

## Reporte

### **Respuestas biológicas del coral solitario de copa naranja (*Balanophyllia elegans*) y características poblacionales de las anémonas marinas (*Anthopleura* spp.) en Ensenada, Baja California, México.**

Manuel Alejandro Delgadillo-Nuño<sup>1\*</sup>, Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte<sup>1</sup>, Rafael Andrés Cabral Tena<sup>2</sup>, Adonis Jaquelina Mingüer Rodríguez<sup>2</sup>, David Arturo Paz García<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Ensenada-Tijuana No. 3917, Fraccionamiento Playitas C.P. 22860, Ensenada, Baja California, México.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Carretera Ensenada - Tijuana No. 3918, Zona Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B. C. México

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096, La Paz B. C. S. México

#### **Resumen en extenso**

El coral pétreo *Balanophyllia elegans* y las anémonas marinas *Anthopleura* spp., son invertebrados comunes en las costas de Baja California (México) y California, Oregón y Washington en los Estados Unidos. Esta extensa región presenta una fuerte influencia de la Corriente de California, que da como resultado temperaturas del agua de mar templadas a frías la mayor parte del año, que sin embargo pueden incrementar significativamente durante el verano, principalmente en las zonas expuestas del intermareal rocoso. Además se presentan áreas geográficas con distintos regímenes de surgencia a lo largo del año, ocasionando variaciones espaciales y estacionales en el pH y temperatura del agua de mar. Ambas especies requieren de capacidades fisiológicas que les permitan tolerar todas estas fluctuaciones de pH y temperatura estacional y espacial. No obstante, la respuesta fisiológica debe ser considerablemente distinta entre ambos organismos, esto en función de la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub>, por parte de los dinoflagelados endosimbiontes (*Symbiodinium* sp.) que albergan las anémonas, y la necesidad de calcificación del coral pétreo.

Tomando en consideración que los ecosistemas marinos se encuentran bajo crecientes factores de estrés ambiental debido al cambio climático, y como consecuencia, cada año un número creciente de hábitats marinos muestran alguna evidencia de este impacto. La contribución que ofrecen los estudios ecofisiológicos para la comprensión de cómo las especies y los ecosistemas responden al cambio climático global se vuelve cada vez más urgente. Con esto en mente, en el presente proyecto investigó técnicas de colecta en campo y análisis en laboratorio para la obtención del contenido bioquímico (ADN, ARN, proteínas) como bioindicador de la capacidad fisiológica, así como la obtención de imágenes fotográficas subacuáticas para la estimación de las características poblacionales de estas especies. Se realizaron cuatro expediciones de campo al sitio “Arbolitos” (31° 42' 21" N y 116° 41' 33" O) en invierno, primavera, verano y otoño de 2018. Durante el invierno y verano se realizaron inmersiones buceo autónomo a 0, 5, 10, 15 y 20 m de profundidad, tomando registros de la temperatura y radiación lumínica *in situ*.

En cada profundidad se tendió un transecto paralelo a la costa de 10 m de longitud. Mediante una cámara Nikon® Coolpix® W300 se tomaron 10 fotografías por transecto, que retrataron aproximadamente 1 m<sup>2</sup> del fondo marino. En cada dos metros sobre el transecto se recolectó un coral individual *B. elegans*, con un total de 5 corales por profundidad (a excepción de 0 m) y 20 corales por cada muestreo (40 corales en total). Los corales colectados se preservaron en solución RNAlater® o TRIzol®, se trasladaron en hielo y posteriormente se almacenaron a – 80 °C en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo, en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Las fotografías fueron visualizadas en la aplicación iPhoto 9.4.1© de Apple Inc. La comunidad bentónica fue identificada a partir de las características morfológicas a simple vista y se cuantificó el número aparente de individuos. Los análisis del contenido bioquímico en corales se realizó en ECODEL utilizando protocolos previamente estandarizados para corales pétreos, realizando las siguientes modificaciones.

Los corales se descongelaron y el exceso de RNAlater se eliminó secando la muestra sobre un paño Kimwipes®. Cada coral se trituró individualmente en un mortero estéril y se transfirió aproximadamente 50 mg de tejido y esqueleto a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con 1 mL de reactivo TRIzol. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente usando un pistilo de teflón estéril. Los homogenizados se incubaron a

temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos, después se les agregó 0.2 mL de cloroformo por, se mezclaron por inversión y se incubaron a TA por 3 minutos. Posteriormente se realizó una microcentrifugación de 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C, para separar las fases acuosa de la fase orgánica y la solución de Fenol-Cloroformo. Para la extracción de ARN se transfirieron 0.6 mL de la fase acuosa a un tubo nuevo y el tubo restante se reservó para la extracción de ADN y precipitación de proteínas. El ARN se precipitó de la fase acuosa añadiendo 0.5 mL de etanol absoluto e incubando la solución a – 20 °C durante la noche. Una vez transcurrida la incubación, las muestras fueron centrifugadas como se explicó anteriormente para visualizar la pastilla de ARN en el fondo del tubo. Finalmente el etanol remanente se descartó y la pastilla de ARN se lavó en etanol al 75 % mediante una centrifugación similar a la anterior. Para cuantificar el contenido de ARN en cada coral individual, la pastilla se disolvió en 0.05 mL de agua libre de RNasa, se cuantificaron los microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de ARN en la muestra a través de espectrofotómetro Nanodrop® en el cual se midió la absorbancia de cada muestra a 260 nm. Los datos se multiplicaron por el volumen de disolución de la pastilla y se dividieron por el peso de la muestra de esqueleto de coral, con lo cual se obtuvo el contenido de ARN total del coral ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ).

El ADN y las proteínas se aislaron del remanente orgánico de la siguiente manera. Se agregaron 0.3 mL de etanol absoluto, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubaron las muestras a TA por 3 minutos. Se sedimentó el ADN mediante microcentrifugación a 2, x g durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió el sobranante de la solución fenol-cloroformo para la precipitación de proteínas, pero antes se lavó el ADN dos veces con 1 mL de solución de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10%, después de microcentrifugar las muestras como recién se describió, las pastillas de ADN se lavaron con etanol al 75 % y se volvieron a centrifugar, el sobrenadante se descartó y el ADN se eluyó en 0.2 mL de agua estéril, calentando las muestras a 65 °C un par de minutos. Las proteínas se precipitaron agregando 2 mL de etanol absoluto y microcentrifugando las muestras a 12 000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron las proteínas varias veces con clorhidrato de guanidina 300 mM en etanol al 95% agitando vigorosamente durante 20 minutos a TA. Después de cada lavado se centrifugaron las proteínas a la misma velocidad y temperatura anteriores, pero solo durante 5 minutos. El último lavado se realizó con 2 mL de etanol absoluto bajo las mismas condiciones que los lavados anteriores. Finalmente, las proteínas

se disolvieron en 0.2 mL de SDS al 1%, calentando las muestras durante una hora a 50 °C. El contenido de ADN se cuantificó de la misma manera que el de ARN, mientras que para la cuantificación de las proteínas se realizaron mediciones a 280 nm.

En las expediciones a campo pudimos observar que en el sitio denominado como Arbolitos, las especies estudiadas presentan una alta abundancia en un Montículo ubicado a una distancia de cien metros frente a la costa de cantos rodados. Las inmersiones de buceo y el análisis fotográfico revelaron tres ambientes principales, en los que se pudo fotografiar a *B. elegans* y dos especies de *Anthopleura* (*A. xanthogrammica* y *A. sola*), en el Montículo de Arbolitos: 1) plataformas inclinadas expuestas a la radiación solar (3 – 6 m), 2) paredones verticales protegidos de la radiación solar (6 – 10 m) y 3) base del montículo con una marcada y profunda pendiente (> 10). Estos ambientes estaban dominados por *B. elegans* y no presentaron diferencias en abundancia de acuerdo con la profundidad. No obstante, los corales fueron cada vez más escasos conforme el sustrato (rocas graníticas) se distanciaba del montículo, mientras que en los primeros metros de profundidad la especie estaba completamente ausente (0 – 2 m). Los datos de radiación lumínica y de abundancia de las especies podrían indicar que, dado que *B. elegans* no es un coral que alberga dinoflagelados simbioses fotosintéticos (*Symbiodinium* sp.), su distribución no se ve limitada por la penetración de la radiación lumínica (la cual disminuyó con la profundidad), a diferencia de *Anthopleura* spp., las cuales son mucho menos abundantes en la zona de Arbolitos y están más limitadas por la profundidad y la morfología del Montículo Arbolitos, en comparación con su alta abundancia en otros sitios del intermareal de Ensenada. De manera que en el sitio de estudio las anémonas se observan únicamente en los ambientes donde se registro una mayor radiación lumínica, como en los resquicios de los paredones verticales orientados de tal manera que recibían luz directa del sol, así como en las plataformas somera más expuestas a la radiación solar.

La variación de temperatura del agua de mar, en función de la profundidad, fue mayor durante el invierno, con una diferencia máxima de hasta 4 °C entre la superficie (20 °C) y el fondo (16 °C) en el Montículo Arbolitos. Mientras que en el verano la variación en profundidad fue menor, de apenas 24.1 °C en el fondo y 24.5 °C en la superficie. No obstante, la variación estacional de temperatura fue significativamente mayor, ya que en promedio la temperatura de invierno fue de  $16.7 \pm 1$  °C y en verano fue de  $24 \pm 0.1$  °C.

Esto representa una diferencia promedio de  $7.5 \pm 1$  °C. Esta variación de temperatura de carácter espacial, y principalmente la de carácter estacional, tuvo un efecto significativo en la fisiología de *B. elegans*. En primer lugar, durante el invierno la razón ARN/ADN (contenido de ARN en función del contenido de ADN) en el coral fue 3 veces mayor en la zona profunda comparada con la parte somera, mientras que en el verano la razón ARN/ADN fue inversa, presentándose una proporción 50 % mayor en los corales de la parte somera comparados con la zona profunda. En segundo lugar, comparando el verano con el invierno, la razón ARN/ADN fue dos veces mayor en los corales más profundos y hasta 12 veces mayor en los corales más someros (en verano).

De manera preliminar, el análisis de la razón ARN/ADN (un proxy molecular de la capacidad total de transcripción), reveló diferencias significativas en la condición fisiológica de los corales en relación con el perfil de profundidad y principalmente con la variación estacional de la temperatura del agua de mar. Consistentemente, observamos valores mayores de este indicador en relación con las temperaturas más altas. Esto sugiere dos posibles respuestas fisiológicas: 1) se trata de un aumento beneficioso de la actividad metabólica celular para la producción elevada de proteínas, que refleja la actividad de procesos fisiológicos como el crecimiento y la reproducción o 2) se trata de un incremento del estrés fisiológico que se ve reflejado en la alta producción de proteínas de choque térmico (Hsps), como parte de una respuesta celular de mitigación o reparación del daño causado por el estrés térmico.

Cabe señalar, que el análisis de los datos en laboratorio se realizó en colaboración con la estudiante de Maestría Adonis Jaquelina Mingüer Rodríguez, quien continúa actualmente realizando el análisis de expresión del gen de la proteína choque térmico de 70 kDa (Hsp70), a partir de las muestras de ARN total. Por lo que la discusión final de nuestros resultados formará parte de su proyecto de tesis (en preparación), el cual también será presentado durante el XXVI Congreso Estudiantil de la Facultad de Ciencias Marinas y V congreso Nacional Estudiantil de Ciencias del Mar y Medio Ambiente, y publicado como un artículo en una revista científica nacional o internacional (por determinar), por todos los colaboradores del presente proyecto. En el largo plazo, los hallazgos en relación con las características poblacionales, y particularmente con las respuestas biológicas de estrés térmico, nos permitirá distinguir las diferentes capacidades de

aclimatación/adaptación a incremento en la temperatura del agua debido al cambio climático, y con ello establecer medidas de protección y manejo integral de la costa rocosa de Ensenada, en particular, y de Baja California y California en general.