cambio relativo de ambos procesos durante el ciclo diurno (Brown *et al.*, 1999). Asimismo, en dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima* se observó que existe una alta dependencia entre el NPQ y la presencia de los pigmentos desepoxidados del CX (Dtx) (Lombardo-Cifuentes, 2011). Sin embargo, no existe información sobre la importancia de este ciclo en la expresión del NPQ en dinoflagelados que forman parte del fitoplancton y menos en especies con potencial tóxico.

Las toxinas de origen algal son responsables de entre 50,000 y 500,000 intoxicaciones humanas al año, con una tasa de mortalidad total mundial del 1.5 % de las personas intoxicadas (Wang, 2008). A nivel global, alrededor de 2,000 casos de PSP son reportados al año, con una

tasa de mortalidad del 15% (Deeds *et al.*, 2008). El primer evento documentado de PSP ocurrió en 1927 cerca de San Francisco, E.U.A., y fue causado por *Alexandrium catenella*, reportándose 102 intoxicaciones y 6 muertes humanas (Sommer y Meyer, 1937). Después de ese evento otras especies de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* han sido identificados como productoras de PST (Shumway, 1990). Landsberg (2002) realizó una revisión de los efectos asociados a FAN sobre organismos marinos, encontrando que en mayo de 1942 se reportó la muerte de aproximadamente 2,000 aves piscívoras en las costas del estado de Washington, E.U.A., y además seis muertes humanas. En 1987 se reporta la muerte de 14 ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) en aguas de Nueva Inglaterra, E.U.A, y en los meses de mayo y julio de 1997 se registraron cerca de 117 focas monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) muertas a lo largo de la costa oeste del Sahara, en África. Durante estos eventos, se detectaron especies productoras de PST en muestras de agua, como *A. catenella*, *A. minutum* y *G. catenatum*, así como niveles considerables de PST (Landsberg, 2002).

*G. catenatum* fue descrito por primera vez en el Golfo de California en 1939 (Graham, 1943) y se ha asociado a intoxicaciones humanas registradas en la bahía de Mazatlán, México en 1979, donde se reportaron 3 muertes y 19 personas intoxicadas (Mee *et al.*, 1986). Durante los últimos años, han aumentado los reporte de FAN y la presencia de esta especie en varias bahías a lo largo de la costa del Pacífico mexicano (Band-Schmidt *et al.*, 2011). Este aumento podría estar asociado al incremento en el número de investigadores que estudian los FAN o posiblemente a una dispersión de las especies nocivas a nuevas áreas (Band-Schmidt *et al.*, 2004). *G. catenatum* ha sido reportado en México, Argentina, España, Portugal, Tasmania, Australia, Japón, Venezuela, Tailandia, Filipinas, Palaos, Uruguay, Marruecos, Malasia (Hallegraeff y Fraga, 1998), Brasil (Proença *et al.*, 2001) y Corea (Oh y Yoon, 2004).

No se conocen las condiciones que controlan la producción de toxinas de tipo paralizante. Sin embargo, se ha evaluado la influencia de factores ambientales sobre especies productoras de PST cultivadas en laboratorio. Laabir *et al.* (2011) evaluaron la influencia de diferentes condiciones de cultivo sobre el crecimiento del dinoflagelado tóxico *A. catenella* aislado del mar Mediterráneo y observaron una capacidad amplia de aclimatación a distintas condiciones de luz, temperatura y salinidad. Parkhill y Cembella (1999) evaluaron el efecto de la salinidad, luz y concentración de nitratos sobre el crecimiento y la toxicidad de *A. tamarensense* aislado de un

estuario de Quebec, Canadá. En este estudio se reportó que la toxicidad celular durante el cultivo no se vio afectada por ninguno de los factores a evaluar, solo varió en las distintas fases de crecimiento encontrándose las mayores concentraciones durante la fase exponencial ( $58.8 \pm 7$  pg STXeq cél<sup>-1</sup>), dominando la presencia de las toxinas N-sulfocarbamatadas C1 y C2 ( $64 \pm 3$  %), consideradas de bajo potencial tóxico (Parkhill y Cembella, 1999).

Por otro lado, los cambios en la proporción de nitrógeno y fósforo no estimularon la producción ni cambios en el perfil de PST, pero sí influyeron en la abundancia celular de *G. catenatum* aislado de bahía Concepción, Baja California Sur (B.C.S), México, por lo que se sugiere que la dinámica celular de toxinas está relacionada con la fase de crecimiento de este organismo (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012). Las toxinas N-sulfocarbamatadas fueron las más abundantes (B 1-2) durante los primeros días, seguidas de las carbamatadas (STX y neoSTX) al encontrarse más desarrollado el cultivo. Las cepas de *G. catenatum* aisladas de diferentes áreas en México presentan una toxicidad moderada y porcentajes elevados (81-86 %) de toxinas N-sulfocarbamatadas (toxinas tipo C) junto con derivados de decarbamatadas (6.5-8.8 %) (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006).

No se ha estudiado el efecto de la intensidad de la luz y los mecanismos de fotoprotección en cepas mexicanas de *G. catenatum*, por lo que el presente trabajo evaluará el efecto de esta variable sobre el crecimiento, producción y potencial tóxico de esta especie.

## 2. Justificación

El ciclo de las xantofilas (CX) es un elemento importante en la fotoaclimatación y fotoprotección de los organismos y es una característica altamente conservada en los organismos fototróficos eucariontes (Goss y Jakob, 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre el proceso de disipación térmica y mecanismos de fotoaclimatación en dinoflagelados. En este grupo no se ha estudiado la cinética de inducción del NPQ y su relación con la interconversión de los pigmentos involucrados en el CX, por lo que no se conoce el grado de correlación entre estos dos procesos. Esto es importante para entender cómo responden estos organismos al estrés lumínico. No se conocen las condiciones de crecimiento óptimo a diferentes intensidades de luz de *G. catenatum* en cultivo. Este trabajo evalúa por primera vez el efecto de la intensidad de la luz sobre el crecimiento, contenido y perfil de pigmentos y PST en cepas de *G. catenatum* aisladas del Golfo de California. La exposición de *G. catenatum* a distintas intensidades de luz permitirá evaluar si esta variable afecta la capacidad de producción de toxinas en cultivo. Por lo tanto, la caracterización del crecimiento de *G. catenatum* a distintas intensidades de luz permitirá comprender mejor la respuesta fisiológica de esta especie a diferentes factores ambientales.

La distribución de especies formadoras de FAN, y específicamente asociadas a la producción de PST se ha ampliado provocando la intoxicación y muerte de humanos y de una gran variedad de organismos marinos en las zonas costeras. Asimismo, la presencia de estas especies ha afectado drásticamente las actividades pesqueras y acuícolas a nivel mundial. Los estudios realizados en cultivos de *G. catenatum* aislado del Golfo de California se han enfocado principalmente en caracterizar el efecto de la temperatura, salinidad (Band-Schmidt *et al.*, 2004) y limitación de nutrientes (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012), así como la comparación entre medios de cultivo (Band-Schmidt *et al.*, 2004) sobre el crecimiento y producción y proporción de PST. *G. catenatum* se distribuye a lo largo de todo el Pacífico mexicano y se considera como el principal productor de PST en el Golfo de California. Este dinoflagelado se ha detectado recientemente en la región de San Felipe, B.C., y es el responsable de la acumulación de toxinas en bivalvos de esa región (Murillo-Martínez, 2011) por lo que es necesario conocer las respuestas fisiológicas de esta especie en general y eventualmente evaluar el potencial tóxico de cepas aisladas en diferentes regiones del Golfo de California.

### 3. Hipótesis

El crecimiento y la producción de toxinas de tipo paralizante del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* aislado del Golfo de California se ven afectados por la intensidad de la luz en cultivos estáticos.

El contenido celular y el perfil de toxinas de tipo paralizante varían durante las diferentes fases de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* mantenido en cultivos estáticos a distintas intensidades de luz.

La capacidad de fotoprotección medida como la expresión de la disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) depende del ciclo de las xantofilas en *Gymnodinium catenatum*.

## 4. Objetivo general

Caracterizar el crecimiento, potencial tóxico y la relación entre la disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) y el ciclo de las xantofilas en *Gymnodinium catenatum* aislado del Golfo de California cultivado bajo diferentes irradiancias.

### 4.1 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de una irradiancia baja (BL;  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y una irradiancia alta (AL;  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sobre el crecimiento y contenido celular de toxinas de tipo paralizante de *Gymnodinium catenatum* aislado del Golfo de California.
- Evaluar la variación en la producción de toxinas de tipo paralizante en diferentes fases de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* cultivado a una irradiancia baja (BL;  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y una irradiancia alta (AL;  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- Evaluar el efecto de la intensidad de la luz sobre el perfil de toxinas de tipo paralizante en cepas de *Gymnodinium catenatum* aisladas del Golfo de California.
- Caracterizar la capacidad de fotoprotección medida como la expresión de la disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) en *Gymnodinium catenatum* aclimatado a una baja y alta irradiancia.
- Evaluar la relación entre la disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) y el ciclo de las xantofilas en *Gymnodinium catenatum* aclimatado a una baja y alta irradiancia.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Cultivo de *Gymnodinium catenatum*

Para los experimentos se utilizó la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* adquirida de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, México. La cepa fue aislada originalmente en mayo del 2001 de muestras de agua de Bahía Concepción, B.C.S. Las células se mantuvieron en matraces de 125 mL a  $21 \pm 1$  °C con una iluminación de  $230 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando lámparas fluorescentes de luz de día. Se mantuvieron en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 en medio GSe (Doblin *et al.*, 2000). Al aumentar la abundancia celular en estos cultivos se utilizaron recipientes de mayor volumen. Para la realización de los experimentos, las células se aclimataron previamente para cada condición de luz inoculando una réplica para cada tratamiento: Baja Luz (BL) corresponde a células expuestas a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para el tratamiento de Alta Luz (AL). Se utilizaron lámparas LED de luz blanca y los cultivos se mantuvieron con un ciclo de luz:oscuridad 12:12 a una temperatura de  $21 \pm 1$  °C. Durante la aclimatación se monitoreó el aumento poblacional de los cultivos cada dos días mediante el recuento al microscopio de alícuotas previamente fijadas con Lugol-Acetato, utilizando cámaras Sedgewick-Rafter. Al encontrarse los cultivos en la fase de crecimiento exponencial se inocularon tres réplicas en cada condición de luz, agregando alícuotas de 300 mL de *G. catenatum* a 600 mL de medio GSe en matraces Erlenmeyer de vidrio de 1 L.

### 5.2 Tasa de crecimiento

Para cada tratamiento se evaluó, por triplicado, la abundancia celular cada dos días de los tres cultivos aclimatados a las dos intensidades de luz. La evaluación de la abundancia celular se realizó mediante el recuento al microscopio de alícuotas de los cultivos previamente preservadas con Lugol-Acetato, utilizando cámaras Sedgewick-Rafter. La tasa de crecimiento instantánea ( $\mu$ ) se midió para periodos específicos durante el desarrollo de cultivos a diferentes condiciones y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

donde  $\mu$  es la velocidad o tasa de crecimiento específica,  $X_2$  es la abundancia celular en el tiempo 2 ( $t_2$ ),  $X_1$  es la abundancia celular en el tiempo 1 ( $t_1$ ) y  $t$  es el tiempo en días. La tasa de crecimiento máxima se calculó para el periodo de crecimiento exponencial para cada condición de cultivo.

### 5.3 Mediciones de fluorescencia

Las mediciones de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (FSII) se realizaron con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Germany), que tiene una luz de medición de 428 nm (LED azul). La nomenclatura y los parámetros calculados son de acuerdo a Van Kooten y Snel (1990). La eficiencia cuántica máxima del FSII se calculó como  $F_v/F_m$ , donde  $F_v = F_m - F_0$ . Las células de *G. catenatum* se mantuvieron en oscuridad por lo menos 10 min y la fluorescencia basal ( $F_0$ ) se midió al exponer las muestras solamente a la luz de medición. La fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se midió al dar un pulso saturante ( $3,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con una duración de 0.8 s. La  $F_0$  se presenta cuando todos los centros de reacción del FSII están abiertos, es decir, que el aceptor primario ( $Q_A$ ) está oxidado. La fluorescencia máxima  $F_m$ , se detecta cuando todos los centros de reacción están cerrados y  $Q_A$  está reducido. Bajo estas condiciones, la eficiencia fotoquímica es 0 y por lo tanto la fluorescencia es máxima. La capacidad de disipación no fotoquímica del FSII (NPQ) se evaluó en una cámara de medición de oxígeno. La inducción del NPQ se realizó en cada réplica aclimatada a BL y AL durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Se tomaron 15 mL de cada réplica y se mantuvieron en oscuridad por lo menos 10 min a una temperatura constante de 21 °C mantenida por medio de recirculación de agua. Las muestras se mantuvieron en agitación constante durante las mediciones y se midió la  $F_m$  en estas condiciones. Posterior al periodo de adaptación a la oscuridad se iluminó la cámara por un periodo de 30 min mediante una lámpara blanca de halógeno de 125 W. La lámpara fue posicionada de tal manera que toda la muestra fuera iluminada homogéneamente. La fibra óptica del fluorómetro fue colocada en un ángulo de 90° en relación a la luz de la lámpara. La intensidad de la luz a la que fueron expuestas las células fue de aproximadamente  $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Posterior al periodo de exposición a la luz se registraron mediciones de fluorescencia durante 24 min en oscuridad para evaluar la cinética de disipación del NPQ el cual se calculó como:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m' \quad (2)$$

donde  $F_m'$  es el valor de la fluorescencia máxima obtenido durante el periodo de incubación con luz actínica y en oscuridad posterior al periodo de iluminación.

#### 5.4 Análisis de pigmentos en *Gymnodinium catenatum*

La toma de muestras para el análisis de pigmentos se realizó para cada réplica aclimatada a BL y AL durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Este muestreo se realizó durante los experimentos de caracterización de la inducción y disipación del NPQ. Se tomaron 15 mL de cada réplica de cada tratamiento y se mantuvieron en oscuridad por lo menos 10 min a una temperatura constante de 21 °C por medio de recirculación de agua. Se tomaron muestras a los 0 min (al final del periodo de adaptación a la oscuridad) y a los 2, 5, 10, 15, 30 min durante el periodo de exposición a la luz actínica ( $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a los 1, 2, 3, 5, 10, 20 y 30 min después de apagar la luz actínica. El volumen muestreado (1 mL) se filtró utilizando filtros tipo GF/F de 13 mm de diámetro. Los filtros fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación de los pigmentos y se mantuvieron de esta manera hasta su análisis por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

La extracción de los pigmentos se realizó colocando cada filtro en un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se agregaron perlas de sílice-zirconia de 0.5 mm y 1 mL de acetona al 100% enfriada previamente. La ruptura de las células se llevó a cabo por medio de un mini “Bead Beater” (Bisopex Products Inc.), agitando por 10 segundos a 500 rpm por tres ocasiones, con periodos de enfriamiento entre cada uno de ellos. Finalmente, la limpieza del extracto se realizó con dos periodos de centrifugación a 13 000 rpm por 5 min a 2 °C. Una vez limpia la muestra, se tomó el sobrenadante y 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.

#### 5.5 Identificación y cuantificación de pigmentos por cromatografía (HPLC)

Para la separación de pigmentos por HPLC se utilizó el protocolo descrito por Van Heukelem y Thomas (2001), pero modificando el gradiente de bombeo de la fase móvil de acuerdo a Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008). Este protocolo separa a nivel de línea

base a la clorofila *a* de la divinil clorofila *a* y a la zeaxantina de la luteína. Se utilizó un equipo de HPLC marca Agilent modelo 1260 equipado con una columna de fase reversa Zorbax XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm tamaño de poro). La columna se mantuvo a 60 °C durante el análisis. Se utilizó un gradiente binario de solventes, Metanol:TBAA 28 mM (70:30, v/v) como solvente A y Metanol 100% como solvente B, con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El gradiente de bombeo de la fase móvil fue (%B, min): 5%, 0 min; 95%, 22 min; 95%, 27 min; 5%, 30 min. La elución de los pigmentos se midió con un detector de arreglo de diodos (DAD) configurado a 5 longitudes de onda de detección (436, 450, 475, 665 y 780 nm). El sistema se calibró utilizando 5 estándares comerciales de pigmentos: Chl *a*, peridina, diadinoxantina, diatoxantina y Chl *c* (DHI, Inc. Suecia). 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. El cálculo del área de los pigmentos se realizó con el software de sistema de datos cromatográficos ChemStation (Agilent).

El grado de desepoxidación (DPS) de los pigmentos involucrados en el CX que presenta *G. catenatum* se calculó como:

$$\text{DPS} = [\text{Dtx}] / ([\text{Ddx}] + [\text{Dtx}]) \quad (3)$$

donde Dtx y Ddx representan la concentración de diatoxantina y diadinoxantina, respectivamente. El DPS representa el estado fotoprotector de los carotenoides del CX ya que Dtx está involucrado en la disipación de energía en forma de calor que protege al aparato fotosintético (Niyogi, 1999).

### 5.6 Análisis de toxinas de tipo paralizante (PST) en *Gymnodinium catenatum*

El análisis de toxinas se realizó en muestras colectadas durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria de cada tratamiento. Se filtraron entre 40 y 75 mL de cada cultivo, por triplicado, las células se concentraron en filtros de fibra de vidrio (GF/F) de 25 mm y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su análisis.

La extracción de toxinas se realizó colocando los filtros en tubos de microcentrífuga de 2 mL, se agregó 1 mL de ácido acético (0.03 N) y posteriormente se efectuó el rompimiento de la pared celular por disrupción mecánica por medio de un mini “Bead Beater” (Biospec Products

Inc.), agitando por 30 segundos a 500 rpm. El contenido del tubo se pasó a un tubo Falcon de 15 mL y se agregó nuevamente 3 mL de ácido acético (0.03 N). Se agitó el tubo durante 30 segundos con un vortex y se clarificó por centrifugación a 3,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó por un filtro de 0.25  $\mu\text{m}$  (PTFE) y a cada filtro se le dio un solo uso. Posteriormente, se agregaron 35  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico (1 M) por cada 150  $\mu\text{L}$  de muestra filtrada, se agitó por 30 segundos y se mantuvo la muestra a 90°C por 15 min. Posteriormente se dejó enfriar y se agitó nuevamente por 30 segundos para enseguida añadir 75  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio (1 M). Finalmente, se agitó por otros 30 segundos y se tomó una alícuota para su análisis por HPLC.

### **5.7 Identificación y cuantificación de toxinas por cromatografía (HPLC)**

El análisis cromatográfico se llevó a cabo de acuerdo a Hummert *et al.* (1997) y Yu *et al.* (1998). El gradiente de solventes estuvo compuesto por una solución de ácido octanosulfónico y fosfato de amonio a un pH de 6.9 y acetonitrilo para separar las toxinas paralizantes. Después de una oxidación postcolumna con ácido periódico alcalino, los productos resultantes se detectaron con un detector de fluorescencia (HP 1116) a una longitud de onda de 330 nm de excitación y de 395 nm de emisión. El sistema se calibró utilizando estándares de STX, neoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 y dcSTX (National Research Council, Canadá). Los estándares GTX2 y GTX3 contienen dcGTX2 y dcGTX3 en bajas proporciones. La identificación de STX y sus análogos se realizó comparando los tiempos de retención de las muestras con los estándares de referencia. La cuantificación de toxinas se realizó mediante las áreas de los picos de los analitos con el factor de respuesta correspondiente calculado con los estándares certificados.

### **5.8 Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar si existieron diferencias entre cada condición de iluminación y fase de crecimiento del cultivo y utilizando un análisis para cada uno de los siguientes indicadores: tasas de crecimiento, contenido de pigmentos y toxinas, y producción de NPQ. Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la dependencia entre los valores obtenidos de NPQ durante su activación y desactivación y la concentración de Dtx para cada condición de cultivo y fase de crecimiento. Para estos análisis estadísticos se utilizó el programa STATISTICA v.7.1 (StatSoft, Inc.) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Abundancia celular y tasa de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* cultivados en dos irradiancias

Durante el periodo de experimentación, se evaluó la abundancia celular cada dos días después de inocular los cultivos. Los análisis de pigmentos, toxinas e inducción de NPQ se realizaron durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria en los dos tratamientos (Fig. 2).

Las células expuestas a Alta Luz (AL) presentaron una tasa de crecimiento mayor y una abundancia celular más alta al final de la fase estacionaria (Tabla 1) en comparación a las células expuestas a Baja Luz (BL). Las tasas de crecimiento máximas fueron de  $0.14 \pm 0.01$  y  $0.28 \pm 0.06 \text{ día}^{-1}$  para células cultivadas a BL y AL, respectivamente. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Las células expuestas a BL presentan una fase exponencial más corta de aproximadamente 12 días y alcanzaron una abundancia celular máxima de  $3,258 \pm 186 \text{ cél mL}^{-1}$ . Por otro lado, los cultivos en AL presentaron una fase exponencial de 20 días alcanzando una abundancia celular máxima de  $5,902 \pm 656 \text{ cél mL}^{-1}$  la cual fue dos veces mayor que la de BL. La fase estacionaria fue clara para los dos tratamientos presentándose abundancias celulares sin cambios durante 4 conteos (8 días) seguidos (Fig. 2).

### 6.2 Inducción y disipación de NPQ en *Gymnodinium catenatum*

Se caracterizó la cinética de inducción en luz saturante y disipación de NPQ en condiciones de oscuridad de *G. catenatum* aclimatado a dos condiciones de luz. Se evaluó la inducción de NPQ en células colectadas durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. La inducción de NPQ se evaluó en células expuestas a  $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  por 30 min. Posteriormente, se monitoreó por 24 min la emisión de fluorescencia en oscuridad.

En los 30 min de exposición a la luz saturante se observó un incremento de NPQ para las dos condiciones de luz y las dos fases de crecimiento (Fig. 3). La inducción del NPQ varió entre los dos tratamientos de aclimatación y en las distintas fases de crecimiento. En células aclimatadas a BL el NPQ en la fase estacionaria se observó una mayor inducción de NPQ ( $10.0 \pm 0.62$ ; Fig. 3 y Tabla 2) que en la fase exponencial. El NPQ máximo detectado después de 30 min

en luz fue aproximadamente dos veces mayor en la fase estacionaria en comparación con la fase exponencial en células aclimatadas a BL (Fig. 3). En contraste, en células aclimatadas a AL el NPQ fue mayor durante la fase exponencial ( $9.06 \pm 0.24$ ) en comparación con la fase estacionaria. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la cinética de NPQ entre las fases de crecimiento y condiciones de luz durante la etapa de inducción y disipación. Solo en el cultivo de BL en fase estacionaria se pudo observar una saturación del NPQ durante de los 30 min de iluminación.

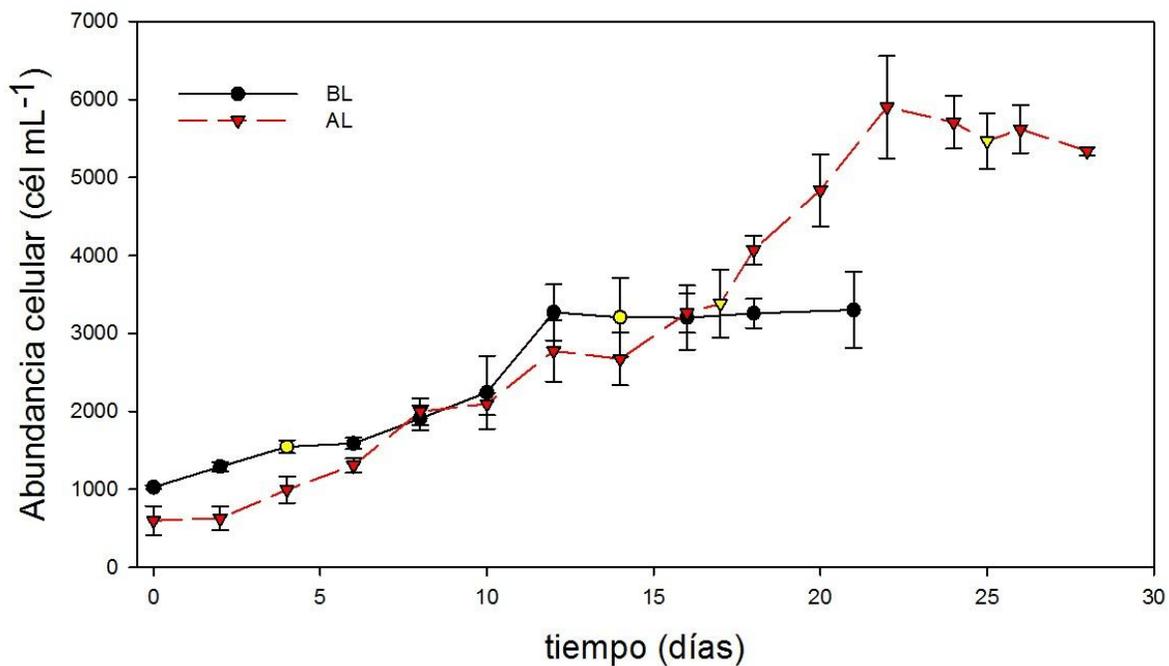
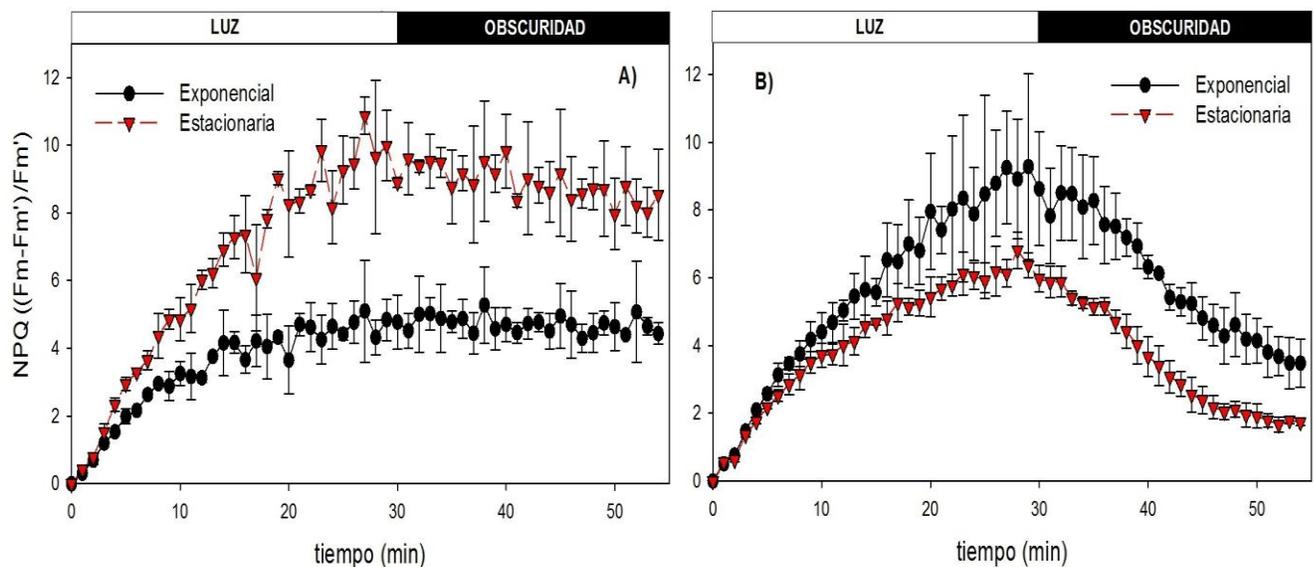


Figura 2. Crecimiento poblacional de *Gymnodinium catenatum* cultivado a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz, BL; círculos negros), y expuesto a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz, AL; triángulos rojos). Los puntos amarillos corresponden a los días en los que se realizó la toma de muestras para el análisis de pigmentos, toxinas e inducción de NPQ. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Tabla 1. Tasa de crecimiento máxima poblacional ( $\mu$ ) y abundancia celular máxima de *Gymnodinium catenatum* cultivado a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz, BL) y a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz, AL).

Tratamiento	$\mu$ (div día <sup>-1</sup> )	Abundancia máx (cél mL <sup>-1</sup> )
BL	$0.14 \pm 0.01$	$3\ 258 \pm 186$
AL	$0.28 \pm 0.06$	$5\ 902 \pm 656$

Se caracterizó la disipación de NPQ después de la exposición a la luz. Una vez establecido el NPQ en luz saturante, las células se mantuvieron por 24 min en oscuridad observándose una disminución del NPQ en casi todos los tratamientos, lo que refleja un aumento en la emisión de fluorescencia del FSII. Se observó una reducción significativa solamente en cultivos aclimatados a AL para ambas fases de crecimiento. El NPQ después de 24 min en oscuridad disminuyó un 63 y 75 % del máximo detectado para células colectadas en la fase exponencial y estacionaria, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la cinética de NPQ entre las fases de crecimiento durante la etapa de disipación. Las células aclimatadas a AL presentan una reducción rápida del NPQ en oscuridad, lo que indica que existe un proceso relativamente rápido de recuperación de la emisión del FSII, mientras que en las células aclimatadas a BL, la reducción es mínima. En específico, en muestras colectadas en fase exponencial en BL no se presentó una reducción del NPQ en oscuridad.



**Figura 3.** Inducción y disipación de NPQ en *Gymnodinium catenatum* aclimatado a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz, panel A) y  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz, panel B) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

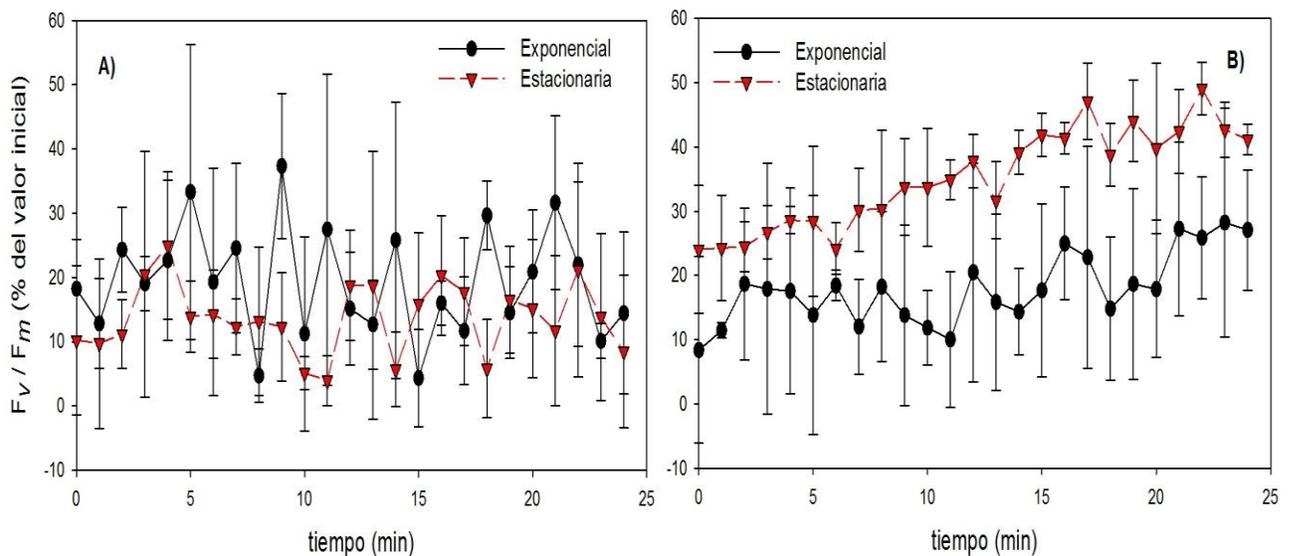
**Tabla 2.** Valores de NPQ a los 30 min de exposición a la luz saturante ( $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en células aclimatadas a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz, BL) y a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz, AL) y en distintas fases de crecimiento poblacional.

Tratamiento	Fase	NPQ
BL	Exponencial	$4.76 \pm 0.32$
	Estacionaria	$10.0 \pm 0.62$
AL	Exponencial	$9.06 \pm 0.24$
	Estacionaria	$6.38 \pm 0.30$

La variación de la emisión de fluorescencia del FSII en respuesta a cambios en condiciones de luz es un indicador de los diferentes procesos que están involucrados en la regulación de la actividad fotosintética, como son la disipación de calor (NPQ), la interconversión de los pigmentos del CX o el daño y reparación del FSII. Por ejemplo, una reducción de la fluorescencia del FSII reflejado en el aumento de NPQ durante los 30 min de exposición a la luz saturante puede estar relacionada a un aumento en la disipación térmica del exceso de energía en este fotosistema medida por los pigmentos fotoprotectores u otro mecanismo o debido a la acumulación de fotodaño. Asimismo, el análisis en la cinética de recuperación en obscuridad indicaría qué proceso interviene en la regulación de la fotosíntesis y en la emisión del FSII. Se caracterizó la variación en la producción de los pigmentos fotoprotectores relacionados al CX y también se evaluó el cambio de la eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ) durante la exposición a la luz saturante y en obscuridad como indicador de la inactivación de este fotosistema en las células aclimatadas a las dos condiciones de luz (Fig. 4).

La  $F_v/F_m$  en todos los tratamientos disminuyó de manera inmediata durante la exposición a la luz saturante y se mantuvo a un valor bajo durante el periodo de exposición (datos no mostrados). Las células expuestas a luz saturante presentaron una disminución de la  $F_v/F_m$  de aproximadamente 90 % del valor medido durante el periodo de adaptación a la obscuridad. Una vez que se omitió el estrés de luz la recuperación de la  $F_v/F_m$  fue diferente para cada tratamiento de luz. En las células aclimatadas a BL no se detectó un aumento de la  $F_v/F_m$  durante el periodo de obscuridad (24 min). Una vez apagada la luz saturante, se detectó una  $F_v/F_m$  de

aproximadamente entre el 10 y 15 % del valor inicial de la  $F_v/F_m$  en células muestreadas durante la fase estacionaria y exponencial, respectivamente. Este valor no aumentó durante el periodo de obscuridad (Fig. 4A), lo que indica que existió acumulación de daño del FSII que afectó la señal de fluorescencia de este sistema y por lo tanto un incremento del NPQ detectado en luz y que no se disipó en obscuridad para el periodo de duración del experimento. Por otro lado, en las células aclimatadas a AL se detectó una mayor recuperación y un incremento rápido del  $F_v/F_m$  en obscuridad en comparación a las células aclimatadas a BL (Fig. 4B). Al final del periodo de obscuridad se detectaron valores del 29 y 42 % del valor inicial (adaptación a obscuridad) durante la fase exponencial y estacionaria, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las fases de crecimiento durante la etapa de recuperación de la  $F_v/F_m$ . El porcentaje menor de recuperación de la  $F_v/F_m$  en los tratamientos a BL indica procesos asociados a la inhibición de los FSII debido al daño fotoquímico.

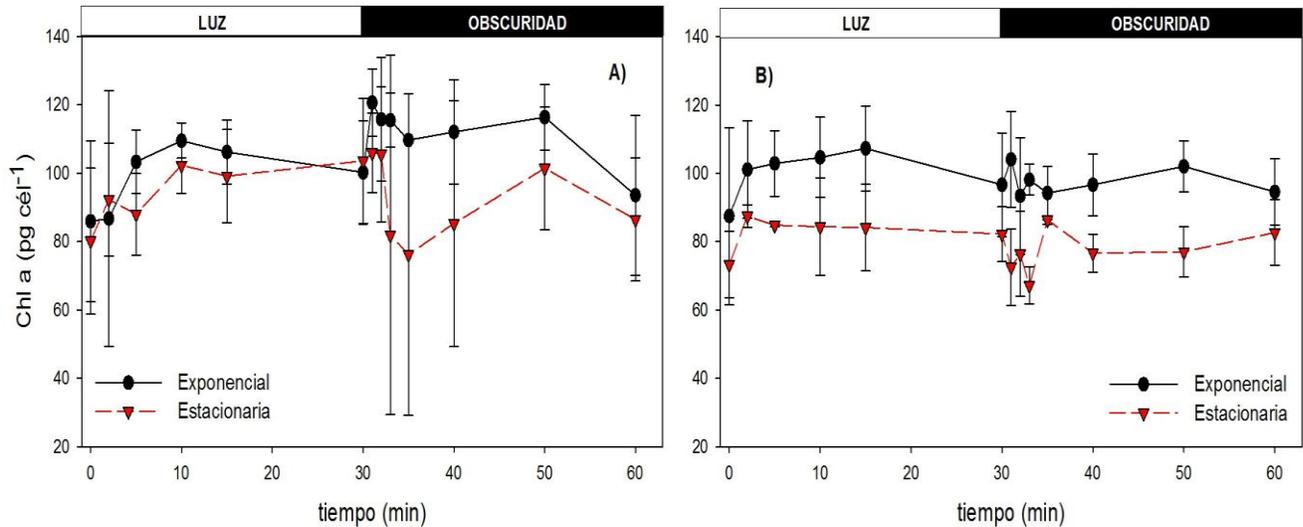


**Figura 4.** Cambio en la eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) en células de *Gymnodinium catenatum* aclimatadas a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz, panel A) y  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz, panel B) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

### 6.3 Concentración de pigmentos en *Gymnodinium catenatum*

Se evaluó el cambio de la concentración de pigmentos en células aclimatadas a dos condiciones de luz, durante y después de la exposición a una irradiancia saturante ( $800 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

En la figura 5 se presenta la concentración celular de clorofila *a* (Chl *a*) en muestras colectadas durante el tratamiento con luz saturante y en oscuridad después de la exposición a luz. Se presentó una alta variabilidad en los resultados que puede estar asociada principalmente a la variabilidad en el número de células colectadas en los diferentes tiempos de muestreo. La normalización de la concentración de Chl *a* se realiza con la abundancia celular evaluada al principio de los experimentos (por triplicado) y esta abundancia puede ser diferente en los diferentes puntos de muestreo en el experimento y entre réplicas. La concentración de Chl *a* no debería cambiar durante el tiempo que duran los tratamientos de luz y oscuridad, por lo que para las pruebas estadísticas se eliminaron los resultados con mayor variabilidad de los diferentes tratamientos. No se consideraron para las dos fases de crecimiento las dos primeras muestras en los tratamientos de BL (0 y 2 min) durante la exposición a la luz saturante y las de 3, 5 y 10 min durante el periodo de oscuridad (Fig. 5). Los análisis estadísticos demostraron que no existieron diferencias significativas en la concentración de Chl *a* (Fig. 5 A y B) entre la misma fase de crecimiento en las dos aclimataciones, pero se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre fases de crecimiento para el mismo tratamiento de aclimatación. La concentración promedio de Chl *a* durante la inducción y disipación del NPQ para el tratamiento de BL fue de  $105.82 \pm 11.32$  y  $92.95 \pm 10.54 \text{ pg cél}^{-1}$  para la fase exponencial y estacionaria, respectivamente. Mientras que para el tratamiento de AL la concentración fue de  $98.7 \pm 5.58 \text{ pg cél}^{-1}$  para la fase exponencial y  $79.63 \pm 6.22 \text{ pg cél}^{-1}$  para la fase estacionaria. Las células en fase exponencial presentaron una mayor concentración de Chl *a* en las dos aclimataciones de luz, lo que significa una diferencia del 12 y 19 % entre fases de crecimiento para los tratamientos de BL y AL, respectivamente.



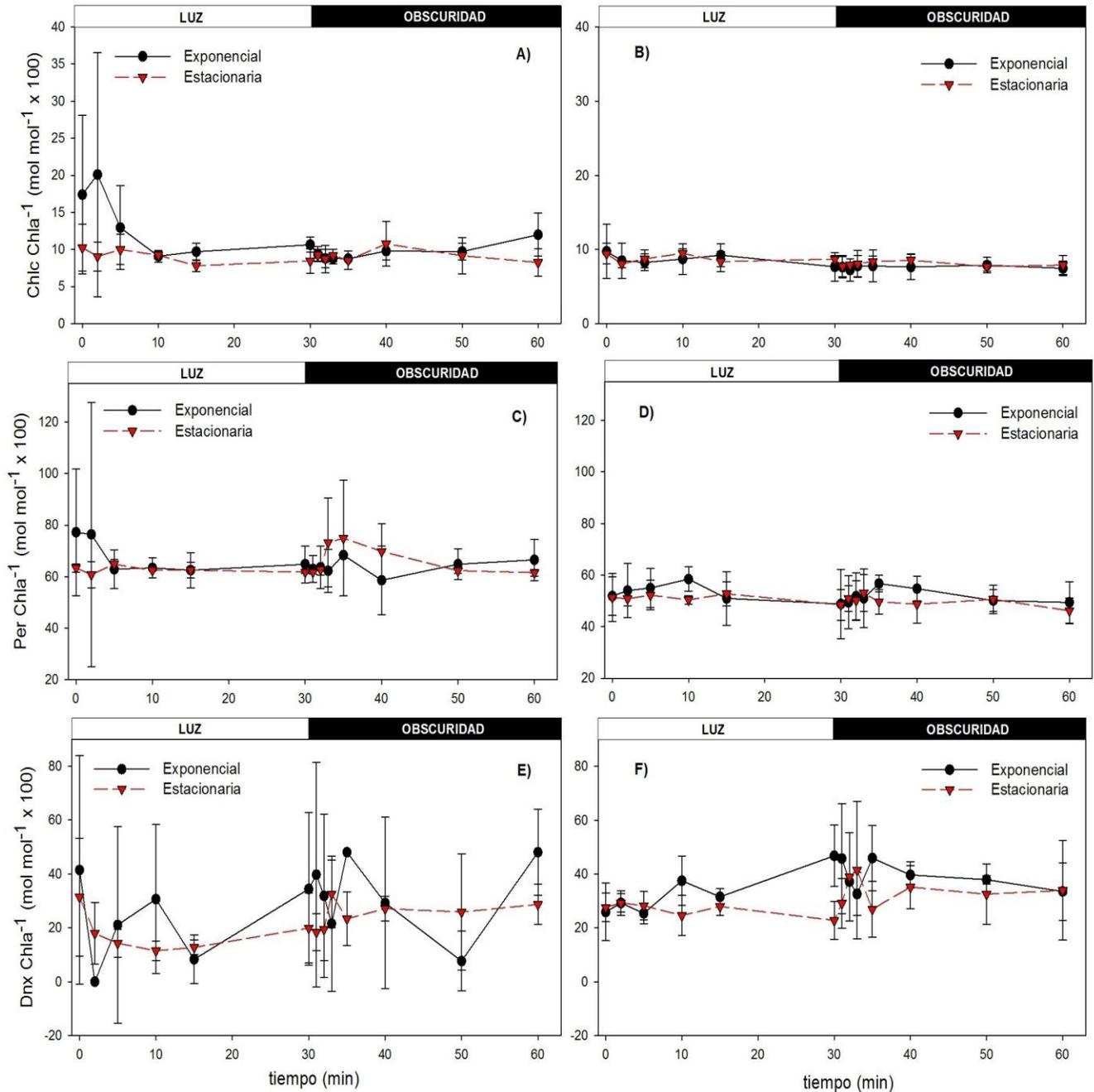
**Figura 5.** Concentración de clorofila *a* (Chl *a*) en *Gymnodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en obscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz (panel A) y Alta Luz (panel B) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. La concentración de Chl *a* se presenta en pg c $el^{-1}$ . Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Se analizó el cambio en la concentración de otros pigmentos durante los tratamientos de luz saturante y obscuridad. La concentración de los diferentes pigmentos detectados fue normalizada con respecto a la concentración de la Chl *a* para reducir la variación asociada al cambio en el número de células colectadas en cada réplica. Con excepción de los primeros puntos de muestreo durante la exposición a luz saturante (minuto 0 y 2 de exposición), y de acuerdo a lo esperado, no se detectaron cambios en la concentración de clorofila *c* (Chl *c*) y peridininina (Per) (Fig. 6 A, B, C y D) durante el periodo de inducción y disipación de NPQ. Las concentraciones de estos pigmentos se mantuvieron constantes durante la exposición a la luz saturante y durante el periodo de obscuridad. La concentración de Chl *c* fue similar entre fases de crecimiento y entre aclimataciones con una concentración promedio durante el experimento de  $8.85 \pm 1.12 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ . Por otro lado, la concentración de Per promedio para el tratamiento de BL fue de  $64.29 \pm 3.89 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  y  $51.41 \pm 2.69 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  para el de AL. Para la concentración de Chl *c* no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos al igual que entre fases de crecimiento. Para la concentración de Per se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de luz pero no entre fases de crecimiento ( $p < 0.05$ ).

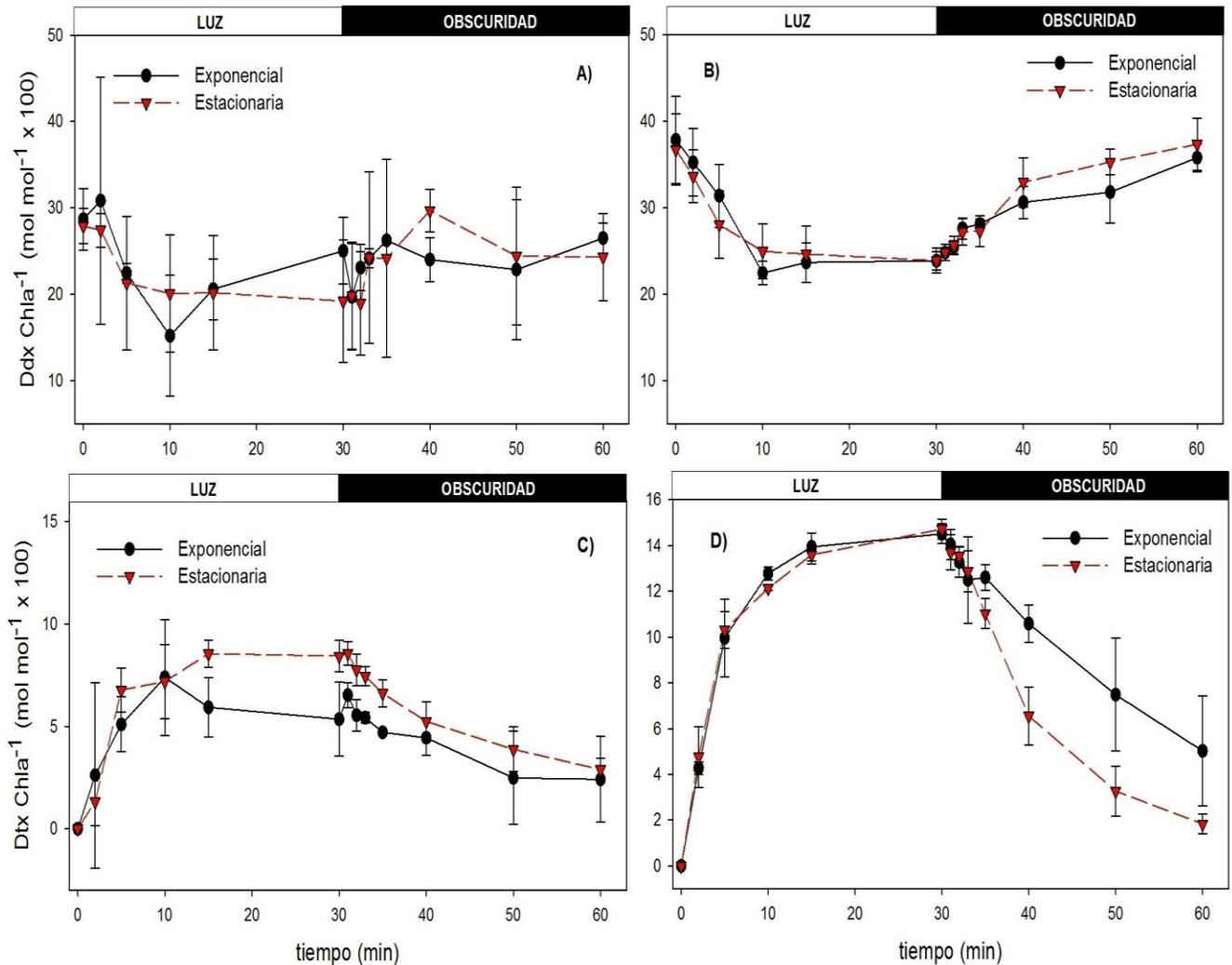
Se analizó también la variación de la concentración de dinoxantina (Dnx) durante los 30 min de exposición a la luz saturante y posteriormente en oscuridad. Ya que no se contaba con un estándar de este pigmento, la concentración se calculó usando el factor de calibración de la diatoxantina suponiendo características de absorción similares y su concentración se presenta normalizada a la concentración de Chl *a*. Aunque la concentración de Dnx presenta una variabilidad alta se observa que en la fase estacionaria en células aclimatadas a BL y AL la concentración de Dnx disminuye durante la exposición a la luz en un 36 y 18 % del valor inicial respectivamente, y posteriormente la concentración de este pigmento aumenta durante el periodo de oscuridad en por lo menos un 44 % del valor detectado a los 30 min de exposición a luz saturante. En la fase exponencial en el tratamiento de BL se observó una variabilidad mucho más alta en la concentración de Dnx ( $27.9 \pm 15.44 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ ) durante la exposición a la luz y en el periodo de oscuridad. Sin embargo, las células aclimatadas a AL presentan un aumento del 80 % del valor inicial durante la exposición a la luz durante esta fase y disminuye la concentración en un 28 % al final del periodo de oscuridad (Fig. 6 E y F).

Los cambios en la concentración de los pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas (CX) se muestra en la figura 7, donde se observa un aumento claro en la concentración de diatoxantina (Dtx) durante los 30 min de exposición a la luz saturante y disminuyendo durante el periodo de oscuridad (Fig. 7 C y D). En las células aclimatadas a BL, la concentración de Dtx aumentó de cero a  $7.4 \pm 2.8 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  en células en fase de crecimiento exponencial y a  $8.6 \pm 0.7 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  en fase estacionaria. Esta concentración máxima se alcanzó durante los primeros 15 min de exposición a la luz. En células aclimatadas a AL se detectó una concentración de Dtx mayor al final de la exposición a luz saturante en comparación a las aclimatadas a BL. Se detectó una concentración de  $14.5 \pm 0.4 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  en células en fase exponencial de crecimiento y  $14.7 \pm 0.4 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  en fase estacionaria. Durante los primeros 5 min de exposición a la luz saturante se observó un aumento en la concentración de Dtx en más de un 65 % de la concentración máxima detectada en todos los tratamientos. No se observaron diferencias de Dtx a los 30 min de exposición a la luz en células colectadas en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento para los tratamientos de BL y AL. La concentración de diadinoxantina (Ddx) decrece durante el periodo de exposición a la luz actínica y aumentó en la oscuridad para los dos aclimataciones y las dos fases de crecimiento (Fig. 7 A y B). Se presentó una reducción del 30 % en células en fase estacionaria y 40 % en fase exponencial durante los

primeros 5 min de exposición a luz saturante. Después de 30 min de oscuridad la concentración de Ddx aumentó alcanzando una concentración similar a la detectada antes de exponer a las células a luz saturante. Esto se observó para las células aclimatadas a BL y AL y para las dos fases de crecimiento.



**Figura 6.** Concentración de clorofila *c* (Chl *c*), peridinin (Per) y dinoxantina (Ddx) en *Gymnodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz (A, C, E) y Alta Luz (B, D, F) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. La concentración de Chl *c*, Per y Ddx se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presentan en mol del pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas ± su desviación estándar.



**Figura 7.** Concentración de diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) en *Gymnodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en obscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz (A y C) y Alta Luz (B y D) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. La concentración de Ddx y Dtx se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presentan en mol del pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

#### 6.4 Interconversión de los pigmentos implicados en el Ciclo de las Xantofilas (CX)

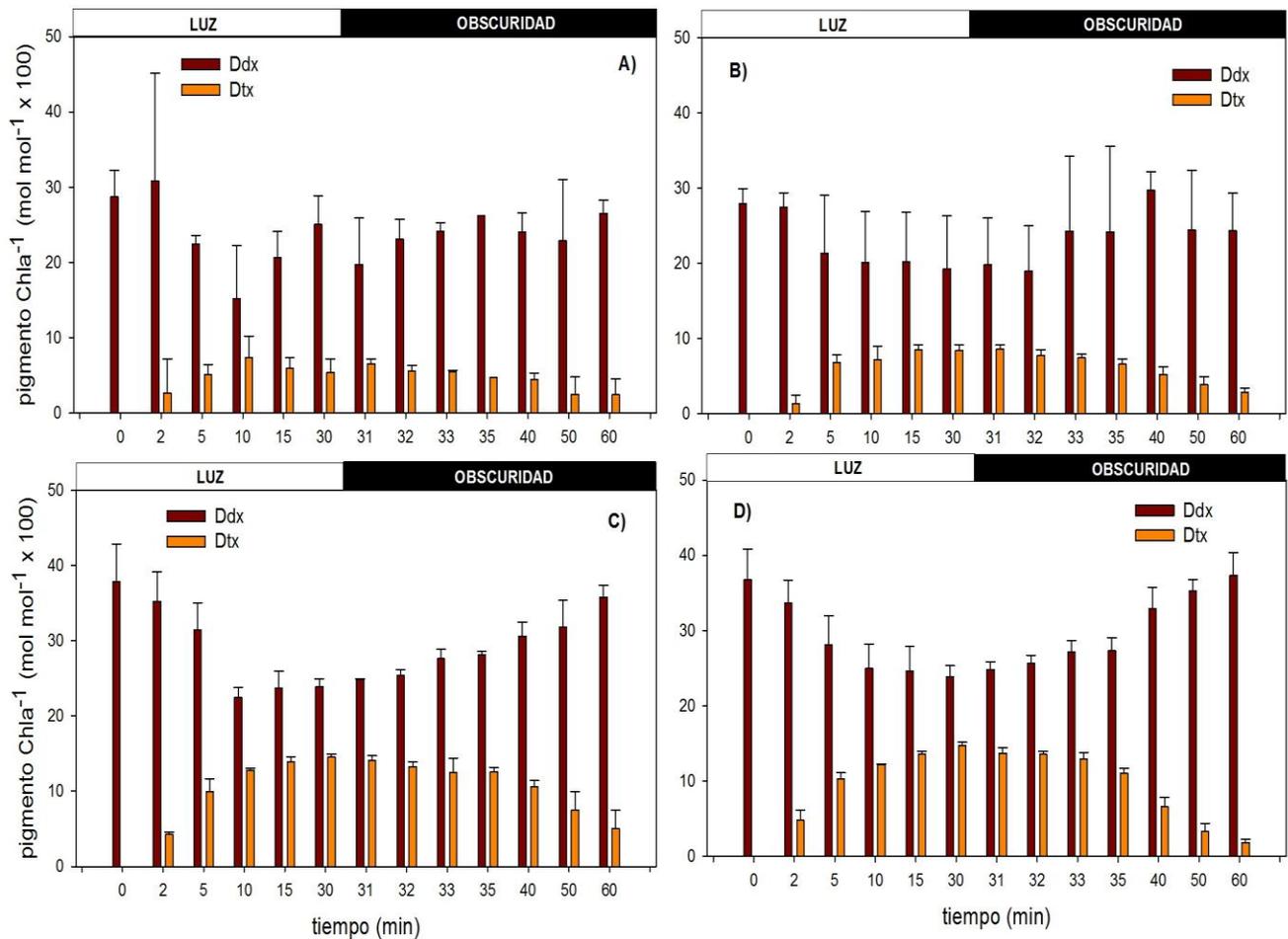
En la figura 8 se presenta la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (CX) donde se observa claramente el proceso de activación/desactivación de este ciclo. Se detectó un aumento en la concentración del pigmento fotoprotector Dtx, proveniente de la desepoxidación de la Ddx al ser expuestas las células a condiciones de luz saturante. No se detectó Dtx en las células previamente adaptadas a obscuridad para los cultivos aclimatados a BL

y AL y se detectó un aumento de la concentración de este pigmento con una disminución de su pigmento precursor la Ddx desde el primer punto de muestreo que fue a los dos minutos (Fig. 8).

La reacción de epoxidación de Dtx a Ddx fue más lenta que la desepoxidación observándose una disminución mínima de Dtx en los primeros minutos en oscuridad después del periodo de exposición a la luz saturante (Fig. 8). Al final de la etapa de recuperación de 30 min en oscuridad la concentración de Ddx es similar a la medida antes de la exposición a luz saturante. Sin embargo, la Dtx no desaparece completamente a los 30 min en oscuridad. Se detectó entre un 12 y 34 % del valor máximo medido a los 30 min en luz. La disminución mayor (88 %) de este pigmento en oscuridad se presentó en células aclimatadas a AL. En las dos fases de crecimiento y tratamientos de luz existió la conversión de un pigmento a otro durante los periodos de luz pero no en oscuridad. En el transcurso de la inducción del NPQ (exposición a luz saturante) se registró una conversión mol a mol de Ddx a Dtx pero no durante el periodo de oscuridad (Fig. 8). Por ejemplo, para células aclimatadas a BL en fase estacionaria se registró una reducción máxima de  $8.67 \pm 5.47 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  de Ddx y una producción de  $8.44 \pm 0.76 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  de Dtx durante la exposición a la luz. Asimismo en el tratamiento de AL durante la fase exponencial se presentó una disminución de  $13.98 \pm 5.38 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  de Ddx y se detectaron  $14.51 \pm 0.44 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$  de Dtx durante la exposición a luz actínica. Esto indica que la Ddx que se pierde durante el periodo de exposición a la luz se convierte a Dtx por lo que la síntesis *de novo* de los pigmentos involucrados en el CX es nula o mínima en *G. catenatum*.

El análisis de la interconversión de los pigmentos del CX demostró que existió una capacidad mayor de síntesis de Dtx en células aclimatadas a AL independientemente de la fase de crecimiento de los cultivos. La síntesis de Dtx o zeaxantina, en caso de plantas superiores o del alga parda *Macrocystis pyrifera* está relacionada con el tamaño del conjunto de pigmentos del CX ( $\Sigma\text{CX}$ ) (Ocampo-Álvarez, 2013). Se analizó el tamaño de este conjunto y se encontró que sí existieron cambios durante el tratamiento de luz saturante/oscuridad para las aclimataciones de BL y AL (Fig. 9). Existieron diferencias significativas en el tamaño del  $\Sigma\text{CX}$  ( $p < 0.05$ ) entre células aclimatadas a BL y AL. El tamaño del  $\Sigma\text{CX}$  fue 18 % mayor en células aclimatadas a AL respecto a las de BL. No se observaron diferencias significativas entre las fases de crecimiento. La Ddx representó el 100 % del  $\Sigma\text{CX}$  al inicio de todos los experimentos. Por último, en ningún

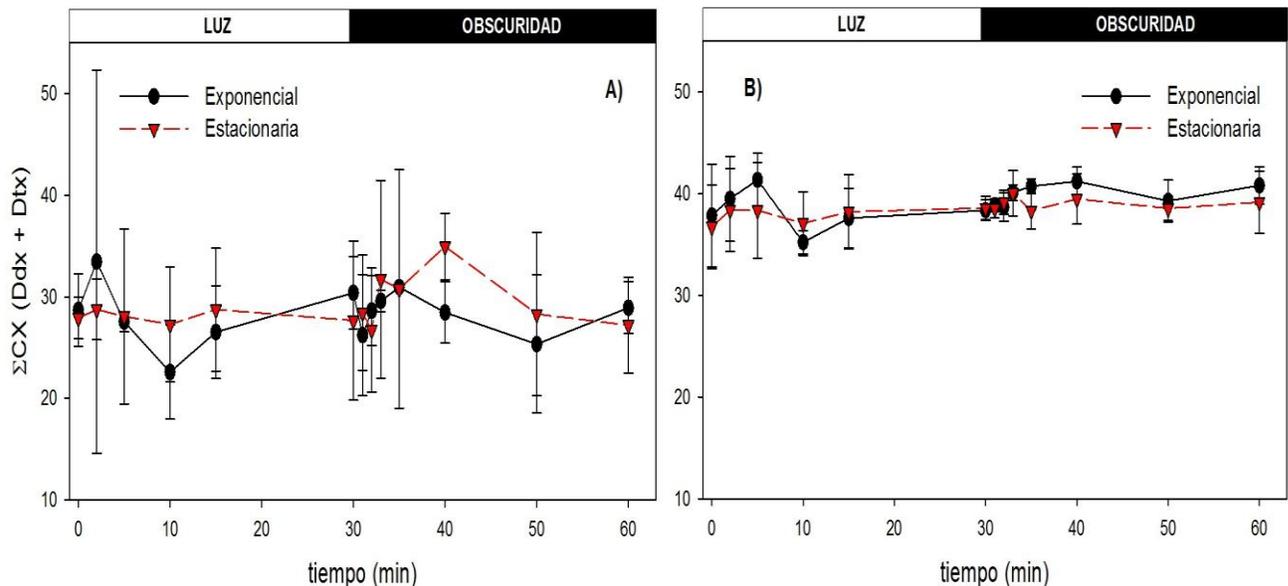
tratamiento se observó variación del  $\Sigma CX$  durante los periodos de exposición a la luz saturante y oscuridad lo que sustenta la observación de que no existió síntesis *de novo* de los pigmentos del CX. Por lo tanto, el cambio en las concentraciones de los pigmentos del CX está asociado solamente a las reacciones de desepoxidación/epoxidación.



**Figura 8.** Concentración de diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) en *Gymnodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a Baja Luz donde A) corresponde a la fase exponencial y B) a la fase estacionaria y Alta Luz donde C) corresponde a la fase exponencial y D) a la fase estacionaria. La concentración de Ddx y Dtx se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presentan en mol del pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Se analizó el cambio del grado de desepoxidación (DPS) del CX que define la capacidad de sintetizar pigmentos fotoprotectores en relación al total de los pigmentos que intervienen en el CX. En la figura 10 se observa el cambio del DPS en *G. catenatum* aclimatado a BL y AL durante las fases exponenciales y estacionarias de crecimiento expuestos a luz saturante y oscuridad. En organismos donde en CX está constituido solamente por los pigmentos Dtx y Ddx la variación del DPS estará relacionada con el cambio en la concentración de Dtx, durante el periodo de exposición a la luz actínica o en oscuridad después de este tratamiento. La variación de este pigmento ya se describió en apartados anteriores. Lo que es importante señalar es que el DPS máximo no fue tan distinto entre tratamientos de aclimatación comparado con la diferencia de síntesis de Dtx entre los mismos (Fig. 10 y Tabla 3). Por ejemplo, el tratamiento de AL presentó un DPS de 38 que significa una diferencia del 15 % entre tratamientos mientras que la diferencia de la concentración de Dtx fue del 42 %.

La disminución del DPS nos indica el aumento de la concentración de Ddx debido a la epoxidación debido a la ausencia de luz. La reducción del DPS en oscuridad a los 30 min fue entre el 65 y 88 % del valor máximo detectado con luz saturante, presentando la mayor reducción en los cultivos aclimatados a AL en fase estacionaria.



**Figura 9.** Conjunto de pigmentos del CX ( $\Sigma CX$ ) en *Gyrodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a A)  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz) y B)  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. La concentración del  $\Sigma CX$  se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presentan en mol del pigmento por  $\text{mol}^{-1}$  Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

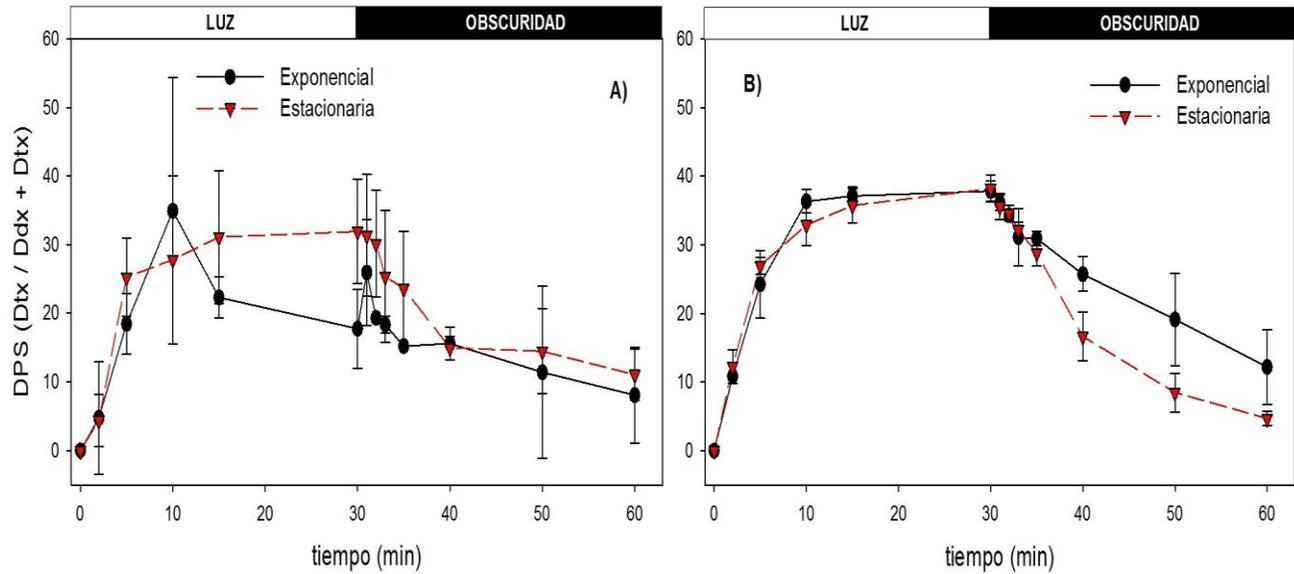


Figura 10. Cambios del grado de desepoxidación (DPS) de pigmentos del CX en *Gymnodinium catenatum* durante 30 min de exposición a luz saturante y 30 min en oscuridad en cultivos aclimatados a A)  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baja Luz) y B)  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Alta Luz) durante la fase exponencial (círculos negros) y estacionaria (triángulos rojos) de crecimiento. La concentración de los pigmentos se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Tabla 3. Concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas en *Gymnodinium catenatum* a los 30 min de exposición a la luz saturante en los distintos tratamientos de luz. La concentración de diadinoxantina (Ddx), diatoxantina (Dtx) y el conjunto de las CX ( $\Sigma\text{CX} = \text{Dtx} + \text{Ddx}$ ) se presentan en mol del pigmento por  $\text{mol}^{-1}$  Chl *a* x 100. Los tratamientos se presentan como Baja Luz ( $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , BL) y Alta Luz ( $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , AL) durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Se presenta el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

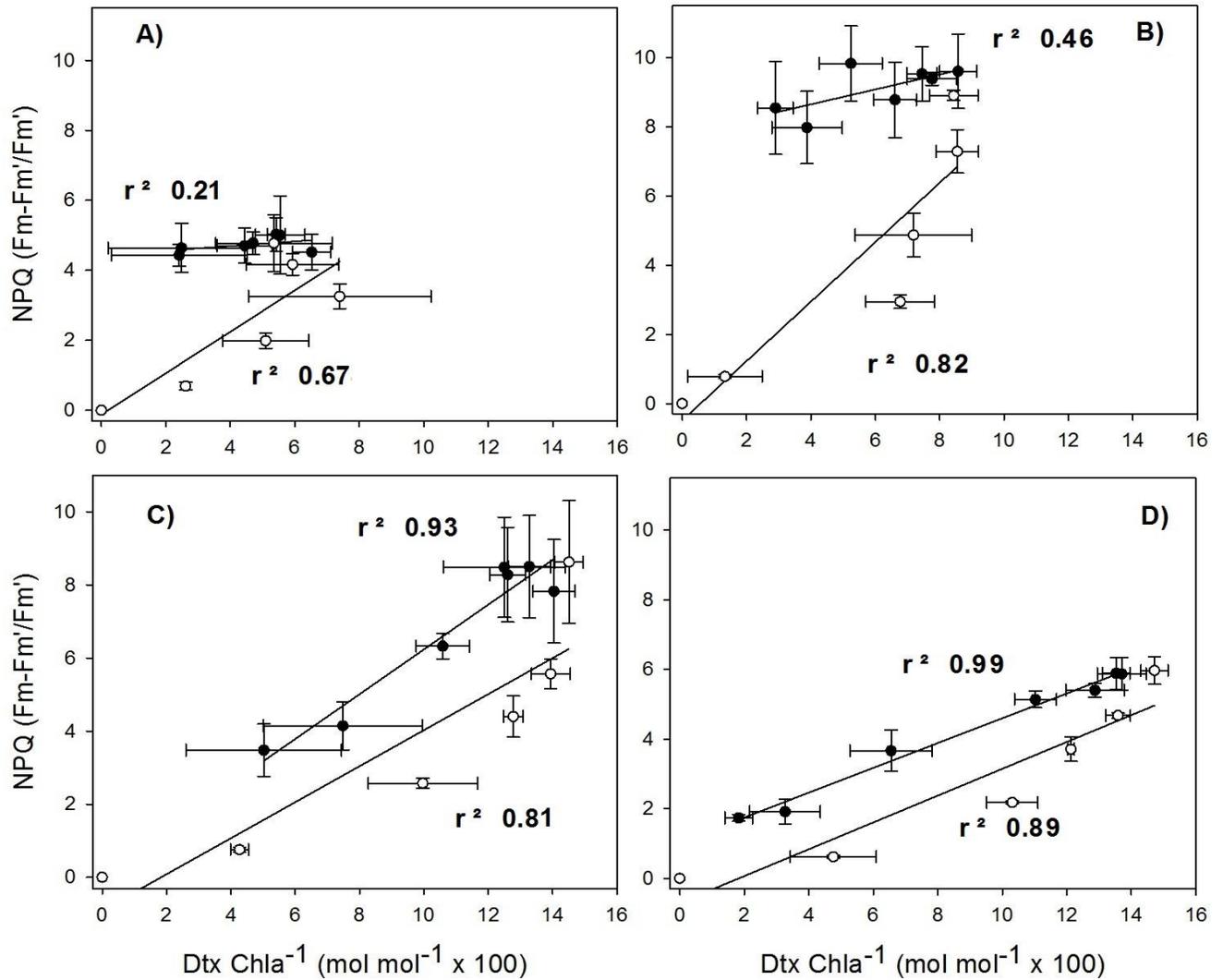
Tratamiento	Fase	Ddx	Dtx	$\Sigma\text{CX}$	DPS	NPQ
BL	Exponencial	$25.03 \pm 3.85$	$5.35 \pm 1.81$	$30.39 \pm 3.53$	$17.75 \pm 5.79$	$4.76 \pm 0.32$
	Estacionaria	$19.23 \pm 7.09$	$8.44 \pm 0.76$	$27.66 \pm 7.82$	$31.93 \pm 7.6$	$10.0 \pm 0.62$
AL	Exponencial	$23.86 \pm 1.07$	$14.51 \pm 0.44$	$38.37 \pm 1.0$	$37.83 \pm 1.44$	$9.06 \pm 0.24$
	Estacionaria	$23.87 \pm 1.46$	$14.72 \pm 0.42$	$38.59 \pm 1.18$	$38.18 \pm 1.99$	$6.36 \pm 0.30$

## 6.5 Relación NPQ y CX

Se evaluó la dependencia de la activación de la disipación térmica del exceso de energía (NPQ) sobre la síntesis de Dtx. Se realizó un análisis de regresión lineal entre NPQ y la concentración de Dtx de los resultados de inducción (células expuestas a luz saturante) y disipación (células expuestas a oscuridad) de estas variables para cada condición de cultivo (Baja y Alta Luz) y fases de crecimiento (Fig. 11). Para los diferentes tratamientos excepto para el de BL en fase estacionaria, el ajuste de la dependencia de NPQ respecto a Dtx a un modelo de ajuste lineal fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). En el tratamiento de BL en fase estacionaria la disminución de la concentración de Dtx en oscuridad no se ve acompañada con una disminución de NPQ (Fig. 11 A).

Este análisis demostró una alta dependencia de la inducción del NPQ con respecto al incremento de la concentración de Dtx durante el periodo de exposición a la luz actínica en células aclimatadas a dos condiciones de luz y en las dos fases de crecimiento poblacional ( $r^2$  de 0.67 a 0.89). En condiciones de luz saturante no toda la variabilidad del NPQ se puede explicar con los cambios de Dtx ( $r^2$  máximo de 0.89) lo que indica que otro elemento puede estar asociado en el control de este proceso. Sin embargo, el cambio de NPQ en oscuridad, después de estar expuestas las células a luz saturante, fue altamente dependiente de la desaparición de la Dtx, particularmente en las células aclimatadas a AL ( $r^2$  de 0.99, Fig. 11)

Las pendientes diferentes y coeficientes de determinación de modelo de ajuste lineal entre el NPQ y la Dtx de cada tratamiento indican que el CX en esta especie no es el único mecanismo que interviene en la disipación de calor en el FSII. Por lo tanto, no existió una relación lineal entre la formación/desaparición de la Dtx e inducción/disipación del NPQ. La relación entre estas variables depende de la aclimatación de los organismos a los tratamientos de luz.



**Figura 11.** Relación entre NPQ y la concentración de diatoxantina (Dtx) en cultivos de *Gymnodinium catenatum* aclimatados a Baja Luz donde A) corresponde a la fase exponencial y B) a la fase estacionaria, y Alta Luz donde C) corresponde a la fase exponencial y D) a la fase estacionaria. Los símbolos abiertos corresponden a células expuestas a la luz actínica y los símbolos cerrados corresponden a células mantenidas en obscuridad. La concentración de Dtx se normalizó con respecto a la concentración de Chl *a* y se presentan en mol del pigmento por mol<sup>-1</sup> Chl *a* x 100. Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

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

Para identificar la dependencia de la inducción y disipación del NPQ sobre la interconversión de los pigmentos del CX, se utilizó ditioneitol (DTT) para caracterizar el efecto de la inhibición de la enzima diadinoxantina desepoxidasa sobre la inducción del NPQ en células de *G. catenatum*. El efecto del DTT (1.5 mM) se probó solamente en células aclimatadas a AL durante la fase estacionaria ya que fue la condición en donde se presentó la inducción del NPQ más alta y existe una alta relación entre esta variable y la síntesis de Dtx (Fig. 11). En general, la incubación de células con DTT inhibe en gran parte la formación de NPQ en luz saturante (Fig. 12). Durante los primeros minutos de exposición a la luz se observa un ligero aumento en los valores del NPQ pero se incrementó por arriba de este nivel y se mantuvo constante durante el periodo de exposición a luz saturante (30 min). Al mantener a las células en obscuridad por 26 min el NPQ que se detectó en luz no disminuyó y durante los últimos 5 min de obscuridad el NPQ en células expuestas al DTT fue igual al del control (Fig. 12). El NPQ máximo detectado en células tratadas con DTT fue aproximadamente 4 veces menor ( $1.79 \pm 0.48$ ) al detectado en el control ( $6.81 \pm 0.54$ ), lo que representa una reducción del 74 %. La concentración de pigmentos del CX (datos no mostrados) en células tratadas con DTT no presentó cambios. No se observó en estas células una reducción de la diadinoxantina y un incremento en paralelo de la Dtx en luz saturante. Aunque el DTT no inhibió por completo la inducción de NPQ, si afectó de manera importante la cinética de inducción máxima de esta variable lo que indica que la inhibición de la Ddx desepoxidasa con el DTT reduce o inhibe substancialmente la disipación del exceso de energía del FSII durante la exposición a luz saturante.

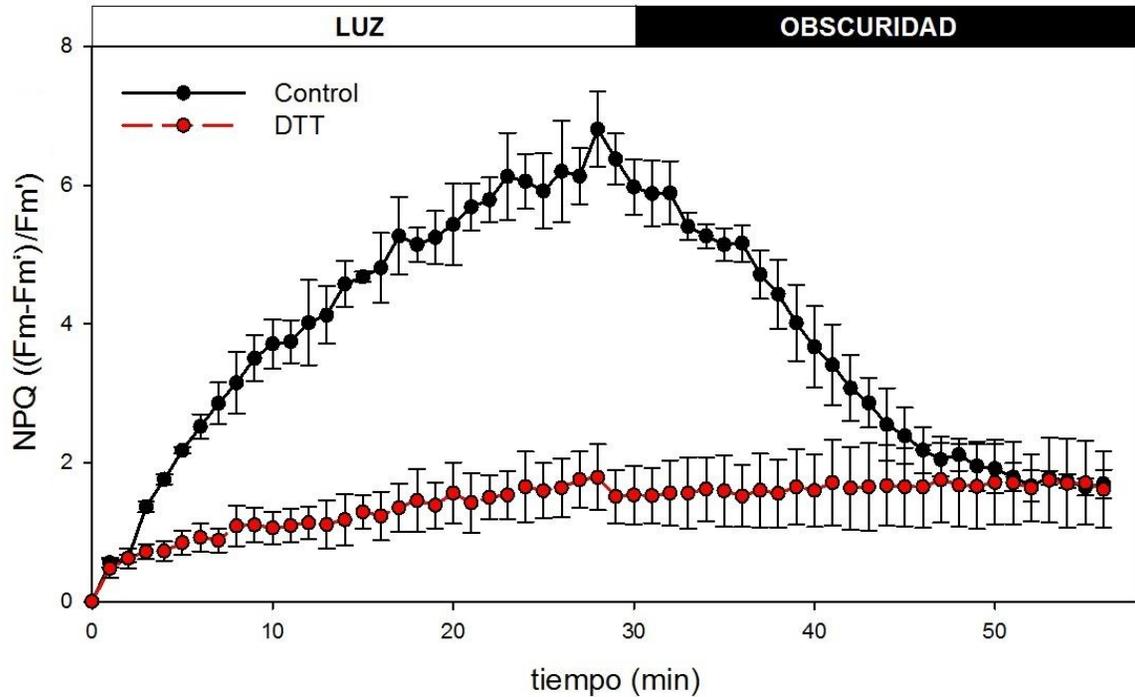


Figura 12. Inducción y disipación de NPQ en *Gymnodinium catenatum* aclimatadas a Alta Luz (células expuestas a  $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante la fase estacionaria de crecimiento (círculos negros) y células tratadas con DTT (círculos rojos). Cada punto representa el promedio de tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

### 6.7 Concentración de toxinas paralizantes (PST) en *Gymnodinium catenatum*

Se caracterizó la concentración y perfil de PST durante la fase de crecimiento exponencial en células aclimatadas a BL y AL, y solo en fase estacionaria en células expuestas a BL. Con los resultados de la concentración y perfil de toxinas de tipo paralizante se estimó la toxicidad por célula expresada en equivalentes de saxitoxina (STXeq). La toxicidad mayor se registró en células cultivadas en BL durante la fase exponencial de crecimiento con una toxicidad de  $37.91 \text{ pg STXeq célula}^{-1}$  (Tabla 4) seguida por el tratamiento de AL en fase exponencial ( $35.7 \pm 8.59 \text{ pg STXeq célula}^{-1}$ ) y por las células cultivadas a BL en fase estacionaria ( $31.62 \pm 2.98 \text{ pg STXeq célula}^{-1}$ ). Sin embargo, no existió diferencia significativa entre los tratamientos y tampoco entre las fases de crecimiento de los cultivos aclimatados a BL ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.** Toxicidad (pg STXeq cél<sup>-1</sup>) de *Gymnodinium catenatum* cultivado en dos condiciones de luz. Los tratamientos se presentan como Baja Luz (120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , BL) y Alta Luz (350  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , AL). La toxicidad se calculó de acuerdo a la concentración de toxinas detectadas y a su factor tóxico reportado por Oshima (1995).

Tratamiento	Fase	Toxicidad Total
BL	Exponencial	37.91
	Estacionaria	31.62 $\pm$ 2.98
AL	Exponencial	35.70 $\pm$ 8.59

Para el tratamiento de BL en fase exponencial el promedio se calculó solamente con dos réplicas. Para los tratamientos de BL en fase estacionaria y AL fase exponencial el promedio se calculó con tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Se detectaron 5 análogos de la saxitoxina (GTX2, GTX3, dcNEO, dcGTX3 y C1) en células aclimatadas a las diferentes condiciones de cultivo. Los análogos del grupo carbamato fueron los que presentaron una mayor concentración celular (Tabla 5). De estos, la GTX3 fue la toxina con una concentración mayor, representando más del 70 % de la PST detectadas en células de los diferentes tratamientos. Si consideramos el porcentaje molar (Tabla 6), las toxinas del grupo carbamato (GTX2 y GTX3) representaron más del 78 % del total de toxinas para los diferentes tratamientos, seguidas del grupo sulfocabamato (C1) y por último las decarbamato (dcNEO y dcGTX3) con una contribución del 8 y 2 %, respectivamente. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la concentración y el perfil de PST entre los cultivos aclimatados a BL y AL ni entre las fases de crecimiento del cultivo aclimatado a BL.

Tabla 5. Concentración individual y total de PST (pg cél<sup>-1</sup>) en células de *Gymnodinium catenatum* durante distintos tratamientos de luz y fases de crecimiento. Los tratamientos se presentan como Baja Luz (120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y Alta Luz (350  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Toxina	Baja Luz		Alta Luz
	Exponencial	Estacionaria	Exponencial
GTX2	4.91	3.31 $\pm$ 1.03	3.36 $\pm$ 0.47
GTX3	54.29	43.72 $\pm$ 8.01	49.9 $\pm$ 7.45
dcNEO	2.88	1.74 $\pm$ 0.77	0.87 $\pm$ 0.23
dcGTX3	0.12	0.05 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.03
C1	14.66	7.81 $\pm$ 5.63	6.0 $\pm$ 1.05
<b>Total</b>	<b>76.87</b>	<b>56.63 <math>\pm</math> 13.83</b>	<b>60.2 <math>\pm</math> 8.55</b>

Para el tratamiento de Baja Luz en fase exponencial el promedio se calculó solamente con dos réplicas. Para los tratamientos de Baja Luz en fase estacionaria y Alta Luz fase exponencial el promedio se calculó con tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

Tabla 6. Perfil de PST en células de *Gymnodinium catenatum* durante distintos tratamientos de luz y fases de crecimiento. Los tratamientos se presentan como Baja Luz (120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y Alta Luz (350  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La concentración de toxinas se presenta en % de la concentración total expresada en moles.

Toxina	Baja Luz		Alta Luz
	Exponencial	Estacionaria	Exponencial
GTX2	6.49	5.91	5.64
GTX3	71.71	77.93	83.72
dcNEO	5.50	4.47	2.10
dcGTX3	0.18	0.10	0.15
C1	16.11	11.59	8.38

Para el tratamiento de Baja Luz en fase exponencial el promedio se calculó solamente con dos réplicas. Para los tratamientos de Baja Luz en fase estacionaria y Alta Luz fase exponencial el promedio se calculó con tres réplicas  $\pm$  su desviación estándar.

## 7. Discusión

### 7.1 Abundancia celular y tasa de crecimiento de *Gymnodinium catenatum*

*Gymnodinium catenatum*, es un dinoflagelado atecado (desnudo) que bajo condiciones óptimas de crecimiento forma cadenas, usualmente de 4, 8 y 16 células (Taylor *et al.*, 1995). Su distribución se ha incrementado en todo el mundo, principalmente en regiones templadas y subtropicales (Hallegraeff y Fraga, 1998). Esta especie es un componente importante del fitoplancton en el Pacífico mexicano, desde el Golfo de California hasta Acapulco, Guerrero (Band-Schmidt *et al.*, 2004). Los mecanismos que favorecen el incremento poblacional y su toxicidad no se conocen, aunque su desarrollo y declive han sido asociados con la temperatura, la salinidad, la turbulencia y la concentración y el tipo de nutrientes (Fauchot *et al.*, 2005b). Recientemente se reportó la presencia de *G. catenatum* así como de toxinas de tipo paralizantes en almeja generosa (*Panopea globosa*) en el norte del Golfo de California (Murillo-Martínez, 2011) y a principios del 2015, esta región se vio afectada por un florecimiento de esta especie y se detectaron toxinas paralizantes en moluscos a un nivel de 33 veces el máximo permitido (800  $\mu\text{gSTXeq Kg}^{-1}$ ; NOM-SSA-242-2009), además de detectarse en peces colectados en contenidos estomacales de aves y delfines que se presentaron en la zona (García-Mendoza, en preparación). Este evento es el que mayor impacto ha tenido tanto en la vida silvestre como en la economía de la región donde se presentó, ya que causó la muerte de al menos 150 mamíferos marinos (delfines y lobos marinos) y más de 5,000 aves marinas (García-Mendoza, en preparación). Asimismo, se presentaron los primeros casos de intoxicación por ficotoxinas en Baja California y los más recientes reconocidos por una autoridad sanitaria en México. Se presentaron 8 casos de PSP en personas en la región de Bahía de Los Ángeles.

A pesar de que *G. catenatum* ha sido responsable de concentraciones altas de toxinas en moluscos a lo largo del Pacífico mexicano pocos son los estudios que se han enfocado en identificar los factores ambientales que favorecen el crecimiento de cepas mexicanas de esta especie. Band-Schmidt *et al.* (2004) investigaron el efecto de la temperatura, salinidad y diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento de la cepa GCCV-10 de *G. catenatum* del Golfo de California. En este trabajo se reportó que las tasas de crecimiento mayores, en medio f/2 con selenio ( $10^{-8}$  M), se obtuvieron en células cultivadas entre los 21 y 29 °C (de entre 0.18 a 0.21 día<sup>-1</sup>) con una irradiancia de 230  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Otro experimento presentó que el

crecimiento mayor (0.28 a 0.31 día<sup>-1</sup>) se obtuvo en salinidades entre 28 y 38 ups en células cultivadas a una irradiancia de 150 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y a una temperatura de 20 °C. La abundancia celular máxima reportada en este estudio fue de 1,970 cél mL<sup>-1</sup> que se presentó con una tasa de crecimiento de 0.19 día<sup>-1</sup> a una temperatura de 20 °C con una irradiancia de 150 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (12:12) en medio GSe, pudiéndose observar cadenas de hasta 4 células (Band-Schmidt *et al.*, 2004). En el presente estudio se utilizó la cepa GCCV-7 del Golfo de California cultivada bajo dos condiciones de luz. Durante el desarrollo de los cultivos las cadenas más largas detectadas fueron de 8 células, y se registró una abundancia celular máxima de 3,258 y 5,902 cél mL<sup>-1</sup> en cultivos aclimatados a BL y AL, respectivamente. Esta abundancia es mayor a lo reportado por Band-Schmidt *et al.* (2004). La tasa de crecimiento de los cultivos de BL (0.14 día<sup>-1</sup>) fue menor a lo reportado por Band-Schmidt *et al.* (2004) para las células cultivadas en medio GSe, sin embargo, la tasa de crecimiento poblacional de los cultivos en AL (0.28 día<sup>-1</sup>) fue 32 % mayor al reportado por estos autores para este medio de cultivo. Por lo tanto, la variación de la temperatura, salinidad y principalmente la irradiancia afectan de manera distinta el crecimiento celular en *G. catenatum*. En células cultivadas en medio GSe se puede observar que la irradiancia juega un papel muy importante en el crecimiento de este dinoflagelado ya que afecta directamente en su tasa de crecimiento.

Muy pocos trabajos describen el crecimiento de *G. catenatum* en respuesta a la variación de la irradiancia. Oh y Yoon (2004) aislaron una cepa de este dinoflagelado en la bahía Yeosuhae, Corea y las células fueron cultivadas en medio f/2 con selenio (10<sup>-4</sup> μM) a 18 °C. Se caracterizó su crecimiento a diferentes irradiancias (10, 35, 60, 100, 300 y 600 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Se reportó que la tasa de crecimiento y abundancia celular aumentaron en función de la irradiancia, observándose una reducción del 85 % de la abundancia celular en la irradiancia más baja (10 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) respecto a los 35 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A los 35 y 60 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> se obtuvo una abundancia de 300 y 400 cél mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Las tasas de crecimiento fueron entre 0.05 día<sup>-1</sup> para los 35 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 0.1 día<sup>-1</sup> a los 60 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las tasas de crecimiento y las abundancias celulares mayores en este estudio se registraron a los 100, 300 y 600 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (0.15 día<sup>-1</sup> y 800 cél mL<sup>-1</sup> para todos los tratamientos). Una respuesta similar se observa con una cepa de este mismo dinoflagelado pero proveniente de la bahía Hiroshima, Japón. Esta cepa se cultivó en medio f/2 adicionado con selenio (1 nM) a 17.5 °C y fue expuesta a un amplio intervalo de irradiancias (10, 20, 30, 50, 75, 100, 200, 300 y 500

$\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). El crecimiento celular se observó en irradiancias mayores a  $20 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con una tasa de crecimiento de  $0.13 \text{ día}^{-1}$  en irradiancias mayores a  $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Yamamoto *et al.*, 2002). A pesar de las diferencias en los medios y diferentes temperaturas de cultivo, la cepa de *G. catenatum* de Corea y Japón así como la del presente estudio presentan una respuesta similar en el crecimiento que está en función a la irradiancia, sin embargo, la abundancia máxima y tasa de crecimiento reportando por Oh y Yoon (2004) y Yamamoto *et al.* (2002) fueron mucho menores a lo obtenido para células aclimatadas a AL en el presente trabajo ( $5,902 \text{ cél mL}^{-1}$  y  $0.28 \text{ día}^{-1}$ ). Esta respuesta nos podría sugerir que estas cepas tienen rango óptimo de irradiancia muy específica y no toleran altas irradiancias por lo que en el medio natural podrían encontrarse en subsuperficie.

Bustillos-Guzmán *et al.* (2012) realizaron un estudio donde reportan la abundancia celular de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* mantenida a  $20 \text{ °C}$  en medio f/2 con selenio ( $10^{-8} \text{ M}$ ) y a una irradiancia de  $150 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . La abundancia celular de esta cepa se vio afectada por la variación en la proporción de nitrógeno y fósforo (N:P) en los cultivos, donde a una proporción de 24:1 (N:P;  $\mu\text{M}$ ) se presentó la mayor abundancia celular ( $5,852 \text{ cél mL}^{-1}$ ) y tasa de crecimiento ( $0.24 \text{ día}^{-1}$ ) (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012). La abundancia celular de este reporte es comparable a lo obtenido en el presente estudio para células cultivadas en AL ( $5,902 \text{ cél mL}^{-1}$ ) pero la tasa de crecimiento fue menor ( $0.28 \text{ día}^{-1}$ ). La cepa de *G. catenatum* utilizada por Bustillos-Guzmán *et al.* (2012) es la misma que se usó en el presente trabajo, por lo que la diferencia entre tasas de crecimiento puede deberse a la irradiancia y medio de cultivo utilizado.

La tasa de crecimiento y abundancia celular de las cepas de *G. catenatum* de distintas partes del mundo, presentan diferencias de acuerdo a la variación de una o más condiciones en las que fueron cultivadas (Tabla 7). De acuerdo a los diferentes estudios realizados con esta especie, la tasa de crecimiento típica para *G. catenatum* varía entre  $0.19$  a  $0.34 \text{ día}^{-1}$  (Hallegraeff *et al.*, 2012). La cepa de España ( $0.53 \text{ día}^{-1}$ ) (Bravo y Anderson, 1994) al igual que la de México ( $0.70$  a  $0.82 \text{ día}^{-1}$ ) (Band-Schmidt *et al.*, 2006) presentan las mayores tasas de crecimiento, sin embargo las abundancias celulares máximas se observan en cultivos de Australia ( $6,000 \text{ cél mL}^{-1}$ ) (Doblin *et al.*, 1999b) y México ( $3,393$  y  $5,852 \text{ cél mL}^{-1}$ ) (Band-Schmidt *et al.*, 2006; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012). Las cepas mexicanas presentan un intervalo muy amplio en su tasa de crecimiento ( $0.14$  a  $0.82 \text{ día}^{-1}$ ) (Tabla 7). La cepa GCCV-7 de *G. catenatum* utilizada en el presente estudio

presentó una tasa de crecimiento que se encuentra dentro del intervalo reportado para cepas mexicanas con 0.14 y 0.28 día<sup>-1</sup> en células aclimatadas a BL y AL, respectivamente. Asimismo, las abundancias celulares máximas reportadas en los cultivos expuestos a BL (3,258 cél mL<sup>-1</sup>) y AL (5,902 cél mL<sup>-1</sup>) fueron mayores a lo reportado en cepas de otros países (excepto Australia) (Tabla 8) y similar a lo reportado para otras cepas en México.

**Tabla 7. Tasas de crecimiento, biomasa máxima de cepas de *Gymnodinium catenatum* aisladas de diferentes partes del mundo. Se presentan las condiciones de cultivo y origen de las cepas de *Gymnodinium catenatum*. Modificado de Band-Schmidt *et al.*, 2014.**

Div. día <sup>-1</sup>	Biomasa máxima (cél mL <sup>-1</sup> )	Condiciones de cultivo	Origen de la cepa	Referencia
0.53	---	f/2, 24 °C	Ría de Vigo, España	Bravo y Anderson, 1994
0.19 - 0.25	10 - 300	GSe (10 <sup>-9</sup> M)	Cepa australiana GCDE08	Doblin <i>et al.</i> , 1999a
0.17 - 0.32	200 - 6000	GSe con diferentes concentraciones de Se	Cepa australiana GCDE08	Doblin <i>et al.</i> , 1999b
0.28 - 0.34	116 - 600	GSe (10 <sup>-9</sup> M), 18 °C, 28 ups, 180 µmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	Estuarios Huon y Derwent, Tasmania	Doblin <i>et al.</i> , 2000
0.24	409		Bahía Sensaki, Japón	
0.24	600		Ría de Vigo, España	
0.31	---	f/2+Se (1 nM), 25 °C, 30 ups	Bahía Hiroshima, Japón	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
0.25 - 0.34	---	f/2+Se, 18 y 25 °C, 30 ups, 100 µmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	Bahía Inokushi, Japón	Oh <i>et al.</i> , 2010
0.14 - 0.34	400 - 2000	GSe y f/2+Se con diferentes concentraciones de Se y salinidades	Pacífico mexicano	Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2004
0.70 - 0.82	1090 - 3393	GSe, 20 °C, 35 ups	Pacífico mexicano	Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2006
0.2 - 0.24	2552 - 5852	f/2+Se, diferentes proporciones de N:P (5.4 - 74.3)	Bahía Concepción, México	Bustillos-Guzmán <i>et al.</i> , 2012
0.14	3258	GSe, 21 °C, 120 µmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	Bahía Concepción, México	Presente estudio
0.28	5902	GSe, 21 °C, 350 µmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12		

## 7.2 Inducción y disipación de NPQ, concentración de pigmentos e interconversión de pigmentos del CX en *Gymnodinium catenatum*

Los dinoflagelados que forman florecimientos se acumulan principalmente en la superficie o subsuperficialmente en la columna de agua (Fauchot *et al.*, 2005b) donde pueden estar expuestos a una alta radiación solar. La migración vertical es una estrategia clave usada por los dinoflagelados para optimizar la captación de luz y nutrientes (Fauchot *et al.*, 2005a) y también pueden utilizar el ciclo de las xantofilas (CX) para disipar el exceso de energía de la luz en forma de calor y aclimatarse rápidamente a los cambios de la intensidad de la luz (Demers *et al.*, 1991). Sin embargo no existe mucha información sobre este importante mecanismo de fotoprotección en dinoflagelados y la importancia del CX en su control.

El aumento en los valores de NPQ en células de *G. catenatum* aclimatadas a BL y AL indican que los mecanismos de fotoprotección como la disipación de calor por medio de la activación del CX pueden estar involucrados en la regulación de la actividad fotosintética en este dinoflagelado. Se observó un incremento significativo del NPQ al exponer a los dinoflagelados a la luz actínica tanto en células aclimatadas a BL y AL. El tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) de formación del NPQ estimado para los distintos tratamientos de luz fue de entre los 7 y 11 min lo que representa una inducción lenta de esta variable en comparación con otros organismos. Por ejemplo, en la planta *Arabidopsis thaliana* la inducción del NPQ alcanza valores cercanos al máximo después de 2 min en luz saturante (Niyogi *et al.*, 2005). En la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* se ha reportado que los valores máximos de NPQ se detectan durante los primeros segundos de iluminación (Lavaud *et al.*, 2002). Sin embargo, la cinética y el  $t_{1/2}$  de inducción del NPQ que se detectó en las células de *G. catenatum* es similar a lo reportado en dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima* ( $t_{1/2}$  de 10 min) donde se observó que los valores del NPQ no aumentan inmediatamente al ser expuestos a luz saturante (Lombardo-Cifuentes, 2011).

Se ha reportado que organismos aclimatados a AL poseen un contenido menor de clorofila y de pigmentos accesorios que aquellos que han crecido en condiciones de baja luz (Falkowski y La Roche, 1991). Esta respuesta típica de aclimatación se pudo observar para *G. catenatum* al comparar los resultados del contenido de Chl *a* y peridina en células aclimatadas a BL y AL. Las células de *G. catenatum* cultivadas a BL presentan mayor concentración de Chl *a* (10 % más) que las mantenidas a AL, este patrón se observó durante las dos fases de crecimiento.

Asimismo, la concentración de peridina fue 20 % más alta en BL que en los tratamientos de AL. Esta disminución del contenido de pigmentos constitutivos es consistente con el decremento en el tamaño y número de centros de reacción del FSI y FSII, siendo una estrategia de protección del aparato fotosintético bajo condiciones de luz saturante (Suggett *et al.*, 2004). La concentración del conjunto de pigmentos del CX ( $\Sigma$ CX) que es la suma de diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx) fue significativamente mayor (18 %) en las células aclimatadas a AL en comparación a las mantenidas a BL. El aumento en el tamaño  $\Sigma$ CX en *G. catenatum* representa una respuesta de aclimatación a AL por lo que posiblemente la contribución de estos pigmentos en la disipación del exceso de energía (NPQ) en estas condiciones es mayor. Diferentes estudios en cromofitas han demostrado que el  $\Sigma$ CX fue alto en células cultivadas a altas irradiancias comparadas con aquellas cultivadas a bajas irradiancias. Demers *et al.*, (1991) demostraron que células de *Alexandrium excavatum* aclimatadas a altas irradiancias incrementan el contenido de pigmentos del CX durante exposiciones a luz saturante como mecanismo de fotoprotección. Castañeda-Vega (2014) reportó que la concentración de fucoxantina y Chl *c* en frondas del alga parda *Macrocystis pyrifera* de 10 m de profundidad es mayor en comparación con las de superficie y que el  $\Sigma$ CX disminuyó un 70 % en frondas de mayor profundidad. Lohr y Wilhelm (1999) reportaron en 6 especies de microalgas una mayor concentración del  $\Sigma$ CX en cultivos aclimatados a AL. Fujiki *et al.* (2003) reportaron, para muestras de bahía Sagami, Japón, que la regulación del  $\Sigma$ CX depende de la irradiancia, presentándose un mayor tamaño a irradiancias altas y menor cuando la irradiancia disminuye y la biomasa del fitoplancton es baja. Los resultados del presente estudio coinciden con lo anterior, donde se encontraron diferencias del  $\Sigma$ CX entre condiciones de luz, encontrándose los valores menores en cultivos aclimatados a BL y durante la menor abundancia celular, esto, durante la fase exponencial de crecimiento.

Se esperaba que un  $\Sigma$ CX mayor brindaría una respuesta fotoprotectora más alta y un NPQ mayor, sin embargo se observó que las células mantenidas a BL de la fase estacionaria presentaron el NPQ más alto de las cuatro condiciones monitoreadas. El NPQ no está solamente relacionado con la disipación de calor en el FSII. La disminución del tamaño de la antena y la fotoinhibición del FSII reducen la emisión de fluorescencia de este fotosistema (Lavaud *et al.*, 2002), lo que se refleja como un aumento en el NPQ. Estos dos procesos pudieron influir de manera importante en la inducción y disipación del NPQ en cultivos aclimatados a BL. Por ejemplo, la recuperación lenta que se observa en estos cultivos puede estar relacionada con el

daño y activación del proceso de reparación del FSII. Esto se corrobora con la lenta recuperación de la eficiencia máxima del FSII detectada en las células aclimatadas a BL. Por lo tanto, existen diferencias fisiológicas entre aclimataciones presentando las cultivadas a AL una mayor capacidad de fotoprotección comparada con los organismos aclimatados a BL.

La cinética de formación y disipación del NPQ esté relacionada con la activación y desactivación de los componentes involucrados en este proceso. Durante la exposición a luz saturante se registró un aumento del NPQ en todos los tratamientos, los valores máximos de esta variable presentaron diferencias significativas entre fases de crecimiento. El tratamiento en BL durante la fase estacionaria presenta el valor más alto de NPQ ( $10 \pm 0.62$ ) siendo dos veces mayor que lo registrado durante la fase exponencial ( $4.76 \pm 0.32$ ), sin embargo el tratamiento de AL en fase exponencial presenta un NPQ 30 % mayor que en fase estacionaria. Durante los periodos de exposición a luz saturante se llevó a cabo una conversión mol a mol de Dtx mediante la desepoxidación de Ddx. Las células aclimatadas a AL presentan una mayor concentración de Dtx y la capacidad de fotoprotección en células aclimatadas a esta condición estuvo relacionada con la síntesis de este pigmento. En oscuridad el NPQ presenta una disminución de esta variable pero no se observó una caída inmediata en los valores al finalizar el tratamiento de luz por lo que la disipación del NPQ tiene asimismo una cinética lenta. En ninguno de los tratamientos se observó la disipación total del NPQ después de 24 min en oscuridad. Todos los tratamientos mantuvieron un NPQ remanente del 93 y 85 % para la fase exponencial y estacionaria de la aclimatación a BL, respectivamente. En contraste, en el tratamiento de AL el NPQ remanente fue de 38 % durante la fase exponencial y 27 % en la estacionaria. Al igual que la inducción del NPQ en luz, la actividad enzimática del CX es responsable de la cinética lenta de disipación del NPQ en oscuridad (Horton y Ruban, 2005). Durante el periodo de oscuridad se llevó a cabo la epoxidación de los pigmentos fotoprotectores, observándose claramente una disminución de 55 a 88 % de la concentración de Dtx después de 24 min en oscuridad en todos los tratamientos. La concentración de Ddx fue similar a la medida antes de la exposición a luz saturante. De manera análoga, los dinoflagelados simbioses del género *Symbiodinium* registraron un NPQ remanente del 45 % después de 15 min en oscuridad y presentó una disminución del 44 % de la concentración de Dtx en los dinoflagelados durante este periodo (Lombardo-Cifuentes, 2011).

En el presente trabajo se observó que la formación de NPQ depende de la disminución de Ddx y la síntesis de Dtx en todos los tratamientos durante la exposición a luz saturante. Sin embargo, el cambio de NPQ así como el cambio de Dtx durante el periodo de luz no presenta una relación lineal simple, pudiéndose observar que el cambio en la producción de Dtx es menor al final de este periodo mientras que la formación de NPQ sigue aumentando. Durante este periodo se estimó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.67 y 0.89 lo que indica una dependencia alta de la formación del NPQ y en la síntesis de Dtx donde la mayor dependencia se presenta en los cultivos aclimatados a AL y durante la fase estacionaria de crecimiento a BL. La asociación entre el CX y el NPQ se ha reportado para varios organismos fotosintéticos, por ejemplo para la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* (Lavaud *et al.*, 2002), la alga parda *Macrocystis pyrifera* (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007) y los dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima* (Lombardo-Cifuentes, 2011) se ha reportado que el mecanismo de control del NPQ es dependiente del CX.

Los datos de la relación lineal entre el NPQ y la concentración del Dtx durante el periodo de obscuridad muestran valores de  $r^2$  bajos (0.21 y 0.46) en el tratamiento de BL y mayores en AL (0.93 y 0.99) durante las distintas fases de crecimiento. Esta variabilidad en la relación entre el NPQ y Dtx en obscuridad puede estar asociada a que existen otros procesos que estén afectando la emisión de fluorescencia del FSII. Este proceso debe tener una cinética de disipación lenta teniendo como resultado un alto NPQ remanente en obscuridad. En ningún tratamiento se registró la recuperación de los valores de fluorescencia basal en condiciones de obscuridad después de ser expuestos a luz saturante, lo cual puede indicar la disminución del tamaño de la antena que afecta a su vez los valores de NPQ y su relación con el CX.

Una característica importante que define condiciones fisiológicas diferentes entre aclimataciones, es que la cinética de recuperación del  $F_v/F_m$  en células aclimatadas a BL es diferente a la de células aclimatadas a AL. Esta diferencia está asociada a una mayor expresión de los mecanismos de fotoprotección en células aclimatadas a AL. Por lo tanto, la recuperación lenta de la  $F_v/F_m$  está relacionada con procesos de disipación lenta como el daño y reparación del FSII a través de la síntesis *de novo* de la proteína D1 (Osmond, 1994). Hanelt (1998) reportó que en organismos aclimatados a altas intensidades de luz (macrofitas de la zona intermareal),

presentaron una recuperación más rápida de la eficiencia fotosintética en el periodo de luz tenue que algas aclimatadas a una menor intensidad de luz (provenientes de aguas más profundas).

Otra evidencia de que el NPQ en *G. catenatum* depende de la actividad del CX es que el DTT inhibió la mayor parte de la inducción de este proceso. El DTT redujo en un 74 % del NPQ detectado en células no expuestas a este inhibidor y, por otro lado, no se detectó la síntesis de Dtx al inhibirse la desepoxidación de Ddx. El NPQ que se presentó aún en la ausencia de la síntesis de Dtx sugiere que existe otro mecanismo que afecta al FSII independiente de la disipación térmica. En plantas superiores y algunos grupos algales se han descrito otros mecanismos que afectan la cinética de inducción del NPQ, como la separación reversible del complejo de la antena principal (LHCII), la que se denomina estado de transición. Su función es permitir a los organismos responder a cambios en las condiciones de luz mediante la asociación/disociación del complejo de la antena principal (LHCII) logrando balancear la capacidad de absorción de luz de los FSII y FSI (Baroli y Melis, 1998). Se ha sugerido un proceso en dinoflagelados pero no se ha caracterizado el funcionamiento ni el control molecular de este mecanismo para este grupo.

Algunos carotenoides juegan un papel importante en la prevención del daño fotooxidativo del aparato fotosintético en plantas bajo condiciones de alta irradiancia. En los dinoflagelados la Ddx y la Dtx funcionan como pigmentos fotoprotectores. Cuando estas microalgas son expuestas a altas irradiancias parte del exceso de energía es disipada por la interconversión de Ddx a Dtx, conocido esto como ciclo de las xantofilas (XC). Sin embargo, en dinoflagelados se conoce poco sobre la cinética de inducción del NPQ y la interconversión de los pigmentos involucrados en el CX y si estos dos procesos están relacionados entre sí.

Algunas especies de diatomeas presentan, además de la conversión de Ddx a Dtx, un ciclo homólogo que consiste en la síntesis de zeaxantina mediante la desepoxidación de violaxantina. Estos mecanismos pueden llegar a disipar hasta el 75 % de los fotones absorbidos (Niyogi, 1999). En algunas diatomeas (Grounueva *et al.*, 2008) y plantas superiores (Niyogi *et al.*, 2005), la inducción del NPQ alcanza valores cercanos al máximo después de los primeros minutos de iluminación. Este mecanismo de disipación que actúa de manera muy rápida se asocia a la protonación de proteínas del FSII ocasionando cambios alostéricos en los complejos colectores de luz. El presente trabajo sugiere que este componente rápido de control del NPQ no está

presente en *G. catenatum*, lo que indica que CX es el principal mecanismo asociado al NPQ. Los valores de NPQ en el dinoflagelado *G. catenatum*, superan a los valores máximos reportados para dinoflagelados simbioses de coral (Warner y Berry-Lowe, 2006) y simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima* (Lombardo-Cifuentes, 2011).

Las condiciones lumínicas a las que se encuentran los organismos planctónicos son diferentes a las que están expuestos estos organismos simbioses, por lo cual es probable que la respuesta fisiológica al exceso de luz sea regulada de una manera distinta. El presente estudio demuestra que *G. catenatum* activa rápidamente el CX en respuesta a una condición de luz saturante, registrándose la conversión del pigmento Ddx a Dtx desde los primeros 2 min de exposición a la luz y aumentando casi tres veces la concentración de Dtx en cultivos aclimatados a AL en comparación a los de BL. La capacidad de síntesis del pigmento fotoprotector Dtx estuvo asociada al tamaño del  $\Sigma$ CX. Este conjunto fue 38 % mayor en células cultivadas a AL que en las aclimatadas a BL. Asimismo,  $\Sigma$ CX permaneció constante durante y después de la exposición a la luz actínica por lo que no existió síntesis *de novo* de pigmentos del CX. El  $\Sigma$ CX es una clave importante para disminuir el daño fotooxidativo. El aumento del grado de desepoxidación (DPS) de pigmentos del CX en células de *G. catenatum* durante la exposición a la luz actínica nos indica una respuesta fotoprotectora, lo que concuerda con Demers *et al.*, (1991), quienes reportan para células de *Alexandrium excavatum* aclimatadas a AL un incremento del DPS durante exposiciones a luz saturante. La epoxidación de pigmentos en condiciones de obscuridad en células de *G. catenatum* aclimatadas a distintas condiciones de luz, no corresponde a lo reportado para algunas especies de diatomeas que presentan el CX con Dtx. En ellas se ha reportado una conversión total de Dtx a Ddx entre 2 a 5 min en condiciones de obscuridad (Goss *et al.*, 2006). Esta rápida conversión está asociada a una rápida disipación del NPQ debido a una alta actividad de la enzima epoxidasa, la cual presenta una alta afinidad por el sustrato Dtx (Goss y Jakob, 2010). La epoxidación incompleta de *G. catenatum* al finalizar el periodo de obscuridad nos indica, que la actividad enzimática es diferente entre diatomeas y este dinoflagelado.

### **7.3 Concentración de toxinas paralizantes (PST) en *Gymnodinium catenatum***

Las toxinas paralizantes (PST) son producidas principalmente por *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* y especies del género *Alexandrium*, y también se le asocia a cierto grupo de cianobacterias. *G. catenatum* es el único dinoflagelado del orden de los

gymnodinales que produce saxitoxina y está relacionado con la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), siendo esta una de las intoxicaciones más comunes y peligrosas de todo el mundo, que ha provocado numerosas muertes, y algunas de las especies causantes se han dispersado a lo largo del mundo (Hallegraeff *et al.*, 2003).

La composición de toxinas puede variar entre especies y cepas de microalgas asociada a los factores ambientales, su ubicación geográfica y como respuesta a diferentes condiciones de cultivo (Anderson *et al.*, 1994). En el presente trabajo se pudo identificar 5 análogos de PST (GTX2, GTX3, dcNEO, dcGTX3 y C1). Este perfil de toxinas es distinto a lo reportado en cepas de *G. catenatum* de otros países. La cepa utilizada (GCCV-7) produjo dcNEO que presenta un potencial tóxico menor a la saxitoxina (0.40). Este análogo no se ha reportado para otras cepas aisladas de otras partes del mundo ni para esta cepa en estudios anteriores. Probablemente se trate de un artefacto asociado al proceso de extracción por que se tiene que validar la presencia de esta molécula en la cepa utilizada. Otros análogos de la saxitoxina como la C1 y la GTX3 se han reportado en otras cepas y fueron las que se presentaron con una mayor concentración en este estudio con un 16 y 84 % del total detectado, respectivamente. Las toxinas del grupo carbamato son consideradas como las PST que presentan el potencial tóxico mayor (Oshima, 1995). Cepas de Singapur presentan un perfil de toxinas dominado por el grupo carbamato con altos valores de GTX1 y GTX4, y menores cantidades de GTX2-3, neoSTX y STX (Holmes *et al.*, 2002). Cepas de Australia presentan una alta concentración de toxinas C1-4 y bajas proporciones de B1-2, GTX2-3, dcGTX2-3, dcSTX, STX y doSTX. Las cepas de España y Portugal producen C5-6 con altas proporciones de B1-2. Las cepas de Uruguay y Hong Kong contienen C1-6, dcGTX2-3, y bajas proporciones de GTX-3 y B1-2 (Negri *et al.*, 2001). En cepas de Brasil solo se detectaron las toxinas C (de Olviera-Proenza *et al.*, 2001). Las cepas mexicanas provenientes de Bahía Concepción (BCO), B.C.S., presentaron mayormente dcSTX, dcGTX2-3, C1-2 (característico de esta cepa), con bajas proporciones de neoSTX, GTX2-3 y B2 (Band-Schmidt *et al.*, 2005). Las diferencias en el perfil de toxinas de la cepa utilizada es el presente estudio en comparación a otras cepas se le puede asociar principalmente a las condiciones de luz a las que fueron mantenidos y al medio de cultivo utilizado.

La composición de toxinas no es una propiedad conservativa en *G. catenatum*, sin embargo se ha demostrado una consistencia en el perfil de toxinas dentro de una población (Tabla

8). En el presente estudio se utilizó la cepa (GCCV-7) originaria de BCO y durante las fases de crecimiento, exponencial y estacionaria, no presentó cambios en el perfil de toxinas. Asimismo, los cultivos no presentaron una variación en la toxicidad tan amplia entre fases de crecimiento, registrando valores entre 31.62 y 37.91 pg STXeq cél<sup>-1</sup>. Band-Schmidt *et al.* (2005) describieron el perfil de toxinas de 16 cepas de *G. catenatum* aisladas de BCO (incluida la del presente estudio), siendo las toxinas dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2 las que siempre estuvieron presentes en todas las cepas durante los 22 días de crecimiento, mientras que las toxinas neoSTX, GTX2, GTX3 y B2 fueron producidas en menor cantidad o no fue posible detectarlas en todas las cepas al final del experimento, lo que sugiere que el perfil de toxinas varía entre fases de crecimiento y entre cepas. La toxicidad reportada para las diferentes cepas que se utilizaron en el trabajo de Band-Schmidt *et al.* (2005) varió entre los 2 y 63 pg STXeq cél<sup>-1</sup>, con una toxicidad promedio de  $28.0 \pm 18.0$  pg STXeq cél<sup>-1</sup>. En base a la concentración molar, Band-Schmidt *et al.* (2005) reportan que las toxinas C1, dcSTX y dcGTX2 representaron más de 20 % del total, mientras que GTX2, GTX3 y B2 fueron las menos abundantes con menos del 2 %. En el presente estudio se reporta que los valores de toxicidad son muy cercanos al valor promedio reportado para las 16 cepas de BCO caracterizadas por Band-Schmidt *et al.* (2005) y que las toxinas GTX3 y C1 representaron más del 87 % de la concentración total, y las GTX2, dcNEO, dcGTX3 constituyeron entre el 7 y 12 %.

Gárate-Lizárraga *et al.* (2005) identificaron perfiles de PST de diferentes cepas de *G. catenatum* aisladas de tres localidades del Golfo de California (Bahía Concepción, La Paz y Mazatlán), las cuales presentaron principalmente dcSTX, dcGTX2-3, B1-2, C2 y neoSTX, con una concentración de toxinas de 36.1 a 184 pg cél<sup>-1</sup> y una toxicidad de entre 9.5 a 24 pg STXeq cél<sup>-1</sup>. Las cepas que presentaron una mayor concentración de PST fueron las de BCO mientras que las de Mazatlán fueron las más tóxicas con 129.3 pg cél<sup>-1</sup> y 24 pg STXeq cél<sup>-1</sup>, respectivamente. En el presente trabajo se reportó una concentración de PST de 56.63 a 76.87 pg cél<sup>-1</sup> y una toxicidad de entre 31.62 y 37.91 pg STXeq cél<sup>-1</sup>, por lo que la cepa estudiada en el presente trabajo produjo una menor concentración de PST que lo reportado para las de BCO por Gárate-Lizárraga *et al.* (2005), pero fue más tóxica en comparación con las de Mazatlán.

**Tabla 8. Perfil de toxinas paralizantes y toxicidad por célula (pg STXeq cél<sup>-1</sup>) en cepas de *Gymnodinium catenatum* aisladas de diferentes regiones del Golfo de California.**

Cepa	Origen	Condiciones de cultivo	Toxicidad	Perfil de toxinas	Referencia
GCCV-7	BCO	f/2+Se, 20 °C, 150 μmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	35	neoSTX, GTX2, GTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B2, C1, C2	Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2005
GCCV-14	BCO		63		
GCCV-18	BCO		51		
GCPV-2	BAPAZ	GSe, 20 °C, 150 μmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	23.29	neoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2, C2	Gárate-Lizárraga <i>et al.</i> , 2005
GCCV-2	BCO		16.63	neoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, C2	
GCMV-1	BAMAZ		23.96	STX, neoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2, C2	
GCCV-7	BCO	f/2+Se, diferentes proporciones de N:P, 20 °C, 150 μmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	31	STX, neoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2, C1, C3	Bustillos-Guzmán <i>et al.</i> , 2012
GCCV-7 *	BCO	GSe, 21 °C, 120* y 350** μmol fotón m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> , 12:12	37.91	GTX2, GTX3, dcNeo, dcGTX3, C1	Presente estudio
GCCV-7 **	BCO		35.7		

BCO= Bahía Concepción, BPAZ= bahía de La Paz, BAMAZ= bahía de Mazatlán. \* Células aclimatas a baja luz, \*\* Células aclimatadas a alta luz.

Bustillos-Guzmán *et al.* (2012) consideraron que los cambios en la proporción de nitrógeno y fósforo (N:P) podrían afectar la producción de toxinas debido a que la saxitoxina y análogos son moléculas ricas en nitrógeno y constituyen entre el 5 y 10 % del total del nitrógeno celular en *G. catenatum*. Sin embargo, no registraron cambios en el perfil de PST pero si en la proporción de ellas, lográndose detectar 9 análogos de la saxitoxina: STX, neoSTX, dcSTX, dcGTX2-3, B1-2 y C1-3. En algunos tratamientos se observó un incremento en la toxicidad total aumentando de 21.7 a 31 pg STXeq cél<sup>-1</sup> al final del experimento, lo que indica que la dinámica

celular de las toxinas está relacionada con los cambios fisiológicos de las células durante las diferentes fases de crecimiento. En nuestros experimentos la producción y perfil de PST no se vieron afectados con las fases de crecimiento ya que no presentaron diferencias significativas durante las fases de crecimiento.

La toxicidad por célula detectada en el presente estudio es mayor que las registradas para poblaciones del medio natural. Quijano-Scheggia *et al.* (2012) reportaron en promedio entre 1.2 y 10.9 pg STX<sub>eq</sub> cél<sup>-1</sup> en un florecimiento de *G. catenatum* que ocurrió en las costas de Manzanillo, Colima. Probablemente la toxicidad de *G. catenatum* aumenta en condiciones de cultivo, lo que es diferente para otras especies productoras de PST ya que las del género *Alexandrium* se ha reportado que son menos tóxicas en condiciones de cultivo que en medio natural (Cembella *et al.*, 1990). Esto indica que la síntesis de toxinas es controlada de forma diferente para cada especie y se puede ver afectada por las condiciones ambientales.

En otras especies tóxicas como las del género *Pseudonitzschia* se ha reconocido que la producción de ácido domoico (AD) depende de la condición fisiológica de las células, por lo que células estresadas producen más AD. El mayor contenido de esta toxina se ha reportado durante la fase estacionaria (Bates y Trainer 2006) y cultivadas a altas irradiancias (Cusack *et al.*, 2002). Santiago-Morales (2011) reportó un comportamiento similar en cultivos de *Pseudonitzschia australis*, reportando una mayor concentración de AD en cultivos aclimatados a alta luz y durante la fase estacionaria de crecimiento. Al contrario de estas especies que producen AD no es claro que la producción de PST en *G. catenatum* esté relacionada a una condición de estrés. En el presente estudio *G. catenatum* no presentó cambio alguno en la producción de PST durante su crecimiento en las distintas aclimataciones. Sin embargo, se ha documentado que esta especie si presenta un aumento al final de la fase de crecimiento exponencial (Band-Schmidt *et al.*, 2006; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012). El efecto de la luz en la producción de AD ha sido asociado con la necesidad de energía fotosintética para la biosíntesis de la toxina (Bates, 1998). Por esto, se ha hipotetizado que la energía para el crecimiento celular y mantenimiento compite con la requerida para la producción de AD (Pan *et al.*, 1998). Por lo tanto, podemos sugerir que nuestros cultivos aclimatados a BL y AL utilizaron la mayor parte de la energía para el crecimiento celular y no para la producción de PST.

## 8. Conclusiones

- El crecimiento poblacional de *Gymnodinium catenatum* depende de la irradiancia de cultivo presentándose una tasa de crecimiento y abundancia celular máxima mayor en cultivos expuestos a Alta Luz ( $350 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en comparación a cultivos mantenidos en Baja Luz ( $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).
- Las células de *Gymnodinium catenatum* presentaron una inducción y disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ) lenta en comparación con otras especies de plantas superiores y diatomeas, pero similar a lo reportado para otros dinoflagelados.
- Las células de *Gymnodinium catenatum* presentaron una respuesta típica de aclimatación a Baja y Alta Luz. Las células aclimatadas a Baja Luz presentaron una concentración de Chl *a* y peridina mayor que las aclimatadas a Alta Luz y estas a su vez, presentaron una concentración 18 % mayor de pigmentos fotoprotectores (diadinoxantina y diatoxantina) asimismo, el tamaño del conjunto de pigmentos ciclo de las xantofilas fue significativamente mayor en este tratamiento de luz.
- Los cultivos de *Gymnodinium catenatum* mantenidos a Alta Luz presentan una mayor capacidad de fotoprotección en comparación con los de Baja Luz.
- El bloqueo de la desepoxidación del ciclo de las xantofilas con el inhibidor DTT nos sugiere que el análisis de la cinética de formación/disipación del NPQ, la relación entre esta respuesta y la concentración de diatoxantina además de la caracterización de la inducción del NPQ en presencia del inhibidor de la enzima diadinoxantina desepoxidasa, indican que este mecanismo de fotoprotección depende mayormente de la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, sin embargo, existe otro mecanismo que afecta al FSII que es independiente de este proceso.

- No se encontraron diferencias en la concentración y el perfil de toxinas de tipo paralizante entre los cultivos aclimatados a Baja y Alta Luz ni entre las fases de crecimiento.

## Lista de referencias

- Almazán-Becerril, A. y García-Mendoza, E. (2008). Photosystem II maximum efficiency of charge separation of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific (ENTP) off Mexico: A nutrient stress diagnostic tool? *Ciencias Marinas*. 34(1): 29-43.
- Andersson, B. y Barber, J. (1996). Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. En: N. Baker (Ed.). *Photosynthesis and the Environment*. (pp. 101-121). Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Doucette, G. J., Gallager, J. C. y Balech, E. (1994). Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Marine Biology* 120(1): 546-478.
- Balaguer, L., Pugnaire, F., Martínez, E., Armas, C., Valladares, F. y Manrique, E. (2002). Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima*. *Plant and Soil* 240(2): 343-352.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J., Gárate-Lizárraga, I., Lechuga-Devéze, C. H., Reinhard, K. y Luckas, B. (2005). Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G. B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae* 4(1): 21-31.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., Hernández-Sandoval, F. E., Núñez-Vázquez, E. y López-Cortés, D. J. (2014). Effect of temperatura on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Pacific coast of México. *Toxicon* 90: 199-212.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. y Hernández-Sandoval, F. E. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21(3): 381-413.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J., Morquecho, L., Gárate-Lizárraga, I., Alonso-Rodríguez, R., Reyes-Salinas, A., Erler, K. y Luckas, B. (2006). Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology* 42(4): 757-768.
- Band-Schmidt, C. J., Morquecho, L., Lechuga-Devéze, C. y Anderson D. M. (2004). Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California. *Journal of Plankton Research* 26(12): 1459-1470.
- Baroli, I. y Melis, A. (1998). Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205(2): 288-96.

- Bates, S. S., Garrison, D. L. y Horner, R. A. (1998). Bloom dynamics and physiology of Domoic-Acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. En: D. M. Anderson, A. D. Cembella y G. M. Hallegraeff (Eds.). (pp. 267-292). Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bates, S. S. y Trainer, V. L. (2006). The Ecology of Harmful Diatoms. En: E. Granéli y J. T. Turners (Eds.). (pp. 81-93). Ecology of Harmful Algae. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Blankenship, R. E. (2002). Molecular mechanisms of photosynthesis. (202 p.). Blackwell Science, Oxford, UK.
- Bravo, I. y Anderson, D. M. (1994). The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. Journal of Plankton Research 16(5): 513-525.
- Brown, B. E., Ambarsari, I., Warner, M. E., Fitt, W. K., Dunne, R. P., Gibb, S. W. y Cummings, D. G. (1999). Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophylls concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. Coral Reefs 18(2): 99–105.
- Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D. J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E. J. y Hernández-Sandoval, F. E. (2012). Variaciones en el crecimiento y toxicidad de *Gymnodinium catenatum* Graham del Golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. Ciencias Marinas 38(1A): 101-117.
- Casper-Lindley, C. y Björkman, O. (1998). Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. Photosynthesis Research 56(3): 227.
- Castañeda-Vega, A. C. (2014). Identificación de proteínas involucradas en la fotoprotección del alga parda *Macrocystis pyrifera*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 69 p.
- Cembella, A. D., Destombe, C. y Turgeon, J. (1990). Toxin composition of alternative life history of *Alexandrium excavatum*, as determined by high-performance liquid chromatography. En: E. Granéli, B. Sundstrom, L. Edler y D. M. Anderson (Eds.). Toxic Marine Phytoplankton. (pp. 333-338). Elsevier, New York.
- COI. (1992). Panel Intergubernamental COI-FAO sobre Floraciones de Algas Nocivas (IOC-FAO/IPHABI/3), París, 23-25 de junio de 1992. Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO. Informes de los Órganos Rectores y de los Órganos Subsidiarios Principales, 62 pp.
- Cusack, C. K., Bates, S. S., Quilliam, M. A., Patching J. W. y Raine, R. (2002). Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish Waters. Journal of Phycology 38(6): 1106–1112.

- Deeds, J. R., Landsberg, J. H., Etheridge, S. M., Pitcher, G. C. y Longan, S. W. (2008). Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs* 6(2): 308–348.
- Demers, S., Roy, S., Gagnon, R. y Vignault, C. (1991). Rapid light induced changes in cell fluorescence and in xanthophylls cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Marine Ecology-Progress Series* 76: 185–93.
- Demming-Addams, B. y Addams, W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 599-626.
- Dimier, C., Corato, F., Tramontano, F. y Brunet, C. (2007). Photoprotection and xanthophyll-cycle activity in three marine diatoms. *Journal of Phycology* 43(5): 937-947.
- Doblin, M., Blackburn, S. I. y Hallegraeff, G. M. (1999a). Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* (Bacillariophyta). *Journal of Plankton Research* 21(6): 1153-1169.
- Doblin, M., Blackburn, S. I. y Hallegraeff, G. M. (1999b). Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 236(1): 33-47.
- Doblin, M. A., Blackburn, S. I. y Hallegraeff, G. M. (2000). Intraspecific variation in the selenium requirement of different geographic strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Plankton Research*. 22(3): 421–432.
- Falkowski, P. y La Roche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*. 27(1): 8-14.
- Fauchot, J., Levasseur, M. y Roy, S. (2005a). Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarens* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology-Progress Series* 296: 241–50.
- Fauchot, J., Levasseur, M., Roy, S., Gagnon, R. y Weise, A. M. (2005b). Environmental factors controlling *Alexandrium tamarens* (Dinophyceae) growth rate during a red tide event in the St. Lawrence Estuary (Canada). *Journal of Phycology* 41(2): 263–72
- Fujiki, T., Toda, T., Kikuchi, T. y Taguchi, S. (2003). Photoprotective response of xanthophyll pigments during phytoplankton blooms in Sagami Bay, Japan. *Journal of Plankton Research* 25(3): 317–22.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Morquecho-Escamilla, M. L., Band-Schmidt, C. J., Alonso-Rodríguez, R., Erler, K., Luckas, B., Reyes-Salinas, A. y Góngora-González, D. T. (2005). Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 50: 208-236.

- García-Mendoza, E. y Colombo-Pallotta, M. F. (2007). The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different non-photochemical quenching control than in higher plants. *New Phycology* 173(3): 526–536
- Geider, R., MacIntyre, H. y Kana, T. (1996). A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 41(1): 1-15.
- Goss, R. y Jakob, T. (2010). Regulation and function of xanthophylls cycle dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*. 106(1-2): 103-122.
- Goss, R., Pinto, E., Wilhelm, C. y Richter, M. (2006). The importance of a highly active and  $\Delta$ pH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *Journal of Plant Physiology* 163:1008–1021.
- Graham, H. W. (1943) *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society* 62(3): 259–261.
- Granéli, E. y Flynn, K. (2006). Chemical and physical factors influencing toxin content. En: E. Granéli y J. T. Turner (Eds.). *Ecology of Harmful Algae*. (pp. 229-241). Springer, Berlin.
- Grouneva I, Jakob, T., Wilhelm, C. y Goss, R. (2008). A new multicomponent NPQ mechanism in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant and Cell Physiology* 49(8): 1217–1225.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. En: Stein (Ed.). *Handbook of Phycological Methods*. (pp. 289-312). Cambridge University Press: Cambridge.
- Hall, S. (1991). Natural toxins. En: D. R. Ward y C. Hackney (Eds.). *Microbiology of Marine Food Products*. (pp. 305). An avi Book: New York.
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2): 79-99.
- Hallegraeff, G. M. (2003). Harmful algal blooms: a global overview. En: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson y A. D. Cembella (Eds.). *Manual Harmful Marine Microalgae*. (pp. 25-49). UNESCO: France.
- Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Doblin, M. A. y Bolch, C. J. S. (2012). Global toxicology, ecophysiology and population relationship of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 14: 130-143.
- Hallegraeff, G. M. y Fraga, S. (1998). Bloom dynamics of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with emphasis on Tasmania and Spanish Coastal Waters. En: D. M. Anderson, A. D. Cembella y G.M. Hallegraeff (Eds.). *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. (pp. 59-80). Springer, Berlin.
- Hanelt, D. (1998). Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Marine Biology* 131(2): 361-369.

- Hernández-Orozco, M. L. y Gárate-Lizárraga, I. (2006). Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomédica* 17(1): 45-60.
- Holmes, M. (1992). The origin of ciguatera an update. *SPC Ciguatera. Information bulletin. Australia.* 2–8.
- Holmes, M. J., Bolch, C. J. S., Green, D. H., Cembella, A. D. y Ming Teo, S. L. (2002). Singapore isolates of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) produce a unique profile of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 38: 96–106.
- Horton, P. y Ruban, A. V. (2005) Molecular design of the photosystem II light harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56(411): 365–373.
- Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K. y Luckas, B. (1997). Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia* 45(1): 312–316.
- Kashino, Y., Kudoh, S., Hayashi, Y., Suzuki, Y., Odate, T., Hirawake, T., Satoh, K. y Fukuchi, M. (2002). Strategies of phytoplankton to perform effective photosynthesis in the North Water. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 49(22-23): 5049-5061.
- Kirk, J. T. (1992). The nature and measurements of the light environment in the ocean. En: *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea.* (550 p). Plenum press New York, NY, USA.
- Krause, G. H. y Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y. y Collos, Y. (2011). Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33(10):1550-1563.
- Landsberg, J. H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10(2): 113–390.
- Lavaud, J. y Kroth, P. (2006). In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophylls cycle. *Plant and Cell Physiology* 47(7): 1010-1016.
- Lavaud, J., Rousseau, B. y Etienne, A. (2003). Enrichment of the light-harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in diatoms. *Biochemistry* 42(19): 5802-5808.
- Lavaud, J., Rousseau, B. y Etienne, A. (2004). General features of photoprotection by energy

- dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40(1): 130-13.
- Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H. y Etienne, A. L. (2002). Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology* 129(3): 1398–1406.
- Lavaud, J., Strzepek, R. y Kroth, P. (2007). Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography* 52(3): 1188-1194.
- Lombardo-Cifuentes, L. (2011). Mecanismos de disipación no fotoquímica en dinoflagelados simbios de la anémona *Anthopleura elegantissima*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 68 p.
- Lohr, M. y Wilhelm, C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Plant Biology* 96(15): 8784–8789.
- Mee, L. D., Espinosa, M. y Díaz, G. (1986). Paralytic shellfish poisoning with *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine Environmental Research* 19(1): 77–92.
- Müller, P., Ping, L. y Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125(4): 1558-1566.
- Murillo-Martínez, R. (2011). Caracterización de fitoplancton tóxico y acumulación diferencial de toxinas de tipo paralizante en la almeja *Panopea globosa* (Dall 1898) en la franja costera San Felipe-Puertecitos, B.C. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, México. 75 p.
- Negri, A. P., Bolch, C. J. S., Blackburn, S. I., Dickman, M., Llewellyn, L. E. y Méndez, S. (2001). Paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum* strains from six countries. En: G. M. Hallegraeff, S. I. Blackburn, C. J. Bolch y R. J. Lewis (Eds.) *Harmful Algal Blooms 2000*. (pp. 210-213). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 333-359.
- Niyogi, K. K., Li X. P., Rosenberg, V. y Jung, H. S. (2005). Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 56(411): 375–382.
- Ocampo-Álvarez, H. (2013). Disipación del exceso de energía en el aparato fotosintético de *Macrocystis pyrifera*: control molecular y respuesta a la temperatura. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 93 p.
- Oh, S. J. y Yoon, Y. H. (2004). Effects of water temperature, salinity and irradiance on the

- growth of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* (Graham) isolated from Yeosuhae Bay, Korea. *Algae* 19(4): 293-301.
- Oh, S. J., Matsuyama, Y., Yoon, Y. H., Miyamura, K., Choi, C. G., Yang, H. S. y Kang, I. J. (2010). Comparative analysis of paralytic shellfish toxin content and profile produced by dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Inokushi Bay, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 55(1): 47-54.
- Olaizola, M., La Roche, J., Kolber, Z. y Falkowski, P. (1994). Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynthesis Research*. 41(2): 357-370.
- Oshima, Y. (1995). Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. En: P. Lassus, E. Arzul, E. Erard, P. Gentien y C. Marcaillou (Eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*. (pp. 475-480). Technique et Documentation Lavoisier, Intercept.
- Osmond, C. B. (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and Sun plants. En: N. R. Baker y J. R. Bowyer (Eds.) *Photoinhibition of Photosynthesis* (pp.1-24). BIOS Scientific, Oxford.
- Pan, Y., Bates, S. S. y Cembella, A. D. (1998). Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* 6(3-4): 127-135.
- Parkhill, J. P. y Cembella, A. D. (1999). Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research* 21(5): 939-955.
- Proença, L. A. de O., Tamanaha, M. S. y De Souza, N. P. (2001). The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Atlántica, Río Grande* 23: 59-65.
- Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., Bustillos-Guzmán, J.J., Garcés, E., Gaviño-Rodríguez, J. H., Galicia-Pérez, M. A., Patiño-Barragán, M., Band-Schmidt, C. J., Hernández-Sandoval, F. J. y López-Cortés, D. J. (2012). Bloom of *Gymnodinium catenatum* in Bahía Santiago and Bahía Manzanillo, Colima, México. *Revista de Biología Tropical* 60: 173-186.
- Reguera, B. (2002). Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En: E. A. Sar, M. E. Ferrairo y B. Reguera (Eds.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. (pp. 21-54). Instituto Español de Oceanografía: Madrid, España.
- Santiago-Morales, I. S. (2011). Potencial tóxico de cepas de *Pseudonitzschia australis* aisladas de la costa occidental de Baja California. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 124 p.
- Shimizu, Y. (2000). Chemistry and mechanism of action. En: L. Botana y M. Dekker (Eds.)

- Seafood and Freshwater Toxins Pharmacology, Physiology and Detection. (pp. 151-172). Marcel Dekker Inc.: New York.
- Shumway, S. E. (1990). A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 21(2): 65-104.
- Sommer, H. y Meyer, K. F. (1937). Paralytic shellfish poisoning. *Archives of Pathology* 24: 560-598.
- Stafford, R. G. y Hines, H. B. (1995). Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. *Toxicon* 33(11): 1501-1510.
- Suggett, D., MacIntyre, H. y Geider, R. (2004). Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnology and Oceanography Methods* 2(10): 323-337.
- Taylor, F. J. R., Fukuyo, Y. y Larsen. J. (1995). Taxonomy of harmful dinoflagellates. En: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson y A. D. Cembella (Eds.). (pp. 288). *Manual on Harmful Marine Microalgae*.
- Ting, C. y Owens, T. (1994). The effects of excess irradiance on photosynthesis in the marine diatom *Pheodactylum tricoratum*. *Plant Physiology* 106(2): 763-770.
- Van Heukelem, L. y Thomas, C. S. (2001). Computer-assisted high performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal Chromatography*. 910(1): 31-49.
- Van Kooten O. y Snel J. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147-150.
- Wagner, H., Jakob, T. y Wilhelm, C. (2006). Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions. *New Phytologist* 169(1): 95-108.
- Wang, D. Z. (2008). Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs* 6(2): 349-371.
- Warner, M. E. y Berry-Lowe, S. (2006). Differential xanthophyll cycling and photochemical activity in symbiotic dinoflagellates in multiple locations of three species of Caribbean coral. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339(1): 86-95.
- Wilhelm, C. y Selmar, D. (2011). Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 168(2): 79-87.
- Yamamoto, T., Oh, S. J. y Kataoka, Y. (2002). Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science* 68(2): 356-363.

- Yu, R. C., Hummert, C., Luckas, B., Qian, P. Y. y Zhou, M. J. (1998). A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia* 48(9-10): 671–676.
- Zaccaroni, A. y Scaravelli, D. (2008). Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. En: V. Evangelista, L. Barsanti, A. M. Frassanito, V. Passarelli y P. Gualtieri (Eds.). *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. (pp. 91-158). Pisa, Italy.