



# **Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur**

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012

.....

Editores: Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota





# **Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur**

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado  
2008-2012

*Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota*

Editores



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

*Diseño gráfico*  
Liliana Ramírez B.

*Diseño editorial*  
Mónica Pérez-Ramírez

*Edición de textos en inglés*  
Diana Leticia Dorantes Salas

**Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur.  
Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012.**  
Editado por Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota.

Primera edición 2012  
D.R.© Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja  
California Sur, México, 23096

ISBN 978-607-7634-07-2

Hecho en México

“Las opiniones expresadas por los autores (textos, figuras y fotos) no necesariamente reflejan la postura de la institución editora de la publicación”

---

# Contenido

Agradecimientos

Presentación

Tutores participantes

## Primera Parte

### MIDIENDO LA BIODIVERSIDAD

<b>Capítulo 1</b>	1
Desarrollo y evaluación de métodos moleculares para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las costas de Baja California Sur Angélica Herrera-Sepúlveda	
<b>Capítulo 2</b>	25
Efecto de <i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943) productor de toxinas paralizantes (PSP) sobre la expresión genética del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) Norma García-Lagunas	
<b>Capítulo 3</b>	51
Respuesta del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y sub-crónica a <i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreicas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos Reyna Romero	
<b>Capítulo 4</b>	76
Asincronía en la especiación asociada con el levantamiento del Istmo de Panamá: el caso de los haemúlidos Jose Tavera	

	<b>Capítulo 5</b>	
Ecomorfología y evolución de la familia Pomacentridae (Perciformes: Labroidi) en el Pacífico Oriental		94
	Rosalía Aguilar-Medrano	
	<b>Capítulo 6</b>	
Composición temporal del fitoplancton en ambiente de arrecife costero en el sureste de la Península de Baja California		122
	Alejandra Torres-Ariño	
	<b>Capítulo 7</b>	
Variabilidad temporal de los ensamblajes de macroalgas en arrecifes rocosos de Bahía de Loreto		145
	Alejandra Mazariegos-Villarreal	
	<b>Capítulo 8</b>	
Macroalgas en bancos abuloneros de la costa occidental de Baja California Sur		165
	Alma Rosa Rivera-Camacho	
	<b>Capítulo 9</b>	
Variación espacio-temporal de la densidad de <i>Acanthaster planci</i> (Echinodermata: Asteroidea) en el Golfo de California		183
	Daniela A. Murillo-Cisneros	
	<b>Capítulo 10</b>	
Estructura comunitaria de asteroideos (Echinodermata: Asteroidea) en Bahía de Loreto		199
	Fabián Cervantes-Gutiérrez	
	<b>Capítulo 11</b>	
Variación estacional, contenido energético y biomarcadores lipídicos –ácidos grasos- de la comunidad planctónica de Balandra, Baja California Sur en un ciclo anual		218
	Nayeli Pedroza-Martínez	

	<b>Capítulo 12</b>	
Variación espacial de la estructura de las comunidades de peces de arrecife en la costa oeste del Golfo de California		230
	Alejandro Aldana-Moreno	

	<b>Capítulo 13</b>	
Señales isotópicas del $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de <i>Megastraea undosa</i> (Wood, 1828), <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) y algunas de sus fuentes de alimento		245
	M. Magali Gómez-Valdez	

	<b>Capítulo 14</b>	
Dieta natural de <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) en arrecifes rocosos de la costa Pacífico de Baja California Sur		256
	Fatima Aguilar-Mora	

	<b>Capítulo 15</b>	
Condición fisiológica de la almeja generosa, <i>Panopea globosa</i> , en Bahía Magdalena, BCS		269
	Laura Margarita Cruz-Gómez	

	<b>Capítulo 16</b>	
Relación trófica entre los peces de arrecife y manglar en La Paz, BCS		284
	Samuel Calderón-Liévanos	

## Segunda Parte

### RELACIONANDO LA BIODIVERSIDAD CON LA VULNERABILIDAD DE LOS ECOSISTEMAS

	<b>Capítulo 17</b>	
Macroalgas en el arrecife del Canal de San Lorenzo BCS después del impacto del buque Lázaro Cárdenas II y el huracán Juliette		296
	Tonatiuh Chávez-Sánchez	

	<b>Capítulo 18</b>	
Revisión del conocimiento actual sobre florecimientos macroalgales en lagunas costeras del Golfo de California		310
	Alejandra Piñón-Gimate	

	<b>Capítulo 19</b>	
Reclutamiento coralino en un arrecife restaurado en La Paz, BCS		330
	Rafael Andrés Cabral-Tena	
	<b>Capítulo 20</b>	
Elementos de dinámica poblacional para el manejo de peces damisela del Golfo de California		346
	Julio Ayala-Aguilar	
	<b>Capítulo 21</b>	
Análisis de la comunidad íctica posterior a un evento de perturbación antropogénica en arrecife de San Lorenzo, Bahía de la Paz, BCS		359
	Briseida Mejía-Torres	
	<b>Capítulo 22</b>	
Estructura de la comunidad íctica de manglar en tres sistemas (Balandra, Enfermería y Zacatecas) y dos periodos (1980 y 2010) en relación con el grado de influencia antrópica		375
	Francisco J. López-Rasgado	
	<b>Capítulo 23</b>	
Pesca incidental en la pesquería de pelágicos menores en el noroeste de México		399
	Sergio Macías-Mejía	
	<b>Capítulo 24</b>	
Índice de fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante el impacto de la pesca de arrastre		412
	Pablo Vega-García	
	<b>Capítulo 25</b>	
Certificación pesquera en países en desarrollo: tópicos recientes y perspectivas de implementación		428
	Mónica Pérez-Ramírez	



---

## *Agradecimientos*

Agradecemos a CONACYT, ya que su apoyo fue primordial para la realización de este libro. Por un lado, la mayoría de los autores fueron beneficiados con becas de posgrado. Por otra parte, el proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros* otorgó el financiamiento que permitió realizar parte de los estudios aquí presentados, y su integración. Otras fuentes importantes de subvención fueron: 1) proyecto SEP-CONACYT 83442 *Identificación molecular y estudio de la regulación de la expresión diferencial de genes, en el ostión del Pacífico Crassostrea gigas, en respuesta a exposición a toxinas marinas*; 2) proyecto CONACYT 50589 *Disponibilidad y aprovechamiento de macroalgas y pastos marinos en ecosistemas altamente productivos*; 3) proyecto CONABIO CT001 *Programa de monitoreo de la restauración de arrecife coralino afectado por el Buque Tanque Lázaro Cárdenas II, y de las comunidades arrecifales de la región del Parque de Loreto, Baja California Sur*; 4) proyecto CONACYT 126574 *Recursos pesqueros masivos de México ante el cambio climático*; 5) proyecto SIP 20121034 *Desempeño productivo de captura y económico-financiero de la pesca deportivo-recreativa de la zona de Los Cabos, B.C.S., México*; 6) proyecto COBI *Uso y manejo de especies de peces e invertebrados de ornato en el Parque Nacional Marino Bahía de Loreto* y 7) proyectos CONANP *Estudio técnico: Desarrollo microregional dentro del marco del área natural protegida Cabo San Lucas* y *Estudio técnico: Análisis y perspectivas para el desarrollo económico y diversificación de actividades dentro del marco del área natural protegida Cabo Pulmo*.

Expresamos nuestro agradecimiento a las instituciones donde los autores estudian y llevan a cabo sus investigaciones: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad

del Mar (UMAR) y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Así como a las instituciones nacionales y en el extranjero que se vinculan a este proyecto proveyendo expertos en diferentes disciplinas para la conformación de comités tutoriales: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidades Mazatlán y Guaymas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN (CICIMAR), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Instituto de Ecología (INECOL), Curtin University, Marine Biological Association (MBA), Universidad Nacional de Colombia, University of California, Université de Liège, UPMC Banyuls y SCRIPPS Institution of Oceanography (SIO).

No podemos dejar de reconocer las aportaciones que han brindado todos y cada uno de los integrantes de los comités tutoriales en CIBNOR: Bertha O. Arredondo Vega, José Alfredo Arreola Lizárraga, Felipe Ascencio Valle, Eduardo F. Balart Páez, Luis Felipe Beltrán Morales, Thelma Castellanos Cervantes, Pedro Cruz Hernández, Juan Antonio de Anda Montañez, Norma Y. Hernández Saavedra, Ana María Ibarra Humphries, Alfonso Maeda Martínez, Enrique Morales Bojórquez, Lourdes Morquecho Escamilla, Gopal Murugan, Alejandra Piñón Gimete, Elisa Serviere Zaragoza, María Teresa Sicard González y Dariel Tovar Ramírez.

Gracias a las personalidades que participan en los comités desde otras instituciones en México: Reyna Alvarado Jiménez, Francisco Becerril Bobadilla, Francisco Benítez Villalobos, Rolando Cardeña López, Gerardo Ceballos Corona, José de la Cruz Agüero, Efraín de Luna, Pablo del Monte Luna, Lloyd Findley, Alma Lilia Fuentes Farías, Silvia Alejandra García Gasca, Gustavo Hernández Carmona, Luis Hernández Moreno, Liliana Hernández Olalde, Eduardo Herrera Galindo, Sharon Herzka Llona, Volker Koch, Antonio López Serrano, Juan Manuel López Vivaz, Daniel Lluch Belda, Marco Antonio Medina,

Germán Ponce Díaz, Héctor Reyes Bonilla, Rafael Riosmena Rodríguez y Oscar Trujillo Millán. En el extranjero: Arturo Acero Pizarro (Colombia), Giacomo Bernardi (Estados Unidos), Jixin Chen (Reino Unido), Bruno Frédéricich (Bélgica), Philip A. Hastings (Estados Unidos), Linda Medlin (Francia), Bruce Phillips (Australia) y Declan Schroeder (Reino Unido).

El trabajo en campo, en laboratorio y en las colecciones fue apoyado por el personal técnico del CIBNOR: Jorge Angulo Calvillo (capítulos 11, 15, 22), Jesús Bautista Romero (15, 22, 23, 24), Horacio Bervera León (7, 15, 17, 19), Noemí Bocanegra Castillo (12, 21), Enrique Calvillo Espinoza (11, 22), Lucía Campos Dávila (4, 5, 12, 21), Laura Carreón Palau (11), Mario Cota Castro (7, 17, 19, 21), Roberto Hernández Herrera (15), Alejandra Mazariegos Villareal (8, 13, 14, 17), Carlos Pacheco Ayub (15, 22, 23, 24), Juan José Ramírez Rosas (7, 8, 13, 19, 21), Delia Irene Rojas Posadas (1, 2, 3, 6) y Arturo Sierra Beltrán (2, 3, 6). Asistencia en otras colecciones biológicas: José de la Cruz Agüero y Víctor Cota Gómez (CICIMAR), Rick Feeney (Los Angeles County Museum), Sandra J. Raredon (Museum of Natural History Smithsonian Institution) y H. J. Walker (SIO). Los autores también agradecen a los compañeros y amigos que participaron directa o indirectamente en los 25 estudios comprendidos en esta obra.

---

## *P r e s e n t a c i ó n*

Diversos foros mundiales han resaltado la necesidad de conciliar la biodiversidad (entendida como la variedad de organismos y ecosistemas) con el factor humano puesto que la biodiversidad representa beneficios ecológicos y socioeconómicos para las generaciones actuales y futuras. Este libro es presentado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y financiado por la Secretaría de Educación Pública (SEP) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros*. La obra compila una serie de tesis recientes que examinan la biodiversidad en los ambientes costeros de Baja California Sur y el Golfo de California. La importancia de estas contribuciones radica en generar dos vertientes de conocimiento para la región: por un lado, mediciones de biodiversidad, que abarcan desde número y composición de especies hasta identificación genética y dominios tróficos. Por otra parte, la relación entre biodiversidad y vulnerabilidad de los ecosistemas en el entendido que los factores ambientales y las actividades humanas provocan impactos y cambios en los ecosistemas y las especies que en ellos habitan.

La historia geológica y evolutiva, la interacción de condiciones ambientales y la diversidad de ecosistemas costeros hacen de Baja California Sur lugar de residencia estacional o permanente para un elevado número de especies acuáticas; algunas de ellas endémicas de la región, esto es, que no se encuentran en ninguna otra parte del mundo. Esta diversidad de ecosistemas costeros se debe a características geográficas, climáticas y topográficas propias de la región. Por ello la marcada diferencia entre ambientes de alta energía situados en el Océano Pacífico y ambientes protegidos en el Golfo de California. Unido a esto consideremos un grado todavía moderado de explotación humana y tendremos

modelos excepcionales de estudio: ecosistemas arrecifales coralinos y rocosos, sistemas submareales rocosos asociados a bosques de macroalgas, lagunas costeras y manglares, que han sido escenarios para la recolección o censos de organismos, el registro de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, clorofila, nutrientes) y ensayos *in situ* con organismos móviles.

Contar con información que permita mejorar el entendimiento de la relación entre biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas es importante para analizar procesos naturales, determinar beneficios y costos ambientales, y pronosticar la respuesta de los ecosistemas ante variaciones climáticas y presión antropogénica. Esta información biológica al interactuar con otras disciplinas (*p. ej.* administración, economía), debe funcionar como marco de referencia para proponer medidas de manejo en materia de biodiversidad tal y como lo sugieren distintos instrumentos y convenios internacionales. En nuestro país, múltiples dependencias federales y estatales, organizaciones no gubernamentales, universidades y centros públicos de investigación llevan a cabo estudios sobre biodiversidad.

Es así como el CIBNOR, en su carácter de centro público CONACYT, produce e integra conocimientos científicos sobre impactos ambientales y antropogénicos y prepara recursos humanos especializados en manejo y conservación de recursos naturales. El proyecto SEP-CONACYT 83339, así como otros proyectos asociados a la Línea Estratégica CIBNOR EP3 *Variabilidad y vulnerabilidad de ecosistemas marinos del noroeste mexicano*, apoyaron la generación de recursos humanos para alcanzar diferentes grados académicos. Sus aportaciones, que exhiben la frescura y energía de jóvenes comprometidos con su investigación, se vieron enriquecidas con la experiencia de sus comités tutoriales conformados por científicos nacionales e internacionales, fortaleciendo las redes de cooperación y la línea de investigación en CIBNOR.

El presente libro, resultado y muestra de lo arriba expuesto, está constituido por veinticinco capítulos organizados en dos partes que en conjunto ofrecen conocimiento científico y teórico sobre la diversidad de especies y su vulnerabilidad ante algunos eventos ambientales e impactos antropogénicos. En la primera parte, se exploran mediciones de biodiversidad en sistemas costeros empleando técnicas moleculares (genética) y métodos tradicionales (taxonomía, índices de variación y relaciones tróficas). Las técnicas moleculares aquí presentadas sirven para monitorear mareas rojas (proliferación de microalgas tóxicas) y sus efectos en mariscos dirigidos a consumo humano y con importancia económica para la región. También se utilizaron técnicas moleculares para estudiar las relaciones de parentesco entre especies de peces, bajo el fundamento de que este ensamblaje de especies es un modelo que aporta pistas sobre la evolución de la vida.

Ante la necesidad de cuantificar la biodiversidad y compararla temporal (épocas del año) y espacialmente (tipos de ecosistema), los Capítulos 6, 7 y 8 abordan la composición y la estructura de comunidades productoras primarias, es decir, productoras de oxígeno: el fitoplancton y las macroalgas mientras que los Capítulos 9 y 10 tratan sobre organismos depredadores de arrecifes de coral. Estos estudios permiten conocer qué especies están presentes, qué patrones exhiben y qué factores influyen en su distribución (temperatura, nutrientes, etc.). Para comprender como es la circulación de nutrientes y energía en algunos sistemas acuáticos, se realizaron análisis tróficos con moluscos y peces.

La segunda parte del libro trata sobre la comprensión del rol de la biodiversidad en el funcionamiento de diversos ecosistemas costeros y su vulnerabilidad considerando la influencia ambiental y/o antropogénica. Así, tenemos como agentes de cambio: el encallamiento de un buque, el paso del huracán Juliette, los florecimientos algales, la instauración de arrecifes artificiales, la extracción de peces de ornato y la pesca comercial. Los Capítulos 17, 18, 19 y 21 tocan

temas como la situación específica de algunos recursos en arrecifes rocosos y coralinos tras el impacto del huracán; la relación entre productores de oxígeno y nutrientes generados por actividad humana en las costas y las necesidades futuras de investigación. También se ha integrado un estudio de caso para examinar los cambios en la comunidad de peces a través de comparaciones espaciales y temporales en tres sitios con diferente grado de impacto humano (Capítulo 22).

En los últimos años, la explotación de recursos se ha intensificado incidiendo en la biodiversidad de los ecosistemas. Los dos capítulos finales presentan algunas aplicaciones que ya integran conocimientos previos en materia de biodiversidad e impactos, en este caso, producidos por la actividad pesquera. En primera instancia, se propone un índice que expresa la fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante la pesca de arrastre. A continuación, la certificación, una herramienta de manejo pesquero reconocida internacionalmente cuyo objetivo es fomentar la pesca sustentable y el menor daño ambiental.

Suele aceptarse que sin investigación científica sobre la diversidad, que sin generar el conocimiento que permita comprender mejor la vulnerabilidad de los ecosistemas y, por ende, articular aproximaciones adecuadas e integrales a los mismos, toda explotación sustentable y la conservación misma serían inviables en el corto o mediano plazo. Es por ello que un libro como el presente, que comunica la investigación recientemente generada en el CIBNOR sobre esta temática, contribuirá a elucidar la respuesta de ecosistemas particulares ante el creciente aumento de la presión generada por las variaciones climáticas y el desarrollo humano.

Consideramos, pues, que el libro ha de ser de interés para todo aquél preocupado —y ocupado— en conocer, aprovechar y conservar la elevada biodiversidad costera de Baja California Sur.

---

## *Tutores participantes*

Línea estratégica EP.3 CIBNOR y Proyecto SEP-CONACYT 83339

### **Bertha O. Arredondo Vega**

Investigador Titular A del CIBNOR, trabaja el tema de metabolismo de ácidos grasos en fitoplancton marino y el papel que desempeñan como biomarcadores de cadena trófica (FATM, por sus siglas en inglés) en ecosistemas marinos costeros.  
[kitty04@cibnor.mx](mailto:kitty04@cibnor.mx)

### **Eduardo F. Balart Páez**

Es biólogo por la Universidad Católica de Valparaíso, Maestro por la Universidad de Kyoto, y Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Su interés se ha centrado en el estudio de la biodiversidad, sistemática y ecología de los peces asociados a manglares, arrecifes, plataforma y talud continental; evaluación y biología de recursos pesqueros potenciales; así como en la ecología y restauración de arrecifes. Es autor de 60 publicaciones y en total ha dirigido 26 tesis de licenciatura hasta doctorado. Actualmente es Investigador Titular en el Programa de Ecología Pesquera, Curador de la Colección Ictiológica, y responsable del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes del CIBNOR. Es miembro del SNI Nivel I.  
[ebalart04@cibnor.mx](mailto:ebalart04@cibnor.mx)

### **Liliana Hernández Olalde**

Es Bióloga Marina (UABCS-2000), con Maestría en Manejo de Recursos Marinos (2003) y Doctorado en Ciencias Marinas (2008) otorgados por el CICIMAR-IPN; Estancia Posdoctoral CIBNOR (2011). Es candidata del SNI. Su investigación se enfoca en la reproducción de animales marinos, especialmente peces: determinación del sexo, maduración gonádica, comportamiento reproductivo y cuidado parental. Ha participado en diversos proyectos de investigación, publicado artículos en revistas especializadas y presentado trabajos en congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido y participado en tesis de licenciatura y posgrado. En el programa de licenciatura (Biología Marina-UABCS) ha impartido cursos sobre biología celular y reproducción.  
[lilianah@uabcs.mx](mailto:lilianah@uabcs.mx)



**Norma Y. Hernández Saavedra**

Es Bióloga egresada de la FES Iztacala (UNAM). Estudio la Maestría en Ecología Marina en el CICIMAR (IPN) y el Doctorado en uso, manejo y preservación de los recursos naturales, con especialidad en Biotecnología, en el CIBNOR. Ha realizado estancias de investigación en Universidad de Oviedo, España y en el IGBMC (Université Louis Pasteur), en Francia. Es miembro del SNI Nivel II e Investigador Titular en el CIBNOR, donde imparte cátedra en Microbiología, Biología Molecular y Celular e Ingeniería Genética. Sus intereses de investigación son la biotecnología y la aplicación de técnicas moleculares para el aprovechamiento y manejo de recursos naturales. Sus proyectos han sido financiados por diversas fuentes, resultando en la publicación de artículos en revistas internacionales indexadas y en la formación de recursos humanos de nivel licenciatura, maestría y doctorado.

[nhernan04@cibnor.mx](mailto:nhernan04@cibnor.mx)

**Salvador E. Lluch-Cota**

Es Biólogo Marino por la UABCS, Maestro en Ciencias por el CICIMAR-IPN y Doctor en Ciencias por el CIBNOR. Se ha desempeñado como coordinador de varios proyectos de investigación en las áreas de variabilidad climática y sus efectos en recursos marinos. Cuenta con más de 25 publicaciones científicas internacionales, diversos capítulos de libro e informes técnicos. Ha dirigido cinco tesis de Licenciatura, cuatro de Maestría y cuatro de Doctorado. En 2007 fue acreedor del Premio Nacional de Ciencia en la categoría Científico Joven. Es miembro fundador de la Sociedad Mexicana de Pesquerías e integrante del SNI Nivel II.

[slluch@cibnor.mx](mailto:slluch@cibnor.mx)

**Alejandra Piñón Gimete**

Realizó estudios de posgrado en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Durante el doctorado trabajó con florecimientos macroalgales y su relación con nutrientes de tipo antropogénico en lagunas costeras del estado de Sinaloa. Ha participado en varios proyectos y comités tutoriales como investigador asociado en el CIBNOR. Actualmente, se encuentra en el segundo año de estancia posdoctoral en el mismo centro, bajo la dirección de la Dra. Elisa Serviere, desarrollando investigación sobre florecimientos macroalgales de la Bahía de La Paz. Es Candidata del SNI.

[apinon@cibnor.mx](mailto:apinon@cibnor.mx)

**Elisa Serviere Zaragoza**

Realizó estudios de licenciatura, maestría y doctorado en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en la línea de Botánica Marina. Trabajó como Profesor Asociado en el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y actualmente es Investigador Titular del CIBNOR y miembro del SNI Nivel II. Sus líneas de investigación son Ecología Marina y Ecología Trófica. Cuenta con 48 publicaciones, 7 capítulos de libro y un Catálogo Onomástico (Nomenclátor) de las algas bentónicas marinas de México. Ha participado en la formación de alumnos de licenciatura (12) y de posgrado (14). Desde 2009, es Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR.  
[serviere04@cibnor.mx](mailto:serviere04@cibnor.mx)



---

De izquierda a derecha: Eduardo F. Balart Páez, Elisa Serviere Zaragoza, Norma Y. Hernández Saavedra, Salvador E. Lluch-Cota y Liliana Hernández Olalde

Formación de recursos humanos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Capítulo	D	D	D	D	D	D	M	L	L	L	L	M	L	L	M	L	L	P	M	L	L	D	M	M	D	
Estatus	c	c	c	c	t	c	t	t	t	t	c	t	t	t	c	c	t	c	t	c	c	c	c	t	t	t
Bertha O. Arredondo Vega											d															
Eduardo F. Balart Páez				d	d			d	d	d	d						a		d		d		a			
Liliana Hernández Olalde*																d										
Norma Y. Hernández Saavedra			d	d	d																					
Salvador E. Lluch Cota						a				a					d	a				a		d		d	d	d
Alejandra Piñón Gimate*												a					a									
Elisa Serviere Zaragoza								d	d				d	d	a		d	d				a				
Tutores en CIBNOR**	3	3	4	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Tutores externos	1	1	3	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	0	1	0	0	1	1	0	2	2	1	3	

\* = Investigadores posdoctorantes del proyecto; \*\* = no incluye a los investigadores del proyecto; L = licenciatura; M = maestría; D = doctorado; P = posdoctorado; c = tesis en curso; t = tesis terminada; d = director de tesis; a = asesor de tesis.



## Capítulo 2

---

Efecto de *Gymnodinium catenatum*  
(Graham, 1943) productor de  
toxinas paralizantes (PSP) sobre  
la expresión genética del ostión  
del Pacífico *Crassostrea gigas*  
(Thunberg, 1793)

---

**N o r m a**  
**García-Lagunas**

---

CIBNOR  
Becaria CONACYT 46321

## Resumen

El ostión *Crassostrea gigas* es una especie filtro-alimentadora, acumuladora de toxinas PSP, que son neurotoxinas asociadas a microalgas tóxicas producidas durante los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) como *Gymnodinium catenatum*. Este estudio describe los efectos de exposición aguda (24 horas) del dinoflagelado sobre ostiones juveniles cultivados (1-3 mm). Los ostiones fueron alimentados con tres concentraciones del dinoflagelado (300=TR1, 3,000=TR2 y 30,000=TR3 cel/mL) y una dieta control de *Isochrysis galbana*. Los efectos de *G. catenatum* en el ostión se determinaron mediante tasas de aclaramiento y análisis de la expresión de los genes TRYP, P21, CHR, EF2, TUB, ACT y r28S. *G. catenatum* produjo estrés fisiológico en el ostión, la tasa de aclaramiento en todos los tratamientos disminuyó significativamente ( $p = 0.05$ ). Fue detectada sobreexpresión significativa ( $p = 0.05$ ) en los genes involucrados en la regulación de ácidos nucleicos (P21 y CHR) durante las primeras 6 horas, con mayor sobreexpresión en TR1. El gen EF2 se sobreexpresó significativamente ( $p = 0.05$ ) en TR3 durante las primeras 6 horas. TRYP fue sobreexpresado ( $p = 0.05$ ) después de 6 horas en todos los tratamientos, observándose mayor efecto a las 6 horas en TR1 y a las 24 horas en TR2. El ACT se sobreexpresó significativamente las 24 horas en TR1 y TR2, alcanzando el nivel más alto a las 12 horas en ambos tratamientos; el gen TUB se sobreexpresó en TR2 y TR3 ( $p = 0.05$ ). Esto demuestra que una exposición aguda del ostión a *G. catenatum* induce estrés fisiológico y molecular, modulando la expresión de genes involucrados en varias rutas metabólicas, activando los mecanismos de respuesta a daño celular.

**Palabras clave:** expresión genética, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*

## *Effect on gene expression of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) exposed to *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) paralytic shellfish toxin (PSP) producer*

### *Abstract*

Suspension-feeding bivalves, such as oyster *Crassostrea gigas*, are known to accumulate PSP toxins, which are neurotoxins associated to Harmful Algal Blooms (HABs) species, such as *Gymnodinium catenatum*. This study describes the effects of an acute exposition to this dinoflagellate on youth oysters farmed (1-3 mm). Oysters were fed with three concentrations of dinoflagellate (300=TR1, 3,000=TR2, and 30,000=TR3 cell/mL) and a control diet of *Isochrysis galbana* for 24 hours. The effect of *G. catenatum* in the organisms was observed through clearance rate determination and by gene expression analysis of TRYP, P21, CHR, EF2, TUB, ACT, and r28S. The results showed that *G. catenatum* affects feeding behavior in oysters: clearance rate decreased significantly ( $p = 0.05$ ) as a first response to initial contact in all treatments. Overexpression was principally detected in genes involved in the regulation of nucleic acid at 6 hours for P21 and CHR, with higher expression with TR1. However, EF2 gene showed significant overexpression ( $p = 0.05$ ) only with TR3 during the first six hours. TRYP gene was overexpressed significantly ( $p = 0.05$ ) after 6 hours in all treatments; it was higher at 6 hours in TR1 and 24 hours in TR2. Cytoskeleton gene ACT was overexpressed at 24 hours in TR1 and TR2, reaching higher expression levels at 12 hours in both treatments. On the other hand, TUB gen was overexpressed in TR2 and TR3. These findings show that an acute exposure of oysters to the dinoflagellate *G. catenatum* induces both physiological and molecular stress. Through modulation of the gene expressions involved in several metabolic pathways, this dinoflagellate activates the main mechanisms response against cell damage.

**Keywords:** gene expression, *Gymnodinium catenatum*, *Crassostrea gigas*

## Introducción

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es una especie económicamente importante, debido a su potencial de rápido crecimiento y a su gran tolerancia a las condiciones ambientales. Es una especie filtro-alimentadora, por lo tanto, puede acumular toxinas marinas como resultado de la ingesta de microalgas tóxicas que se producen durante los episodios de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) o mareas rojas (Bricelj & Shumway, 1998). Las toxinas paralizantes de bivalvos o PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), son la variedad de toxinas más conocidas debido a su alta toxicidad aguda y amplia distribución geográfica (Lehane, 2000). Se trata de neurotoxinas, producidas por diversas especies de dinoflagelados, principalmente de los géneros: *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Bricelj & Shumway, 1998; FAO, 2005). Las toxinas PSP reciben este nombre porque en el humano, al ingerir bivalvos contaminados provocan parálisis muscular y en casos graves la muerte; se unen selectivamente y con mucha afinidad al canal de sodio dependiente del voltaje, bloqueando así la neurotransmisión (Bricelj & Shumway, 1998). Por consiguiente, la fisiología de alimentación de moluscos bivalvos sobre dinoflagelados tóxicos es una de las áreas que ha llegado a ser de mayor investigación en estudios relacionados a eventos FAN. Estudios previos han demostrado que los moluscos bivalvos tienen una respuesta de alimentación variable a algas tóxicas: la tasa de acumulación y depuración de toxinas varía ampliamente según la especie (Blanco *et al.*, 2003).

La acumulación también varía dependiendo del tipo de tejido, se ha observado que el 96% de la toxicidad total se encuentra en las vísceras (Mons *et al.*, 1998). Las toxinas se pueden biotransformar aumentando en ocasiones su toxicidad para los mamíferos, entre ellos el hombre (Mons *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2003). En ensayos de laboratorio, se ha demostrado que bivalvos como *C. gigas* alimentados con varias especies de dinoflagelados tóxicos reducen su tasa de filtración, tasa de aclaramiento (Bricelj & Shumway, 1998; Lassus *et al.*, 2000), producen pseudoheces (partículas de alimento no digerido envuelto en mucus) (Bardouil *et al.*, 1993; Wildish *et al.*, 1998; Lassus *et al.*, 2000, 2004), incrementan tasa metabólica (Bricelj & Shumway, 1998), presentan desarrollo reproductivo anormal (Haberkorn *et al.*, 2010) y cambios en la tasa de consumo



de oxígeno (Li *et al.*, 2002). Además, se han encontrado daños a nivel celular, manifestándose inflamación generalizada en los tejidos, principalmente órganos digestivos (Haberkorn *et al.*, 2010), desarrollo anormal, inducción de neoplasia y necrosis (Landsberg, 2002). También se ha observado activación del sistema inmune por ciertas microalgas tóxicas o contrariamente depresión, inhibiendo la capacidad fagocítica y de adhesión de los hemocitos, modulando de esta forma la función y los componentes inmunes celulares (Hégaret *et al.*, 2007).

Por otro lado, los procesos moleculares y rutas metabólicas involucrados en la respuesta celular a toxinas paralizantes aún son desconocidos. Sin embargo, se ha reportado el efecto a nivel bioquímico y molecular de otras ficotoxinas en diferentes organismos. Por ejemplo, cambios en la expresión de genes o proteínas en el sistema nervioso central en ratas y peces debido a la exposición aguda al ácido domoico (toxina producida por diatomeas de los géneros *Nitzschia* y *Pseudo-nitzschia*) afectando la expresión de varios genes involucrados en la transducción de señales y en la regulación de la transcripción (Salierno *et al.*, 2006). Lefebvre *et al.* (2009) mencionan que los factores de transcripción son los primeros en responder a una exposición al ácido domoico.

En moluscos, se ha observado variación en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en *Nodipecten subnodosus* expuesto a *G. catenatum*; CAT y GPX fueron mayores en glándula digestiva, seguido de manto, branquia y músculo, mientras que la actividad SOD disminuyó en branquia y músculo. También se encontró que la exposición a *G. catenatum* incrementa la actividad de tripsina,  $\alpha$  quimotripsina y  $\alpha$  galactosidasa (Estrada *et al.*, 2007). Haberkorn *et al.* (2010) observaron que una exposición a *Alexandrium minimum* produjo un incremento significativo de especies reactivas de oxígeno (EROs) en *C. gigas* diploides y triploides, siendo mayor en estos últimos. La actividad de la profenol oxidasa también disminuyó significativamente en ambos tipos de organismos. Los problemas sobre el efecto de las mareas rojas no son exclusivos de organismos marinos en su medio natural, también se han reportado casos en granjas de cultivo (como en granjas ostrícolas de las costas de California, Oregón y Washington, en E.U.A.) y en las costas mexicanas de Sonora y Baja California, donde los cultivos alcanzaron mortandades de hasta 90%.

## Justificación

En virtud de que las mortandades ocurrieron en zonas de cultivo, es imperativo estudiar el efecto de estas toxinas a nivel fisiológico y molecular, principalmente en juveniles de talla pequeña, debido a que en dicho estadio son más vulnerables ante cualquier tipo de estrés. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la exposición a *G. catenatum*, productor de toxinas paralizantes, sobre la expresión génica en juveniles de ostión del Pacífico *C. gigas*, mediante estudios de exposición aguda y probar estos efectos en tiempo y densidad celular, basados sobre las comparaciones de expresión diferencial de genes, a través de genómica y mejor entendimiento de las vías moleculares afectadas por la presencia de este microorganismo.

## Material y métodos

### Descripción de las cepas de microalgas utilizadas en los bioensayos

Se utilizaron dos cepas de microalgas de la colección del CIBNOR. *Isochrysis galbana* es una microalga flagelada de color amarillo con 2 flagelos móviles, sin pared celular. Mide entre 6 y 8  $\mu\text{m}$ . Crece a temperaturas entre 16 y 35  $^{\circ}\text{C}$ , salinidades entre 25 y 28 ups e iluminación intermedia 150  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ . Por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, en acuicultura, esta especie es muy importante como alimento para las larvas de moluscos bivalvos y de camarón (Bougrier *et al.*, 2003).

*Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-6) es un dinoflagelado desnudo, con formas unicelulares con dos flagelos disimilares; un flagelo nace en una hendidura transversal (sulcus) y otro longitudinal se aloja en una hendidura longitudinal (cingulum). El flagelo transversal es el que provee la mayor fuerza de empuje para el nado de la célula, miden de 34-65  $\mu\text{m}$  de largo por 27-43  $\mu\text{m}$  de ancho, es una especie formadora de cadenas. La cepa GCCV-6 fue aislada de Bahía Concepción, BCS (Band-Schmidt *et al.*, 2005). En México, esta especie se distribuye desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca (Cortés-Altamirano, 1998). Es capaz de producir toxinas paralizantes del tipo C (C1-4), neosaxitoxina

(NEO), gonyautoxinas (GTX1-4), toxinas decarbamoil (dcSTX, dcGTX) (Band-Schmidt *et al.*, 2005) y saxitoxina (STX), que es una de las ficotoxinas más peligrosas por su toxicidad (límite máximo permitido 80 µg/100 g de carne de molusco), hidrosolubilidad y termoestabilidad (FAO, 2005).

### **Cultivo y cosecha del dinoflagelado**

Para cultivar *G. catenatum* se utilizó el medio de cultivo f/2 + Se (Guillard & Ryther, 1975), preparado con agua de mar (35 ups) filtrada con membranas de 0.45 µm y esterilizada en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min). La microalga se propaga en cultivos estáticos de 1,000 mL en matraces Fernbach de 2.8 L. Los cultivos se mantuvieron en el Ceparío del CIBNOR, en cámaras adaptadas con lámparas de luz blanca (irradiación de 150 µE m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>), con ciclos de luz y oscuridad 12:12 h, a una temperatura de 22 ± 1°C. Para monitorear la tasa de crecimiento (número de divisiones/día) y la densidad celular de los cultivos a utilizar en los bioensayos, se tomaron (de todos los cultivos) alícuotas de 1.5 mL por triplicado cada 48 horas, desde el día cero (día de inoculación) hasta que los cultivos alcanzaron la fase de muerte (día 26). Las muestras se fijaron con una gota de lugol (I<sub>2</sub>, 5%/KI 10%), realizándose conteos celulares directos al microscopio utilizando una cámara Sedgwick-Rafter. La fórmula para obtener el número de células/mL fue la siguiente:

$$\text{Número de células/mL} = \text{No. células totales} \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \quad (1)$$

La tasa de crecimiento fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = (\text{Log}_2 B_n - \text{Log}_2 B_o) / (t_n - t_o) \quad (2)$$

donde:  $B_o$  = concentración celular inicial;  $B_n$  = concentración celular final;  $t_o$  = tiempo inicial;  $t_n$  = tiempo final;  $\text{Log}_2$  = logaritmo natural base 2.

Para el reto experimental de exposición de los ostiones, el dinoflagelado fue cosechado en la fase final de crecimiento exponencial (18 días de cultivo). Se prepararon tres mezclas de *I. galbana* y *G. catenatum*, que se utilizaron como dietas para los ostiones para alcanzar la densidad celular deseada los cultivos fueron diluidos o concentrados (según lo requerido). Para el tratamiento con la mayor densidad celular (30,000 cel/mL) varios lotes de cultivo de *G. catenatum* se homogenizaron, se midió el volumen total, se tomaron alícuotas (por triplicado) para el conteo celular, y se cosecharon mediante centrifugación a 800 x g,

10 minutos a 20°C. El sobrenadante se desechó y la biomasa sedimentada fue resuspendida en un nuevo volumen de medio de cultivo para alcanzar la densidad celular requerida para el tratamiento.

### Bioensayos con juveniles de *C. gigas* (3-5 mm)

Se utilizaron organismos diploides de tallas entre 3-5 mm obtenidos del laboratorio de producción “Acuicultura Robles SPR de RI”. Los ostiones se aclimataron en el laboratorio Húmedo de Seguridad Biológica (LHSB, CIBNOR) por un periodo de dos semanas, en recipientes plásticos de 10 L con agua de mar filtrada (0.45µm), con flujo de oxígeno, a 21°C y salinidad controlada (34 ups). La dieta consistió de  $7.5 \times 10^5$  cel/mL de *I. galbana* libre de bacterias, obtenida del Laboratorio de Alimento Vivo del CIBNOR.

Para determinar la respuesta, en términos de expresión génica en juveniles de *C. gigas* expuestos a *G. catenatum* tóxico, se llevó a cabo un bioensayo de exposición aguda (24 h) a tres diferentes concentraciones del dinoflagelado. Los organismos fueron colocados en frascos de vidrio (100 mL), utilizando ½ de su capacidad y un total de 20 organismos. Bajo estas condiciones, los organismos se aclimataron durante cuatro días con una dieta a base de *I. galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel/mL) hasta la realización del experimento. Los frascos contaban con un sistema de aireación constante y se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (clima artificial automatizado). Los ostiones fueron expuestos a diferentes densidades celulares para tener una exposición directa al dinoflagelado tóxico; se prepararon tres tratamientos y el control (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diseño de dietas experimentales.

Tratamiento	<i>I. galbana</i> (cel/mL)	<i>G. catenatum</i> (cel/mL)
TR1	$7.5 \times 10^5$	300
TR2	$7.5 \times 10^5$	3,000
TR3	$7.5 \times 10^5$	30,000
TRC (control)	$7.5 \times 10^5$	Cero

Las mezclas se prepararon con una proporción 1:1 del volumen de las dos microalgas, en un volumen final de 50 mL; cada tratamiento se evaluó por triplicado y se proporcionó en una sola dosis. Se hicieron observaciones de

sobrevivencia y comportamiento alimenticio, para esto último se midió la tasa de aclaramiento (disminución en la concentración de las microalgas por filtración en 24 hr). Este parámetro (TA, en L/h) se calculó mediante la siguiente ecuación (Coughlan, 1969):

$$TA = Ln(N_0/N_t) * M/t \quad (3)$$

donde:  $N_0$  = concentración inicial de la microalga en el medio de crecimiento;  $N_t$  = concentración después de 24 horas;  $M$  = volumen total que se utilizó en la unidad experimental;  $t$  = tiempo después de iniciar el experimento (24 h).

### **Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)**

La extracción del ARN total utilizó la solución AGPC o TRI Reagent. Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (ThermoScientific). La integridad y pureza del ARN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con TBE 1X preparado con agua DEPC. La ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN se verificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) directo, utilizando cebadores universales para el gen 28S ribosomal cg28SF, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3'; cg28SR, 5'-CCTCTAAGTGGTTTCAC-3' (Hernández-Saavedra, 2009). Una vez verificada la ausencia de ADN genómico, se realizó la síntesis de ADNc con el kit First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis se utilizaron 5 µl de ARN a una concentración de 100 ng/µL (total 0.5 µg/µL), 500 µg/mL de oligodT y 0.2 µL (200 U) de transcriptasa reversa.

### **Análisis gen-específico mediante RT-PCR**

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes blanco (Tabla 2), en un tubo Eppendorf de 200 µL se colocaron 1µL de ADNc (300 ng) y 10 pmol de cada primer (1 µL del oligonucleótido F y 1 µL del oligonucleótido R). Aparte, se preparó la mezcla de reacción: por cada reacción se adicionaron 5 µL del buffer 10X PCR (Tris-HCl 100 mM pH 8.3; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 25 mM; gelatina 0.01%), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.2 µL de Taq polimerasa (5 U/µL) y 39.3 µL de agua destilada estéril. La mezcla se homogeneizó con micropipeta y se agregaron 47 µL de esta mezcla a cada tubo que contenía el ADNc y los oligonucleótidos, para completar un volumen final de 50µL. Los tubos se colocaron en el termociclador

(Corbett Palm Cycler) utilizando las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial 95°C, 5 min (1 ciclo), desnaturalización 94°C, 1 min; alineamiento 45°C, 1 min; extensión 72°C, 1 min (40 ciclos) y un periodo de extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR (amplicones) se analizaron en geles de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Se cargaron 10µL de cada amplicón más 1µL del colorante azul de bromofenol (previamente mezclados); la electroforesis se desarrolló en cámaras submarinas horizontales (Mini Sub Cell, Bio-Rad®) a 80 V durante 1 h. Los geles fueron fotodocumentados en un sistema UVITEC (UVP®) bajo las siguientes condiciones: foco 2, aumento 25X y brillo 0.400. Los niveles de expresión se determinaron usando el software UVIDOC V. 97, con el que mediante análisis densitométricos (intensidad de la banda) se obtuvieron los datos, reportados en unidades de intensidad relativa, para cada uno de los genes analizados.

**Tabla 2.** Relación de genes para evaluados en bioensayos de exposición aguda de juveniles de *C. gigas* a *G. catenatum* (productor de toxinas PSP).

Tipo de gen	Gen	Número AC
Regulación de ácidos nucleicos	Regulador proteína p21 (P21)	CB617437
	Cromatina factor 1 P55 subunidad (CHR)	CB617555
	Factor elongación 2 (EF2)	CB617558
Citoesqueleto	Actina, GIA(ACT)	AF026063
	Tubulina (TUB)	CB617442
Regulación proteica	Tripsina (TRYP)	CB617494

### Análisis estadístico

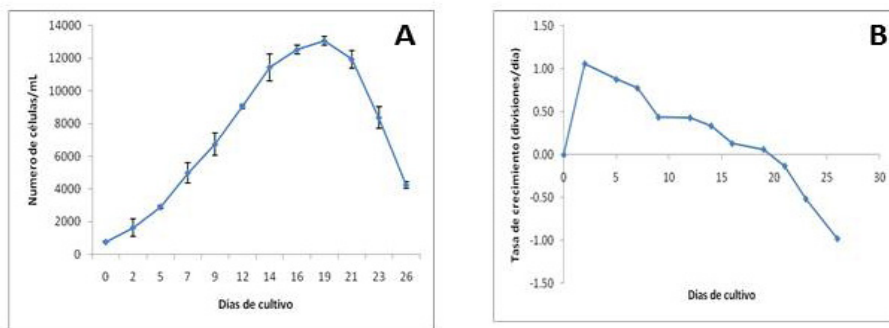
Para la tasa de crecimiento de *G. catenatum* se calcularon promedios y desviación estándar de los datos de las densidades celulares, fueron transformados a logaritmo base 2 para obtener las tasas de crecimiento (número de divisiones/día) y el tiempo de duplicación, con base en la fórmula (2). Las diferencias significativas ( $p = 0.05$ ) entre las tasas de aclaramiento de los tratamientos se calcularon utilizando análisis de varianza del modelo lineal general (ANOVA) de una vía (Statistic 7). Para observar la interacción entre los cuatro tratamientos (*I. galbana* y tres concentraciones de *G. catenatum*) proporcionadas como alimento a *C. gigas* y el tiempo de exposición, se realizaron análisis de varianza de dos vías (Statistic 7) para cada gen, tratamiento y tiempo de exposición, después de probar

las suposiciones de distribución de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas; se hicieron pruebas *a posteriori* para encontrar las diferencias significativas, utilizando la prueba de comparación múltiple de Fisher (LDS); en todos los casos se usó una significancia estadística de  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Curva de crecimiento de *G. catenatum*

En la (Figura 1A) se muestra la curva de crecimiento obtenida para *G. catenatum* en medio f/2. Las máximas densidades celulares se registraron entre los días 17 y 19 de cultivo; después del día 21 de incubación el cultivo entró en fase de muerte acelerada por lo que el conteo celular disminuyó considerablemente. La tasa de crecimiento ( $\mu$ , número de divisiones celulares/día) más alta se registró a las 48 h de cultivo (día 2) y disminuyó lentamente al avanzar la edad del cultivo (Figura 1B). De acuerdo a la gráfica, en el día 19 termina la fase exponencial de crecimiento e inicia la fase de muerte celular; prácticamente no existe una fase estacionaria como tal. Estos parámetros fueron importantes para determinar el tiempo de cosecha de las microalgas (estado fisiológico óptimo/mayor rendimiento de biomasa) y de esta forma preparar las mezclas con las densidades apropiadas para los bioensayos.



**Figura 1.** Parámetros de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* (en medio f/2 + se, a 22°C 35 ups y 150  $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ). Panel A = curva de crecimiento; panel B = tasa de crecimiento (divisiones/día).

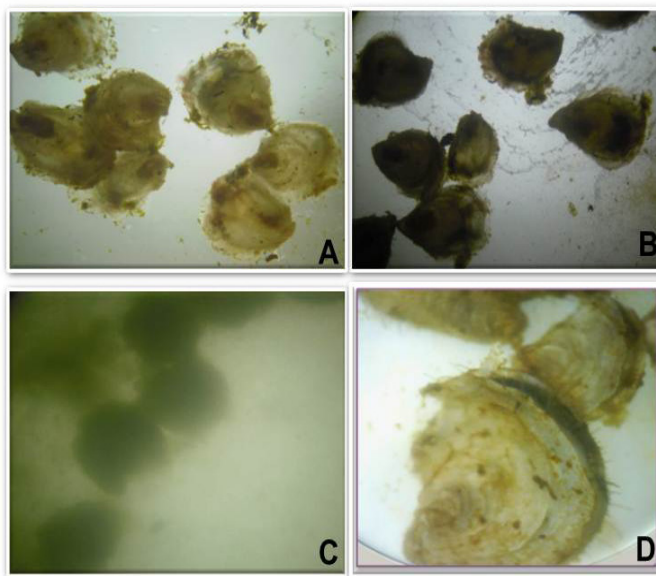
### Observaciones generales del bioensayo

En los juveniles de *C. gigas* retados con tres densidades celulares de *G. catenatum*, se observó cierre parcial y total de valvas, producción de pseudoheces y disminución de la capacidad de filtración, reportada como disminución en la tasa de aclaramiento, que fue más notoria en el TR3. No se presentó mortalidad en ninguna de las réplicas de los tratamientos y el control. En los tratamientos (que contenían *G. catenatum*) se observó cierre inmediato de valvas, retracción del manto (porque no se observaron los cilios que lo rodean) y cese de la alimentación al entrar en contacto con las células tóxicas. En los TR1 y 2, después de 3 h de exposición los organismos iniciaron la producción de pseudoheces en cantidades mínimas en el TR1 (Figura 2A) y ligeramente mayor en el TR2 (Figura 2B), este comportamiento continuó aproximadamente hasta las 12 h de exposición. Sin embargo, en el TR3 los organismos permanecieron cerrados por más tiempo (> 3 h) algunos permanecieron de esta forma hasta las 6 h de exposición, la producción de pseudoheces fue mayor en comparación con los TR1 y 2 (Figura 2C) y continuó después de las 12 h. En el tratamiento control (TRC), el comportamiento de los ostiones fue normal, no se observó cese de la alimentación, retracción de manto, ni producción de pseudoheces; a las 8 h de exposición ya habían removido casi todas las microalgas (Figura 2D).

### Tasa de aclaramiento

Las tasas de aclaramiento (Figura 3) del ostión *C. gigas* para las dos microalgas varió significativamente ( $F = 47$ ,  $p = 0.0002$ ) en los tres tratamientos. En el TR3 se observó una disminución significativa ( $p = 0.05$ ) de *G. catenatum* ( $0.24 \pm 0.08$ ) debido a que en las unidades experimentales de dicho tratamiento los ostiones no alcanzaron a remover completamente el alimento durante el periodo de observación. Además, se puede observar que aunque la densidad celular de *I. galbana* fue la misma en los tres tratamientos y el tratamiento control, al final del experimento *C. gigas* no alcanzó a remover toda la microalga, en comparación con el TRC donde el valor de la TA fue de 0.96, lo que significa que los organismos removieron casi el 100 % en un periodo de 24 h. Estos resultados demuestran que el ostión ingirió al dinoflagelado y no seleccionó las partículas dependiendo de su tamaño.

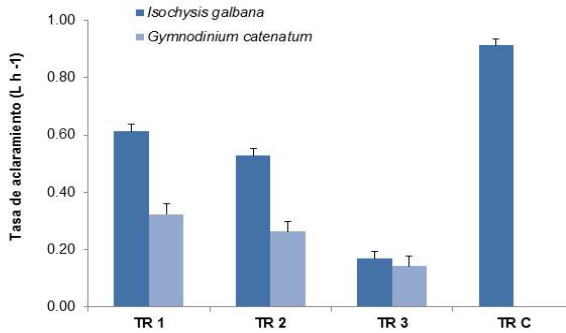




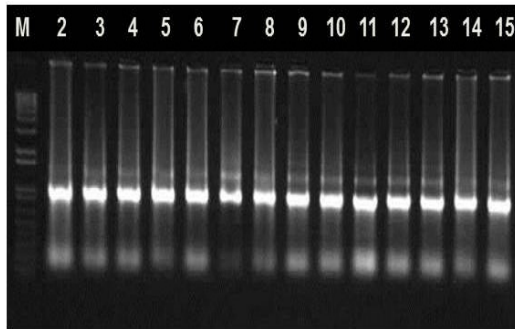
**Figura 2.** Juveniles de *Crassostrea gigas* alimentados con mezclas de *Isochrysis galbana*/*Gymnodinium catenatum*. A = TR1; B = TR2; C = TR3; D = TR C.

### Extracción de ARN total

En la Figura 4 se muestra un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (DEPC), donde se observa la calidad e integridad del material genético obtenido. En ninguna de las muestras se observó degradación; la electroforesis del ARN permitió observar el tamaño de las subunidades ribosomales así como sus proporciones relativas. De este modo, considerando que la subunidad ribosomal 28S del ostión tiene una proporción de 2:1.5 con respecto a la subunidad 18S, se considera que el ARN obtenido es de buena calidad. Una vez que se verificó la ausencia de ADN en las muestras de ARN total, se sintetizó el ADN complementario (ADNc); la eficiencia de síntesis fue alta obteniéndose concentraciones entre los 2,300 y 2,500 ng/ $\mu$ L; el ADNc sintetizado se usó para realizar los análisis RT-PCR.



**Figura 3.** Tasa de aclaramiento de *Crassostrea gigas* al final del experimento (24 h). Tratamientos: TR1 = mezcla de *I. galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel/mL) y *G. catenatum* (300 cel/mL); TR2 = mezcla de *I. galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel/mL) y *G. catenatum* (3,000 cel/mL); TR3 = mezcla de *I. galbana* ( $7.5 \times 10^5$  cel/mL) y *G. catenatum* (30,000 cel/mL); TRC = *I. galbana*  $7.5 \times 10^5$  cel/mL (control).



**Figura 4.** Perfil electroforético en gel de agarosa 1%-TBE de ARN total de muestras del bioensayo de exposición aguda de juveniles de *C. gigas* a *G. catenatum*, en el que se muestra la integridad del material genético extraído. Línea: 1 = marcador de peso molecular (1 Kb Plus Ladder); 2-15 = muestras de ARN total aleatoriamente seleccionadas. Técnica de tinción: Bromuro de Etidio EtBr; condiciones de separación, 80 V, 45 min.

### Análisis gen específico mediante RT-PCR

*Regulación de ácidos nucleicos.* Para los genes relacionados con la regulación de ácidos nucleicos (Figura 5) se puede observar que el gen que codifica para la proteína P21 incrementó sus niveles de expresión desde el inicio del experimento. Con el TR1 se mantiene sobreexpresado durante las 24 h de exposición al dinoflagelado, alcanzando puntos máximos de expresión a la hora 6. Con el TR2 también se mantiene sobreexpresado durante las 24 h de exposición, alcanzando un incremento estadísticamente significativo en la hora 6 ( $p = 0.05$ ).

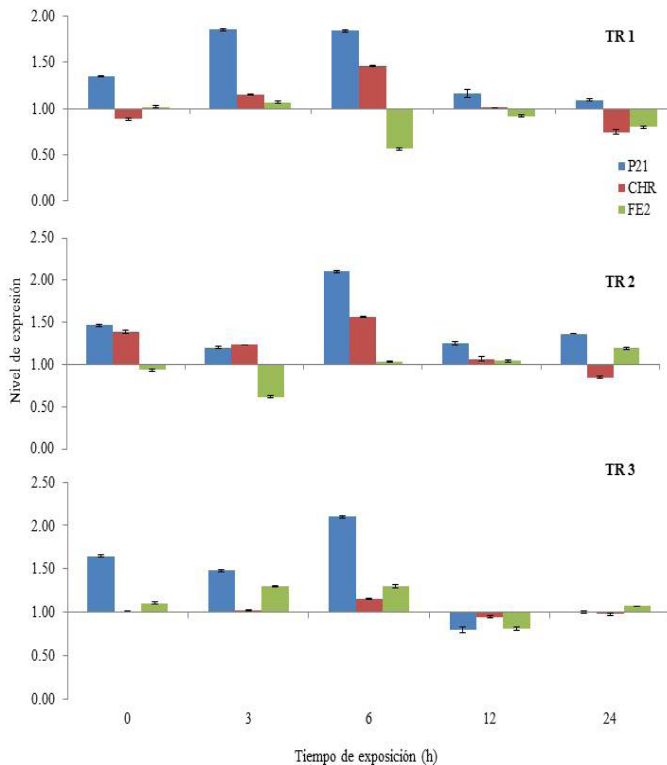
Con el TR3, se observó un comportamiento similar al de los otros tratamientos durante las primeras 6 h, con un punto máximo de expresión en este tiempo. Posteriormente, a las 12 h de exposición la expresión decae hasta reprimirse y a las 24 h se observó un repunte hasta alcanzar un nivel de expresión similar al del control.

En el TR1, el gen que codifica la subunidad p55 del factor 1 de ensamblaje de la cromatina (CHR) solo se sobreexpresa entre las primeras 3 y 6 h de exposición, y decae por abajo del nivel de expresión del TRC a las 24 h. Con el TR2 se observó una sobreexpresión durante las primeras horas de exposición con un incremento estadísticamente significativo a las 6 h de exposición ( $p = 0.05$ ). Posteriormente, al igual que con el TR1, la expresión cae por abajo del nivel de expresión del control a las 24 h. Para el TR3, el comportamiento concuerda con los otros tratamientos durante las primeras 6 h de exposición; a las 12 h la expresión cae por abajo del TRC y a las 24 h se observó un repunte hasta alcanzar el nivel de expresión del control.

El nivel de expresión del gen que codifica para el factor de elongación 2 (EF2), se mantuvo igual que el tratamiento control durante las primeras 3 h de exposición en el TR1, posteriormente los niveles de expresión caen significativamente hasta reprimirse siendo más bajos a las 12 h. En el TR2, el nivel de expresión más bajo se observó a la hora 3, posteriormente se observó un ligero incremento hasta alcanzar el nivel del control, y por último a las 24 h se observó un ligero incremento por arriba del control. En el TR3, el comportamiento fue lo opuesto, el gen se mantiene sobreexpresado entre las primeras 3 y 6 h de exposición, a las 12 h el nivel cae significativamente ( $p = 0.05$ ) por abajo del control. Posteriormente, a las 24 h la expresión aumentó hasta llegar al nivel de expresión del control.

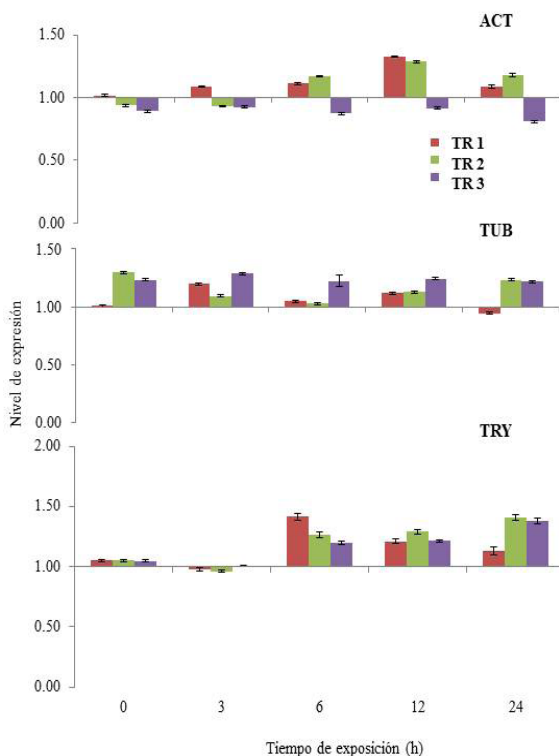
*Citoesqueleto.* En el caso del gen que codifica la actina (ACT), con el TR1 se observó un incremento en la expresión por arriba del control a partir de las 3 h, con un incremento significativo a las 12 h. Con el TR2 la sobreexpresión se registró a partir de las 6 h, también se encontró un incremento estadísticamente significativo a las 12 h. Por otro lado, con el TR3 la expresión del gen se mantuvo reprimida durante las 24 h de exposición, con una disminución significativa

en el nivel de expresión en la hora 24 ( $p = 0.05$ ) (Figura 6). El gen de la tubulina (TUB) presentó mucha variación: con el TR1, alcanzó su punto máximo de sobreexpresión a las 3 h, después a la hora 6 el nivel de expresión disminuyó hasta igualar el del control, a las 12 h nuevamente presentó un ligero repunte por arriba del basal y a las 24 h vuelve a estar en un nivel de expresión igual que el control. Con el TR2, solo se observó una sobreexpresión al inicio y después de las 12 h de exposición, entre las 3 y 6 h de exposición la expresión fue igual que el control. Con el TR3, se observó sobreexpresión desde el inicio del experimento y se mantuvo así hasta el final, el nivel máximo de expresión se registró a las 3 h.



**Figura 5.** Análisis de expresión de genes relacionados con la regulación de ácidos nucleicos de *C. gigas*, expuesto a tres tratamientos (mezcla *I. galbana* y *G. catenatum*). Notación: Proteína P21 (P21), subunidad p55 del factor de ensamblaje de la cromatina (CHR), Factor de elongación 2 (EF2).

**Regulación proteica.** En este grupo de genes solo se detectaron transcritos del gen que codifica para la tripsina (TRY) que permanece igual que en el control, en las primeras horas de exposición; se observó una sobreexpresión en todos los tratamientos a partir de las 6 h. Con el TR1 el valor máximo de sobreexpresión se registró a las 6 h y disminuyó significativamente después de las 12 h ( $p = 0.05$ ) sin llegar a los niveles de expresión del TRC. Con el TR2, también se sobreexpresó a partir de las 6 h con un nivel máximo a las 24 h, este mismo comportamiento se observó con el TR3 (Figura 6). Este comportamiento posiblemente se debe al estrés generado en los organismos al estar en contacto con el dinoflagelado.



**Figura 6.** Análisis de expresión de genes relacionados con proteínas del citoesqueleto y de regulación proteica de *C. gigas* expuesto a tres tratamientos (mezcla *I. galbana* y *G. catenatum*). Notación: Actina (ACT), Tubulina (TUB) y Tripsina (TRY).

*Gen constitutivo* 28S. El gen que codifica el 28S ribosomal fue el que presentó menor variación considerando los tratamientos y los tiempos de exposición, en la mayoría de las condiciones probadas el nivel de expresión se mantuvo igual que el control.

## Discusión

Las toxinas PSP pueden acumularse en los tejidos de los moluscos bivalvos a través de los procesos de alimentación, existen varios estudios que se han enfocado a observar el efecto de la ingesta de dinoflagelados productores de dichas toxinas (Shumway, 1991; Wildish *et al.*, 1998, Bougrier *et al.*, 2003; Hégaret *et al.*, 2007), la cinética de acumulación (Laabir *et al.*, 2007), los mecanismos de depuración (Guéguen *et al.*, 2008) y los daños citológicos (Shumway, 1991). En este estudio, *C. gigas* fue expuesto durante un periodo de 24 horas a diferentes densidades de *G. catenatum*, tratando de emular (con sus obvias limitaciones) el escenario al que se enfrentan los organismos en el ambiente marino, durante su primer contacto en un evento de marea roja o FAN. En este sentido, los organismos mostraron señales visibles de estrés fisiológico en los tres tratamientos, que se observó cómo cierre inmediato de valvas, retracción del manto, producción de pseudoheces y disminución de la tasa de aclaramiento. Estos signos comunes de la exposición a dinoflagelados tóxicos se han observado en moluscos bivalvos y han sido reportadas con anterioridad (Bardouil *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1997; Wildish *et al.*, 1998; Lassus *et al.*, 2000; Bougrier *et al.*, 2003; Laabir *et al.*, 2007), por lo que los resultados obtenidos en este trabajo corroboran esta información.

Por su parte, Laabir *et al.* (2007) reportaron tasas de aclaramiento para *C. gigas* de 0.34 para el dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* (1,000 cel/mL) y 0.26 para *A. minutum* (2,000 cel/mL) en un periodo de exposición de 24 horas, datos que son similares a los encontrados en este trabajo para TR1 y TR2. Bardouil *et al.* (1993), mostraron que la inclusión de un 10% de *A. tamarense* toxica en una dieta produce una reducción del 20% en la tasa de aclaramiento de *C. gigas*. En el presente trabajo, también se observó una disminución en la tasa de aclaramiento y se redujo significativamente ( $p = 0.05$ ) al incrementar la densidad de *G. catenatum*:

para el TR1 el valor de TA fue de 0.32, para TR2 fue de 0.26 y para TR 3 de 0.14. Aunque el tamaño de *G. catenatum* (65-43  $\mu\text{m}$ ) es entre 8-10 veces mayor que el de *I. galbana* (4-5  $\mu\text{m}$ ), el ostión ingirió las dos microalgas ya que al realizar los conteos celulares en la mezclas se encontró una disminución en el número de ambas.

El cierre parcial de valvas y la producción de pseudoheces fueron un indicativo de que *C. gigas* reguló la ingestión de partículas. Con esto se puede decir que en una mezcla de estas microalgas, el ostión no selecciona las células con base en su tamaño, sin embargo, si se observó una preferencia por ingerir *I. galbana*. Este comportamiento se ha observado en otros estudios, donde mencionan que los bivalvos hacen una selección pre ingesta que no depende del tamaño celular, sino de otros factores como: la forma de la célula, su composición bioquímica o por la secreción de algún metabolito (Bougrier *et al.*, 2003). Este mecanismo de regulación en la tasa de aclaramiento o remoción de las células tóxicas, puede estar permitiendo al ostión aprovechar su energía y evitar el daño por la ingesta de toxinas. Sin embargo, no se sabe si el efecto negativo sobre la conducta de alimentación fue causado por la presencia de la toxina paralizante.

En este estudio se observó que una exposición aguda (24 h) de *C. gigas* a *G. catenatum*, es suficiente para que se altere el nivel de expresión de diferentes genes involucrados en varias rutas metabólicas, a través de una sobreexpresión o represión. La expresión de la p21 o WAF1, que funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en G1, está fuertemente controlada por la proteína supresora de tumores p53, como respuesta a una variedad de estímulos de estrés. Esta proteína también puede interactuar con el antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA, por sus siglas en inglés) y desempeña un papel regulador en la replicación del ADN en la fase S de la replicación del ADN y en la reparación de daños en el ADN (Almond & Cohen, 2002). En este trabajo, las primeras 6 horas de exposición de *C. gigas* a *G. catenatum* se observó un incremento de la expresión estadísticamente significativo en los tres tratamientos, lo que podría estar indicando que el organismo está tratando de compensar el daño a nivel celular y de tejidos, así como el daño a las macromoléculas, a través de un incremento en los niveles de ARNm de esta proteína.

El gen que codifica la subunidad p55 del factor I de ensamblaje de la cromatina (Caf-1 p55, por sus siglas en inglés), es una proteína chaperona de histona que desempeña un papel fundamental en la deposición de los nucleosomas en el ADN de nueva síntesis; la subunidad 55 kDa, es un componente de varios complejos proteicos involucrados en la remodelación de la cromatina (Taylor-Harding *et al.*, 2004). Este gen se sobreexpresó principalmente en los TR1 y TR2 durante las primeras horas de exposición, en estos tratamientos los ostiones pudieron aclimatarse a dichas condiciones por lo tanto, para contrarrestar el daño que pudiera estar ocasionando la exposición al dinoflagelado, se generaron cambios a nivel celular como la regulación de la transcripción de genes implicados en la protección y reparación celular.

El factor de elongación 2 (FE2) o translocasa, participa en la elongación durante el proceso de síntesis de proteínas, particularmente en la traslocación que ocurre en el ribosoma cuando el ARNm se corre tres nucleótidos en dirección de su extremo 5'. Este gen se mantiene igual que el control en las primeras horas de exposición en las dosis bajas posiblemente porque, el grado de estrés no es tan severo como con el TR3 donde se sobreexpresa desde el inicio del experimento, probablemente porque el organismo necesitaría una mayor producción de proteínas para contrarrestar dicho estrés, por su parte, Lefebvre *et al.* (2009) mencionan que los factores de transcripción son los primeros en responder a un estímulo a exposición química, una exposición al ácido domoico en el pez cebra provocó una expresión diferencial de un gran número de genes relacionados con la apoptosis.

La actina es frecuentemente usada como un gen constitutivo, sin embargo, en este estudio se observó una clara modulación de la expresión de este gen, tanto entre tratamientos como en tiempos de exposición. Este comportamiento posiblemente se deba a que la situación de estrés que le está generando el dinoflagelado al ostión provoca que el organismo compense a nivel celular este cambio a través de arreglos en el citoesqueleto lo que estaría afectando las diferencias en la expresión del gen. Estos reajustes por factores de estrés como metales, temperatura etc., han sido reportados por Lacoste *et al.* (2001). Los microtúbulos (tubulina) intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de



secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como en la división celular (mitosis y meiosis). En este trabajo, el incremento observado en su expresión probablemente está asociado al estrés ocasionado por la exposición al dinoflagelado, lo que provoca que el organismo aumente la síntesis de diversas moléculas intracelulares, aumentando así el transporte a través de las células para tratar de compensar la situación.

El nivel de expresión del gen que codifica para la tripsina TRY, se mantuvo igual que el control durante las primeras horas de exposición al dinoflagelado, que coincide con las horas en la cual el ostión no ingirió alimento, después de la hora 6 se observó un incremento significativo que coincide con la ingesta de alimento, la actividad de las enzimas digestivas en bivalvos puede ser afectada por una condición nutricional, los cambios en la actividad de estas enzimas son mecanismos usados por los bivalvos para optimizar la ganancia de energía, cuando experimentan alguna variación en su dieta (Siu-Chung *et al.*, 2001). El mejillón *Mytilus chilensis* puede usar la microalga tóxica *A. catenella* como una fuente de alimento ajustando la actividad de carbohidrasas (amilasas, celulasa) y mecanismos de absorción (Fernández-Reiriz *et al.*, 2008). Estrada *et al.* (2007) encontraron que la exposición a *G. catenatum* en *Nodipecten subnodosus* incrementó la actividad de tripsina y  $\alpha$  quimotripsina. Sin embargo, en este trabajo no se podría afirmar que la sobreexpresión de dicho gen sea por el cambio en su dieta, porque como se utilizó el organismo completo y no se separó la glándula digestiva, también podrían estar afectando el nivel de expresión tripsinas exógenas a la glándula.

La respuesta de los organismos ante las toxinas depende de diversos factores, siendo los más importantes las propiedades específicas, físicas y químicas del compuesto y la cantidad a la que están expuestos (Huvet *et al.*, 2004). Las toxinas paralizantes son toxinas termoestables y altamente hidrofílicas, las células blanco donde actúan son las células nerviosas y bloquean específicamente los canales de sodio dependiente de voltaje, se unen de manera reversible al sitio 1 del canal de sodio, bloqueando así el poro (FAO, 2005). Este bloqueo podría funcionar como una señal extracelular para fosforilar o defosforilar proteínas que se encuentran en la membrana celular que a su vez activan segundos mensajeros, ocasionando así una cascada de respuestas alterando a nivel celular la expresión de los genes.

Se ha descrito el comportamiento en organismos expuestos a una sustancia tóxica y como podría estar influenciando la expresión de genes: durante las primeras horas después de iniciada la exposición se empiezan a dar los cambios en la expresión de genes. En tiempos cortos o dosis bajas, los genes que son inducidos tienden a ser adaptativos, protegiendo al organismo de la toxicidad (Denslow *et al.*, 2007). Al incrementarse la dosis, el organismo intenta compensarse mediante la interrupción de ciertas vías metabólicas provocadas por la exposición y nuevas vías metabólicas son activadas resultando en la expresión de un nuevo grupo de genes.

Estos cambios son importantes para que el organismo y son diferentes de los de adaptación y se asocian directamente con la adversidad provocada por el tóxico (Denslow *et al.*, 2007). En el presente trabajo los genes que podrían estar actuando de esta forma serían los de regulación de ácidos nucleicos como P21 y CHR. Al incrementar la dosis o el tiempo de exposición, el organismo no puede adaptarse por mucho tiempo o compensar, por lo tanto se dan efectos adversos como daño a nivel celular, fisiológico, bioquímico hasta llegar a una gran deterioro de la salud del organismo. (Denslow *et al.*, 2007). Estas fases en el comportamiento de exposición a sustancias tóxicas podrían deducirse para *C. gigas* expuesto a las células del dinoflagelado tóxico. Por lo tanto, es imperativo monitorear la expresión de los genes analizados por un periodo de exposición mayor (exposición subcrónica).

Las conclusiones son las siguientes: los efectos fisiológicos de cambios del comportamiento alimenticio, mostraron que los ostiones fueron susceptibles a las células tóxicas con un fuerte estrés en la densidad celular elevada. La tasa de aclaramiento disminuyó significativamente al incrementar la densidad celular. La combinación de las variables densidad celular y tiempo de exposición, modificaron diferencialmente la expresión de los genes analizados. El gen 28S ribosomal, mostró menor variabilidad en su expresión en todos los tratamientos, por lo que podría utilizarse como gen de referencia para análisis de q-PCR. Una exposición aguda a *G. catenatum* representa un estrés de suficiente magnitud para que se active el mecanismo de respuesta a daño celular (P21 y CHR) a una concentración más baja que las reportadas (1,000 - 6,000 cel/mL).

## Referencias

- Almond, J.B. & G.M Cohen. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 16(4): 433–43.
- Band-Schmidt, C.J, J. Bustillo-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, C.H. Lechuga-Devéze, K. Reinhart & B. Luckas. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the Scallop *Argopecten ventricosus* G-B. Sowerby II from Bahía Concepción Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae*, 4: 21–31.
- Bardouil, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier & P. Lassus. 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.*, 12: 417–422.
- Blanco, J., J.M. Franco, M.I. Reyero & A. Moroño. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 158: 165–175.
- Blanco, J., M. Reyero & J.M Franco. 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 42: 777–784.
- Bougrier, S., P. Lassus, M. Bardouil, P. Masselin & P. Truquet. 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Liv. Res.*, 16(4): 347–352.
- Bricelj, V.M. & S.E. Shumway. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.*, 6: 315–383.
- Cortés-Altamirano, R. 1998. *Las Mareas Rojas*. AGT Editor, México, D.F., 161 p.
- Coughlan, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.*, 2: 356–358.
- Choi, M.C., D.P.H. Hsieh, P.K.S. Lam & W.X. Wang. 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Biol.*, 143(5): 927–934.
- Denslow, N., N. Garcia-Reyero & S.D Barber. 2007. Fish and chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Mol. Biosyst.*, 3(3): 172–177.

- Estrada, N., M.D Jesús, A. Campa-Córdova & A. Luna. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 146: 502–510.
- FAO. 2005. Estudio de alimentación y nutrición sobre Biotoxinas Marinas: intoxicación paralítica por mariscos (PSP) *Fisheries Information, Data and Statistics Unit*, FAO, Roma.
- Fernández-Reiriz, M.J., J.M. Navarro, A.M. Contreras & U. Labarta. 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behavior to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.*, 87(4): 245–251.
- Guéguen, M., M. Bardouil, R. Baron, P. Lassus, P. Truquet & J. Massardier. 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Liv. Res.*, 20: 13–20.
- Guillard, R.L.L. & R.H. Ryther. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, 80–85. En: Smith, W.L. & M.M. Chalg (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, Nueva York.
- Haberkorn, H., C. Lamberta, N. Le Goïca, M. Guéguen, M. Moal, E. Palacios, P. Lassus & P. Soudanta. 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.*, 97: 96–108.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors, P. Soudant, C. Lambert, S.E. Shumway, J.B. Bérard & P. Lassus. 2007. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effect on oyster hemocytes. *Mar. Biol.*, 152(2): 441–447.
- Huvet, A., A. Herpin, L. Degremont, Y. Labreuche, J.F. Samain & C. Cunningham. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343: 211–220.
- Laabir, M., Z. Amzil, P. Lassus, E. Masseret, Y. Tapilatu, R. De Vargas & D. Grzebyk. 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Liv. Res.*, 20: 51–57.

- Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M Lange & S.A. Poulay. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortalities of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Organ.*, 46: 139–145.
- Landsberg, J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.*, 10: 113–390.
- Lassus, P., M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner & P. Truquet. 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *J. Nat. Prod.*, 9: 1–12.
- Lassus, P., R. Baron, P. Garen, P. Truquet, P. Masselin & M. Bardouil. 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penzé estuary: environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Liv. Res.*, 214: 207–214.
- Lehane, L. 2000. *Paralytic Shellfish Poisoning: A Review*. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra, Australia.
- Lefebvre, K. A., S.C. Tilton, T.K. Bammler, R.P. Beyer, S. Srinouanprachan & P.L. Stapleton. 2009. Gene expression profiles in zebrafish brain after acute exposure to domoic acid at symptomatic and asymptomatic doses. *Syst. Biol.*, 107: 65–77.
- Li, S.C., W.X. Wang, D.P.F. Hsieh. 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.*, 53: 145–160.
- Mons, M.N., H.P. Van Egmond & G.J.A. Speijers. 1998. *Paralytic Shellfish Poisoning: A Review*. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Holanda, 47 p.
- Salierno, J.D., N.S. Snyder, A.Z. Murphy, M. Poli, S. Hall & D. Baden. 2006. Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.*, 78(4): 350–357.
- Siu-Chung, L., W. Wen-Xiong & D. Hsieh. 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* by two marine bivalves from the South China Sea. *Mar. Biol.*, 139(4): 617–624.
- Shumway, SE. 1991. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier Science Publishers, Nueva York, 1095 p.
- Taylor-Harding, B., U.K. Binné, M. Korenjak, A. Brehm & N.J. Dyson. 2004. p55,

the *Drosophila* ortholog of RbAp46/RbAp48, is required for the repression of dE2F2/RBF-regulated genes. *Mol. Cell Biol.*, 24(20): 9124–9136.

Wildish, D., P. Lassus, J. Martin, A. Saulnier & M. Bardouil. 1998. Effect of the PSP causing dinoflagellate, *Alexandrium* spp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Liv. Res.*, 11: 35–43.