



UNIVERSIDAD DEL MAR
campus Puerto Ángel

**Taxonomía integrativa y crecimiento de *Coolia*
Meunier (**Dinophyceae**) en extractos de *Dictyota*
dichotoma (Hudson) J.V.Lamouroux (**Phaeophyceae**) de
la Bahía de La Paz, B.C.S., México**

TESIS

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Biología Marina

Presenta

Ana Emilia Ramos Santiago

Directora externa de tesis

Dra. Christine Johanna Band Schmidt

Directora interna de tesis

Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2021

RESUMEN

Los dinoflagelados epibentónicos son protistas flagelados, algunas especies producen florecimientos algales nocivos bentónicos, que pueden llegar a afectar la fauna silvestre y al ser humano. Entre los géneros de dinoflagelados epibentónicos más comunes se encuentra *Coolia*, grupo de particular interés, debido a las asociaciones que presenta con otros dinoflagelados epibentónicos y por las biomoléculas análogas que produce de la yesotoxina, gambierona, ácido okadaico y azaspirácido, así como la cooliatina y cooliatoxina. Por esta razón, los dinoflagelados epibentónicos deben ser evaluados, en particular poblaciones de *Coolia* de la Bahía de La Paz, debido a la escasa información publicada sobre la identidad y diversidad del género para esta zona. El objetivo de este trabajo consistió en identificar por medio de taxonomía integrativa dos aislados de *Coolia* (CMBAPAZ-1 y S/I 72) obtenidas de la Bahía de La Paz y determinar el efecto de extractos de la macroalga *Dictyota dichotoma* en su crecimiento. Ambos aislados se cultivaron en medio GSe con y sin extractos de la macroalga *Dictyota dichotoma*: 1) GSe, 2) GSe con extracto crudo de *D. dichotoma*, 3) GSe con fracción de carbohidratos de *D. dichotoma*, 4) GSe con una fracción no precipitable de *D. dichotoma*. Se obtuvieron curvas de crecimiento para ambos aislados en todos los tratamientos. Las características morfológicas ayudaron a identificar los aislados como *Coolia malayensis* y *Coolia* cf. *malayensis*, después se corroboró con el análisis molecular de la región 28S del ADNr (valores de afinidad mayores a 95%) que ambos aislados pertenecen a la especie *C. malayensis*. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en las densidades celulares promedio de los aislados (CMBAPAZ-1 y S/I 72) en el medio GSe en comparación con los otros tratamientos. La tasa de crecimiento y la densidad celular máxima se reportaron en la cepa S/I 72 (0.139 ± 0.003 div día⁻¹, $43,428 \pm 4560$ cel mL⁻¹, respectivamente) en medio GSe con fracción no precipitable de *D. dichotoma*. La cepa CMBAPAZ-1 tuvo una tasa de crecimiento máxima de 0.135 ± 0.007 div día⁻¹ en medio GSe con extracto crudo de *D. dichotoma* y una densidad celular máxima de $40,271 \pm 3,018$ cel mL⁻¹ en el control. Este trabajo representa el primer estudio de taxonomía integrativa de *C. malayensis* de la Bahía de La Paz.

Palabras claves: *Coolia malayensis*, curvas de crecimiento, dinoflagelados epibentónicos, florecimientos algales nocivos bentónicos.

ABSTRACT

The epibenthic dinoflagellates are flagellated protists, some species produce benthic harmful algal blooms, these events can impact wildlife and human health. Among the most common genus of epibenthic dinoflagellates *Coolia* is found, a group of particular interest, due to the associations it has with other epibenthic dinoflagellates and because of the biomolecules they produce for example analogues of yessotoxin, gambierone, okadaic acid and azaspiracids; as well as production of cooliatin and cooliatoxin. For this reason, epibenthic dinoflagellates need to be evaluated, in particular *Coolia* populations from Bahía de La Paz, since there is not enough published information on the genus identity and diversity for this area. The objective of this work was to identify by integrative taxonomy two isolates of *Coolia* (CMBAPAZ-1 and S/I 72) obtained from the Bahía de La Paz and to determine the effect of extracts of the macroalgae *Dictyota dichotoma* on their growth. Both isolates were cultured in GSe medium with and without extracts of the macroalgae *Dictyota dichotoma*: 1) GSe, 2) GSe with crude extract of *D. dichotoma*, 3) GSe with the carbohydrate fraction of *D. dichotoma*, 4) GSe with a non-precipitable fraction of *D. dichotoma*. Growth curves were obtained for all treatments in both isolates. The morphological characters helped to identify the isolates as *C. malayensis*, corroborated by phylogenetic analyses based on the 28S region of rDNA (affinity values greater than 95%). There were no significant differences ($p < 0.05$) in the cell densities of the two strains (CMBAPAZ-1 and S/I 72) in GSe medium compared with the other treatments. The growth rate and maximum cell density were reported in strain S/I 72 (0.139 ± 0.003 div day⁻¹, $43,428 \pm 4560$ cell mL⁻¹, respectively) with GSe medium plus non-precipitable fraction of *D. dichotoma*. The strain CMBAPAZ-1 had a maximum growth rate of 0.135 ± 0.007 div day⁻¹ in GSe medium with the addition of crude extract of *D. dichotoma* and presented a maximum cell density of $40,271 \pm 3,018.433$ cell mL⁻¹ in the control. This work represents the first integrative study of *C. malayensis* from Bahía de La Paz.

Key words: Benthic algal blooms, *Coolia malayensis*, epibenthic dinoflagellates, growth curves.

*Para mis padres (**Amado** y **Maura**), por convertir uno de mis más grandes sueños en realidad, el ser bióloga marina.*

*Para mis hermanos (**Ceci**, **Rubén**, **Cuper** y **Mingo**), aunque estén lejos siempre los llevo en mi corazón.*

*A mis sobrinas (**Ana**, **Osiris** y **Bris**).*

*A mi abuela **Neché**⁺, por todo el amor que me brindó de niña.*

*Para mis bebés (**Chispa** y **Sócrates**) por su compañía.*

*Para mi **Hobbit**, por estar cuando más lo necesito.*

***A la mar**, por guardar todas mis tristezas y cansancio.*

“Cuando la mar está encrespada, trayendo a nuestra mente imágenes de lejanos barcos debatiéndose entre las olas, nuestros corazones ansían en silencio la desvanecida línea del horizonte. Cuando está tranquilo, sosegado, nosotros también lo estamos. Aunque estemos acostumbrados a él desde tiempos primordiales, siempre oculta un halo de misterio, como si algo, demasiado vasto para tomar forma, estuviese acechando en ese universo del que el mar es la puerta” Lovecraft & Barlow (1936).

AGRADECIMIENTOS

En general, agradezco a cada una de las personas que participaron para la elaboración de esta tesis.

Agradezco la dirección y apoyo brindado por la **Dra. Christine Johanna Band-Schmidt**, quien siempre mostró interés en este trabajo. Por sus comentarios y observaciones tan acertadas; y por darme la oportunidad de realizar mis estancias profesionales.

A Nacho (**Dr. Ignacio Leyva Valencia**) por su apoyo incondicional, y que a pesar de sus actividades y obligaciones académicas, siempre estuvo apoyándome.

La **Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales**, por aceptar ser mi codirectora de tesis y brindarme una zona de trabajo; por enseñarme a ser meticulosa en las labores de laboratorio y de campo.

A mis revisores **Dr. Julio Adolfo Acosta Calderón** y la **M. en C. Yolanda Huante Gonzáles**, gracias por su apoyo y sus observaciones para que este trabajo fuera más consistente.

También agradezco a los proyectos de Ciencia básica **CONACyT A1-S-14968**, **FORDECyT 260040**, y **CONACyT** de problemas nacionales 248468, y el proyecto **SIP 2020-0571** del **Instituto Politécnico Nacional** por financiar este trabajo de tesis. Y al proyecto **CONACyT-INFR-2015** “actualización y ampliación de la infraestructura para fortalecer la línea de investigación sobre la toxicología ambiental relacionado a los florecimientos algales nocivos”.

A **Dr. Yuri B. Okolodkov**, por proporcionar las fotografías de microcopia electrónica.

Al Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por su ayuda en la preparación de extractos y por la literatura proporcionada.

A la **RedFAN**, por el apoyo económico proporcionado para asistir al V Congreso Nacional de la SOMEFAN 2019, realizado del 23-27 de septiembre del 2019 en el Centro Universitario de la Costa, UDG. Donde presenté el primer avance de esta tesis.

A **Leyberth y Armando**, por su apoyo en las labores de laboratorio y el análisis filogenético, respectivamente.

A mis amigos mas cercanos de la UMAR **Uziel, Axel, Jahir, El gran Sam, Ivanni, Didi, Toño y Frida**; gracias por todos los momentos que vivimos y que serán inolvidables.

Aquellos compañeros de La Paz que me apoyaron y me dieron un espacio de su tiempo, a ustedes **Armando, Atzcalli, Dulce, Gema, Gus y Leyberth**.

A los profesores de la UMAR y en especial a **Darlita, Ahumada, Ivonne, Montis** (alias Kalimán), **Edgar Rosas, Samanta, Coco, Rosario Cid, Carmen Alejo, Leyte, la maestra, Panchito, Malú y Nieves**.

A mi alma máter, la **Universidad del Mar**–Campus Puerto Ángel.

| CONTENIDO GENERAL | Página |
|---|---------------|
| GLOSARIO | xiv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 8 |
| 2.1 Morfología de <i>Coolia</i> | 8 |
| 2.2 Filogenia molecular de las regiones 5.8S, 18S y 28S..... | 13 |
| 2.3 Reportes de <i>Coolia</i> para México..... | 14 |
| 2.4 Crecimiento..... | 15 |
| 2.5 Toxicidad..... | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 21 |
| 4. HIPÓTESIS | 22 |
| 5. OBJETIVOS | 23 |
| 5.1 Objetivo general..... | 23 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 23 |
| 6. METODOLOGÍA | 24 |
| 6.1 Área de estudio..... | 24 |
| 6.2 Identificación morfológica..... | 26 |
| 6.2.1 Microscopía óptica..... | 27 |
| 6.2.2 Microscopía de fluorescencia (Tinción con calcoflúor y DAPI)..... | 27 |
| 6.3 Identificación molecular..... | 28 |
| 6.3.1 Extracción de ADN..... | 28 |
| 6.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3.3 Análisis molecular..... | 30 |
| 6.4 Elaboración de extracto crudo y fracciones de macroalga..... | 33 |
| 6.5 Diseño experimental para evaluar el crecimiento..... | 35 |
| 6.5.1 Curvas de crecimiento..... | 35 |
| 6.5.1.1 Análisis estadístico..... | 36 |
| 7. RESULTADOS..... | 37 |
| 7.1 Identificación morfológica..... | 37 |
| 7.2 Análisis molecular..... | 47 |
| 7.3 Curvas de crecimiento..... | 49 |
| 7.3.1 <i>Coolia malayensis</i> (cepa CMBAPAZ-1)..... | 49 |
| 7.3.2 <i>Coolia malayensis</i> (cepa S/I 72)..... | 53 |
| 7.3.3 Observaciones de los cultivos durante el experimento..... | 56 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 58 |
| 8.1 Identificación morfológica..... | 58 |
| 8.2 Observaciones en cultivo..... | 65 |
| 8.3 Análisis molecular..... | 66 |
| 8.4 Crecimiento y condiciones de cultivo..... | 68 |
| 8.5 Discusión integrativa..... | 74 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 76 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 77 |
| 11. REFERENCIAS..... | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Distribución global del género *Coolia* basada en los registros generados entre 1985 al 2020. A) *Coolia monotis* y *C. malayensis*. B) *C. areolata*, *C. guanchica*, *C. santacroce*, *C. palmyrensis*, *C. canariensis* y *C. tropicalis*. Actualizada y modificada de las bases de datos de Leaw *et al.* (2016) y Larsson *et al.* (2019).....5
- Figura 2.** Arreglo de placas de una célula de *Coolia malayensis*. A) placas pre-cingulares (1'', 2'', 6'' y 7''), y post-cingulares (1'''–5'''), vista ventral; B) vista dorso-apical mostrando el complejo poro apical y poro apical u oral (Po); C) placas apicales (1' a 3') y placas pre-cingulares (1'' a 7''); vista ventro-apical; D) placas antapicales (1'''' a 2''') y serie post-cingulares (1''' a 5'''); vista antapical. Imagen modificada de Leaw *et al.* (2010).....9
- Figura 3.** Área de estudio. A) cuadro negro: localidad de aislamiento de la cepa CMBAPAZ–1; B) triangulo negro: localidad de aislamiento de la cepa S/I 72.....26
- Figura 4.** Proceso de obtención del extracto crudo y fraccionamiento del alga *Dictyota dichotoma*.....34
- Figura 5.** Células de *Coolia* en cultivo. A) cultivo del aislado CMBAPAZ-1; B) cultivo del aislado S/I 72.....38
- Figura 6.** Células inmersas en mucílago (M). A) células de la cepa S/I 72 en cultivo inmersas en mucilago café–verdoso, fotografía tomada a 40X; B) Células de la cepa CMBAPAZ–1. Barra de escala 20 µm.....38
- Figura 7.** Morfología de cepas de *Coolia*. A) vista antapical; B) células en cultivo; C y E) microscopía de luz y autofluorescencia, vista dorsal mostrando detalle de cloroplastos (Cl) ovalados color verde-dorado; D) posición del cingulo y sulcus, vista ventral; F) posición del núcleo (N) semicircular, vista

ventral (tinción DAPI). Barras de escala: C, D, E y F=10 µm, B=30 µm.....39

Figura 8. Microscopía de luz y epifluorescencia de células de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1). A) placa 3^{''}, en vista dorsal; B, F y f) se muestra el poro apical, placas apicales (1'-3') y pre-cingulares (1'', 2'', 6'' y 7''), vista apical; C) placas pre-cingulares (1'' y 7'') vista ventral, D y E) vista antapical mostrando el arreglo de placas post-cingulares (2'''-5'''). Barras de escala: A-F= 10 µm, f= 6 µm.....41

Figura 9. Microscopía electrónica de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1). A y E) en vista ventral se muestran las placas apicales (1'), pre-cingulares (1'', 2'', 6'' y 7''), post-cingulares (1''' y 5'''), y la aleta sulcal (AS); B) en vista dorsal las placas post-cingulares (3''' y 4'''); C) se muestran las placas antapicales (1'''' y 2''') y post-cingulares (1'''-5'''); D) placas apicales (1' y 2') y serie pre-cingular (1'', 2'', 6'' y 7''); F) poro apical (Po). Barras de escala: A-D= 5 µm, E=4 µm y F=3 µm. Imágenes de Dr. Yuri Okolodkov.....42

Figura 10. Microscopía electrónica de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1). A) complejo del poro apical (CPA), y poros que lo componen (P6-P9); B-E) Forma de placas de importancia taxonómica. Barras de escala, A y B=3 µm, C=10 µm, D y E= 3 µm. Imágenes de Dr. Yuri Okolodkov.....43

Figura 11. Serie apical (1'-3'), placas pre-cingulares (1''-4'') y poro apical (Po) de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1). Barra de escala= 6 µm. Imagen de Dr. Yuri Okolodkov.....44

Figura 12. Morfología de células presentes en el cultivo clonal S/I 72. A) en vista ventral se logra observar el sulcus; B) vista antapical; C) vista apical, poros (P) que componen las teca; D) vista dorsal, se muestra el cingulo y las porciones de la hipoteca (E) y epiteca (H); E y F) placa apical 3' y placas pre-cingulares (4''-6''). Barras de escala 10 µm.....46

Figura 13. Microscopía electrónica de células de la cepa S/I 72. A, C y D) en vista apical se lograron observar las placas apicales (1'-3'), pre-cingulares (2''-

6") y poro apical (Po); B) En vista dorsal se observan las placas antapicales (1''' y 2''') y pos-cingulares (2'''–4'''). Barras de escalas: A–C= 10 µm, D=4 µm. Imágenes de Dr. Yuri Okolodkov.....47

Figura 14. Análisis filogenético de la región 28S del ADNr de las cepas CMBAPAZ-1 y S/I 72 (círculos). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de tiempo general reversible, con un *bootstrap* de 1000 repeticiones. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap. El análisis involucró 24 secuencias de nucleótidos, con un total de 700 posiciones en el conjunto de datos final. Como grupo externo se agregaron secuencias de *Ostreopsis* (triángulos rojos).....49

Figura 15. Curvas de crecimiento de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1) en cuatro condiciones de cultivo, los cuales fueron sostenidos a 24 ± 1 ° C, salinidad de 34, intensidad luminosa de 120-150 µmol E m⁻² seg⁻¹, en un ciclo de luz y oscuridad 12:12.....51

Figura 16. Densidad celular máxima de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1) en el tratamiento control y al cultivarla en tres fracciones de la macroalga *Dictyota dichotoma*.....52

Figura 17. Curvas de crecimiento de *Coolia malayensis* (cepa S/I 72) en cuatro condiciones de cultivo.....54

Figura 18. Relación entre la densidad celular y las condiciones de cultivo (tratamientos) de *Coolia malayensis* (cepa S/I 72).....55

Figura 19. Cultivos de lote de las cepas CMBAPAZ-1 y S/i 72 en medio GSe con extracto de *Dictyota dichotoma*.....57

Figura 20. Forma de la placa apical 3' de *Coolia malayensis*. A) imagen tomada de Jeong *et al.* (2012); B) Ilustración de la primera descripción de *C. malayensis* hecha por Leaw *et al.* (2010); D) célula perteneciente a la cepa S/I 72, imagen proporcionada por Dri Yuri Okolodkov.....60

Figura 21. Serie de placas post-cingulares y antapicales de *Coolia malayensis*. A) imagen tomada de Leung *et al.* (2017); B) célula perteneciente a la cepa CM-BAPAZ-1, imagen proporcionada por Dr. Yuri Okolodkov.....61

Figura 22. Poros (P1-P10) que componen el complejo poro apical de *Coolia malayensis*. A) Imagen de *C. malayensis* aislada de la Bahía de La Paz, B) micrografía tomada de Jeong *et al.* (2012) de una cepa coreana.....62