



UNIVERSIDAD DEL MAR

campus Puerto Ángel

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
LA DIATOMEA MARINA *Pleurosigma* sp.
(BACILLARIOPHYTA) AISLADA EN LA BAHÍA DE PUERTO
ÁNGEL, OAXACA EN EL PACÍFICO MEXICANO**

TESIS

Que para obtener el Título Profesional de

Licenciada en Biología Marina

Presenta

Nadia Valeria Herrera Herrera

Director

Dr. David Uriel Hernández Becerril

Co-directora

M. en C. Alejandra Torres Ariño

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2018

Resumen

Pleurosigma W. Smith 1858 es un género diverso con aproximadamente 306 especies, que tiene representantes, estuarinos y marinos. Se encuentran en grandes poblaciones dentro de sedimentos, además de ser un importante miembro de la comunidad porque es abundante y algunas especies forman parte del fitoplancton. En el presente trabajo se describe morfológicamente a *Pleurosigma* sp., y se confirma su pertenencia a la familia Pleurosigmatacea mediante la reconstrucción de la filogenia utilizando la subunidad larga del ARN (LSU). El espécimen se aisló de la bahía de Puerto Ángel, Oaxaca, en el Pacífico mexicano, los cultivos se mantuvieron en medio f/2, con un fotoperiodo de 12:12 h, con luz blanca, y a una temperatura de 24 ± 1 °C. Se identificaron los caracteres morfológicos y reproductivos con microscopía de luz (ML) y confocal (MC), así como microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). La extracción del ADN se realizó con el método de bromuro de hexadecilmetilamonio (CTAB) y se amplificó un fragmento parcial de la LSU. La reconstrucción de la filogenia se realizó con los análisis de máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB). Los cultivos de *Pleurosigma* sp. presentaron crecimiento bentónico con algunas células en flotación, y se observaron posibles gametos. Morfológicamente las células se caracterizaron por presentar valvas ligeramente lanceoladas, con polos apenas desviados en sentido opuesto, ápices muy redondeados, 90-102 μm de largo y 16-19 μm de ancho. Estrías transversales paralelas de 22-25, estrías oblicuas en centro entre 11-13 y ligeramente curvadas en los polos de 10-15 en 10 μm . Los análisis filogenéticos mostraron que *Pleurosigma* sp., se encuentra dentro de la familia Pleurosigmatacea, y en el mismo clado del orden de las Naviculales, el cual está representado por los géneros *Navicula* y *Gyrosigma*. En conclusión, se describe a *Pleurosigma* sp., la cual podría ser nueva especie por las diferencias en las características morfológicas en MC y MET en cuanto al número y patrón de estrías. Se presentan nuevas descripciones y fotografías de estructuras en MC y MET. En cultivo se le puede asignar un tipo de hábitat el cual puede ser mayoritariamente bentónico y ticoplantónico. Se obtuvo una nueva secuencia de *Pleurosigma* para el gen LSU con 779 pb.

Palabras clave: cultivo, diatomea, filogenia, LSU, *Pleurosigma*.

Abstract

Pleurosigma W. Smith 1858 is a diverse diatom genus with approximately 306 species, which has estuarine and marine representatives. Their species may be found in large populations within soft and fine sediments, and it is also an important member of the marine community as a diverse genus and some species are also part of phytoplankton community. In the present work, a putative new species, *Pleurosigma* sp. is described, and its belonging in the Pleurosigmataceae family is also confirmed through the reconstruction of molecular phylogenies using the ribosomal large subunit (LSU) sequences. Isolates were obtained from the bay of Puerto Ángel, Oaxaca, in the tropical Mexican Pacific, and the cultures were maintained in f/2 medium, with a light:dark photoperiod of 12:12 h and a temperature of $24 \pm 1^\circ$ C. Morphological and reproductive characteristics were observed using light (LM) and confocal microscopy (CM), as well as scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). DNA extraction was performed with the cetyl trimethylammonium bromide method (CTAB), and the corresponding fragments were amplified to the ribosomal partial regions of the LSU. The phylogenetic reconstruction was analyzed with maximum likelihood (MLH) and Bayesian Inference (IB) methods. Cultures of *Pleurosigma* sp. showed benthic growth with few cells floating; also, possible gametes. Morphology included solitary cells characterized by slightly lanceolate valves, 90-102 μ m long and 16-19 μ m wide, with poles barely deviated in the opposite direction and rounded apices. Parallel striations (with densities 22-25/10 μ m), oblique striate in center (11-13/10 μ m), and slightly curved at the poles (10-15/10 μ m). Molecular phylogenies showed that *Pleurosigma* sp. clades within the family Pleurosigmataceae, and it was placed in the same clade of the order Naviculales, which was represented by the genera *Navicula* and *Gyrosigma*. In conclusion, it is suggested that *Pleurosigma* sp. is a new species due to the distinctive observed morphological features by CM and TEM like number and pattern of striae. In culture the species should be given a habitat which can be mostly benthic and tychoplanktonic. A new *Pleurosigma* sequence was obtained for the LSU, with 779 bp.

Keywords: culture, diatom, LSU, phylogeny, *Pleurosigma*.

Dedicatoria

Mami: la tortuguita ha salido del huevo y por fin ha llegado a la costa, pronto comenzará una gran aventura hacia el océano.

Diana, Papá y Darla: hicimos un poema con las microalgas.

Agradecimientos académicos

Agradezco a la Universidad del Mar campus Puerto Ángel por la formación de Bióloga Marina que ahora poseo.

También agradezco a CONACYT por el apoyo para ayudante a investigador Nivel III o Emérito del Sistema Nacional de Investigadores (Expediente 13353).

Al Dr. David Uriel Hernández Becerril por haberme aceptado como su alumna y darme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura, permitiéndome expandir mis conocimientos en el mundo del fitoplancton y microscopía, además de colaborar en tres cruceros oceanográficos y proporcionarme una beca.

Debo agradecer también a mi Co-directora la M. en C. Alejandra Torres Ariño quien fue mi mentora a lo largo de mi carrera, enseñarme el amor por las microalgas, además de guiarme, orientarme y darme las herramientas necesarias para el quehacer científico.

A la Dra. Silvia Pajares Moreno por brindarme sus conocimientos, comentarios y apoyo en laboratorio durante el proceso de la tesis.

A la M. en C. Samantha Gabriela Karam Martínez y a la M. en C. Ana María Torres Huerta por su revisiones y comentarios para mejorar este trabajo.

Al Laboratorio de Diversidad y Ecología de Fitoplancton que se encuentra en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Al laboratorio de Micropaleontología y Paleoceanografía, ICML y a su técnico M. en C. Alejandro Rodríguez Ramírez por el apoyo en el uso de su microscopio óptico.

A la M. en C. Irma Wong Chang por su apoyo en el Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática, ICML.

Al servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y a sus técnicos la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga y a la Biol. Yolanda Hornelas Orozco por la toma de fotografías.

A la unidad de Imagenología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM y a los técnicos Dr. Fernando García Hernández y al M.C. Rodolfo Paredes Díaz por la toma de las fotografías de microscopía confocal y electrónica de transmisión.

Al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología, UNAM por la secuenciación de las muestras.

A la M. en C. Nataly Quiroz González por su ayuda en el montaje de las técnicas de extracción y PCR.

Al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la UMAR por permitirme durante más de cuatro años ser parte de su equipo y también por mi formación académica.

A Citlalli de Jesús Flores por la edición de las fotos en Photoshop.

A el Biol. Mar. Oscar Eliel Carreño Reyes por la elaboración del mapa.

A la Dra. María Auxilio Esparza y al M. en C. Francisco Becerril por la obtención de la muestra en campo.

A todas las personas que enriquecieron este trabajo con sus correcciones y comentarios para mejorarlo.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi madre Cristina Herrera por todo su amor y apoyo durante toda mi educación. A mi padre Javier Herrera por apoyo en la locura de ser Bióloga Marina. A mi hermana Diana Yazmín Herrera por ser mi mejor amiga y compañera de aventuras e ideales.

A mi Darliux por ser mi segunda mamá, la mejor maestra del mundo y amiga para toda la vida.

A mis amigos y compañeros de la universidad que a lo largo del camino fueron mi familia, me dieron su apoyo incondicional, con ustedes compartí grandes momentos, aventuras y risas: Laura Penagos, Susana Cabrera, Citlalli de Jesús, Ana Meléndez, Blanca Barrera, Marisol Trejo, Sairi Saraí, Oscar Carreño (nene), Alejandro Ramírez y Gauvain Peláez.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio de Diversidad y Ecología de Fitoplancton con los que he pasado tiempo tan ameno: Román Becerra, Karla Rincones, Ana Mercedes Villareal, Jorge Bixler y Paulina Martin.

A mis amigos del instituto que me apoyaron con materiales, conocimientos y me adoptaron en sus laboratorios: Laura Almaraz, Cassandra Montoya, Laura Gómez, Isaac Guzmán, Ramiro Ramos y Antonio Nava.

Por supuesto al Dr. Francisco Varona Cordero que me brindó su amistad, conocimientos y dedicó tiempo en largas charlas de diferentes temas.

Índice

Índice de figuras.....	x
Índice de tablas	xi
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Diatomeas.....	1
1.3 Morfología.....	2
1.4 Ciclos de vida.....	3
1.5 Importancia ecológica	5
1.6 Análisis molecular y sistemática filogenética	5
1.7 Cultivos	7
2. Antecedentes.....	8
3. Justificación.....	11
4. Hipótesis	11
5. Objetivos.....	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos específicos.....	12
6. Materiales y métodos.....	12
6.1 Obtención de ejemplares	12
6.2 Establecimiento del cultivo	12
6.3 Determinación morfológica y taxonómica.....	13
6.4 Ciclo de vida.....	15
6.5 Extracción de ADN	15
6.6 Purificación	15
6.7 Precipitación de ADN	15
6.8 Amplificación de fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
6.9 Secuenciación.....	16
6.10 Análisis molecular y filogenético.....	17
6.11 Procesamiento de imágenes	17
6.12 Revisión bibliográfica	18

7.	Resultados.....	18
7.1	Clasificación taxonómica	18
7.2	Identificación de la cepa mediante microscopía de luz y confocal	19
7.2.1	Cultivo	19
7.2.2	Reproducción y ciclo de vida	19
7.2.3	Descripciones morfológicas	21
7.2.4	Cloroplasto.....	21
7.2.5	Microscopía de luz.....	21
7.2.6	Microscopía electrónica de barrido	21
7.2.7	Microscopía electrónica de transmisión	22
7.3	Análisis molecular y filogenia.....	29
7.3.1	Sistemática molecular	29
7.4	Revisión bibliográfica	30
7.4.1	Comparación entre especies	30
7.4.2	Especies del género Pleurosigma en el Pacífico mexicano	30
8.	Discusión	42
8.1	Cultivos	42
8.2	Morfología.....	44
8.3	Comparación entre especies	45
8.5	Caracterización molecular.....	47
8.4	Revisión bibliográfica	49
9.	Conclusiones.....	50
10.	Referencias.....	51
11.	Anexos	64

Índice de figuras

Figura 1. Secciones en una frústula de diatomea.....	2
Figura 2. Terminología usada para describir la ornamentación y simetría de una diatomea..	3
Figura 3. Ciclo de vida de diatonemas pennadas.....	4
Figura 4. Bahía de Puerto Ángel, área de estudio.....	13
Figura 5. Cultivo de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía de luz y confocal.....	20
Figura 6. Cultivo de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía confocal.	20
Figura 7. Célula vegetativa de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía de luz.	23
Figura 8. Forma de cloroplasto de <i>Pleurosigma</i> sp..	24
Figura 9. Valva de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía de luz.....	25
Figura 10. Frústula en vista externa de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía electrónica de barrido.	26
Figura 11. Valva en vista interna de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía electrónica de barrido.....	27
Figura 12. Valva de <i>Pleurosigma</i> sp. en microscopía electrónica de transmisión.	28
Figura 13. Secuencia nucleotídica de la diatomea pennada <i>Pleurosigma</i> sp.....	29
Figura 14. Árbol consenso de los análisis de máxima verosimilitud para <i>Pleurosigma</i> sp., utilizando el gen LSU..	32
Figura 15. Árbol consenso de los análisis de IB para <i>Pleurosigma</i> sp.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de datos morfológicos de <i>Pleurosigma</i> sp.....	34
Tabla 2. Listado de especies del género <i>Pleurosigma</i> registradas en las áreas marinas y costeras del Pacífico mexicano.....	37