



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(BIOLOGÍA MARINA)

**Descripción morfológica y metagenómica de larvas de esponjas
excavadoras del género *Thoosa* durante su desarrollo ontogénico**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Biól. Pesq. JESUS MATEO AMILLANO CISNEROS

TUTOR

Dr. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
ICMyL, UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM
Dr. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
Dr. ENRIQUE ÁVILA TORRES
ICMyL, ESTACIÓN EL CARMEN, UNAM
Dra. LAURA SÁNCHEZ VELASCO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

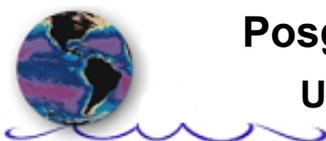


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



Descripción morfológica y metagenómica de larvas de esponjas excavadoras del género *Thoosa* durante su desarrollo ontogénico

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

Biól. Pesq. JESUS MATEO AMILLANO CISNEROS

Director de Tesis: Dr. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO

Comité Tutorial: Dr. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA
Dr. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER
Dr. ENRIQUE ÁVILA TORRES
Dra. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE, 2016

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por haberme brindado ganas de estudiar, por protegerme de todos los peligros que hay en la vida, por darme las fuerzas para lograr esta meta, por haberme dado la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia y amigos una de las etapas más gratas de mi vida.

A mi director de tesis al Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo, porque desde el momento en que entré a su laboratorio me ha brindado su apoyo incondicional, que aunque en un momento por los resultados iniciales de los muestreos yo no creía indicado seguir con este tema, pero por su gran y valiosa experiencia en tal, me mostró que se debía de seguir y que tendría que salir algo aunque la situación no fuese la óptima, por su entera disposición y grandes consejos en plasmar las ideas de una forma clara y adecuado. Jefe como le digo, GRACIAS.

Al Dr. Eric Bautista Guerrero, quien desde el momento en que entré por primera vez al laboratorio del jefe ya en el lejano junio de 2012 y hasta estas fechas, me ha brindado de forma incondicional un poco de su vasto conocimiento, mismo que me ha servido para la elaboración de este trabajo. Gracias por sus enseñanzas, desde el aprendizaje del muestreo hasta ayudarme a comprender un poco le gran área de biología molecular de la que no sabía nada hasta que el momento que me enseñaste aunque aún me falta mucho por aprender. Gracias por los momentos en que no me salía nada de lo de biología molecular en un comienzo y me animaste hasta que me saliera, por tus consejos en cómo hacerle para que al fin me saliera y seguir trabajando en ello, por preocuparte cuando no comía y no tenía tiempo por estar trabajando y después irme a clases, por darme aventón hacia la escuela de idiomas cuando se me hacía tarde, por mover tus piezas para poder entrar a la maravillosa clase de la Dra. Alejandra García donde aprendí, aunque no parezca, más sobre esta área de la que hay mucho que aprender aún. Eric, como te digo aunque tengas un grado de nombramiento superior como es ser Dr., sin tu ayuda no hubiera podido hacer este trabajo, GRACIAS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todo el personal que labora en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, por facilitarme los medios y herramientas que necesitaba para alcanzar esta meta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría.

A mi comité tutorial conformado por Dra. Laura Sánchez Velasco, Dr. José Antonio Cruz Barraza, Dr. Enrique Ávila Torres y Dr. Enrique Martínez Meyer, por su entera disposición y grandes consejos para la elaboración de este trabajo.

Al laboratorio de ecología del bentos donde me encuentro, al Dr. Benjamín Yáñez Chávez, quien fue la primera persona con la cual charlé cuando entré a este laboratorio, por sus múltiples consejos para la organización de los muestreos, por sus regaños, por su apoyo en cada uno de los muestreos de los cuales salió este trabajo, por permitir rentar donde él reside. A mi amigo Benja de laboratorio y casa y hermano de equipo de futbol, gracias.

A mis amigos y colegas de la universidad quienes me ayudaron en los arduos días de muestreo. A Jessica Orrante por ayudarme en cada uno de los muestreos aunque tenías mucho trabajo en tu proyecto y aun así cansada me ayudabas sin condición alguna. Por las diferentes anécdotas que vivimos tanto en el lugar de muestreo, cuando encontrabas las larvas a simple vista, ya ni yo lo hacía, ya no veo moxilla. Por tu comprensión y apoyo cuando te platicaba mis problemas y hacía sentir mejor ante eso. Por las curas que agarrábamos de las cosas que aprendíamos tanto de nuestra área como las de otras ciencias, cuantos universos haber dime entonces. A Yosiris Osuna por su apoyo en un muestreo donde me ayudó con tanto empeño, sé que te apasiona en demasía estos aspectos relacionados con la naturaleza y te emocionó como me dijiste al estar en un lugar como este al cual le llamaste paraíso. Aunque no sé dónde te encuentres ahora pero estoy seguro que lo estás disfrutando como te gusta hacerlo. Al biólogo pesquero José Zamora, el oso, quien un día antes de irnos a uno de los muestreos le pedí si nos acompañara y ayudara, y lo hizo sin importar lo que estaba haciendo en ese momento, mismo muestreo donde vimos y tocamos por vez primera al maravilloso pez y más grande del mundo, tiburón ballena (*Rhincodon typus*), que no ser por su valentía y ánimos, no me hubiese metido donde estaba este coloso marino, bueno eran varios de ellos, hay que admitirlo. A Brianda Ramos y a la Dra. Bety por su apoyo en uno de los muestreos donde como todos fue muy divertido como la anécdota de cuando fuimos al lago cráter junto con Jessica y pisé la iguana muerta y la de cuando pensé que Brianda se me había perdido cuando me ayudo a hacer arrastres en la

bahía, me asusté en serio. A Cinthya Santoyo, quien me ayudó en el último de los muestreos para este estudio el cual fue en el que tuve mayor trabajo, pero que gracias a sus conocimientos sobre filtrado de muestras de agua y organización cuando salíamos a hacer los arrastres y recoger las múltiples cantidades de agua lo pudimos hacer. Aunque en el lugar había ciertos animales que les temes, confiaste en mí y no te pasó nada, sabía que lo harías y superarías eso. Por los ánimos que me dabas cuando no sabía nada de biología molecular, por tantos momentos de diversión cuando íbamos al CIAD y en el laboratorio, por las ricas comidas y postres que hace tu madre y me compartes. Ingeniebría y futura bióloga, gracias.

A los doctores que he conocido en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), a la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por sus maravillosas clases de biología molecular, por el aprendizaje y conciencia que generaba en ellas y por permitirme realizar la parte de biología en su gran laboratorio, al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, por su apoyo en la parte de metagenómica, creo que usted sabe todo sobre las bacterias.

DEDICATORIA

CON TODO EL AMOR Y RESPETO QUE LES TENGO A MIS PADRES,

Les agradezco que me hayan dado la vida, por haberme educado y guiado por el camino del bien.

A mi santa madre, *Ana Bella Cisneros Tirado*, gracias por todo tu amor y apoyo incondicional, por toda tu confianza, por rezar por mí y por mi bienestar, por tus consejos, por recibirme con abrazos y besos cuando tardo días sin ir a la casa, por poner alimento en la mochila antes de irme del pueblo e ir a la escuela, aunque te digo que no lo necesito, siempre lo hago porque estoy atareado en mis cosas y me da mucha alegría que lo sigas haciendo. **GRACIAS MAMÁ, ¡TE AMO!**

A mi santo padre, *Mateo Amillano Zatarain*, gracias por tu amor y apoyo incondicional, por ser el padre más amoroso que una persona podría tener, por ser el más grande ejemplo de lo que es un hombre de bien, por tus consejos, por ser el hombre más trabajador, fuerte, honesto, honrado y justo que he conocido. Como te decimos la mayoría de los tantos hijos que tienes, **GRACIAS PAPI, ¡TE AMO!**

A mis queridos hermanos,

A ustedes, *Lucía Concepción, María Candelaria, Martha Olivia, Moisés, David, Abraham, Ana Gabriela, Elsa Guadalupe y Brayan Antonio*. Gracias por su amor y apoyo incondicional. A **mis hermanas**, en la extensión de la palabra, son unas **damas**, por expresar su apoyo y amor que me tienen a cada momento en que estoy con ellas y al no estarlo también. A mis hermanos, quienes me apoyan en mis decisiones de todo tipo, por las diferentes pláticas que tenemos como las de deporte que me gusta mucho tenerlas con ellos.

A mis sobrinos,

Itzel, Roberto antes Robertín, Gibrand, Juanito, Carlitos, Hilda, Lucía, Mateo y Abrahamcito.

A Robertín, Gibrand y Juanito junto con Brayan cuando jugaba con ellos a tantas cosas como videojuegos, fútbol, el juego que inventamos "colgaeliminados", canicas, me divertía como si fuese aún niño y me gustaba en demasía hacerlo.

A mis mascotas, en especial al negro, gabacho, panfilo, peluso y coyote, que aunque la mayoría ya no están en este mundo, hicieron y han hecho más feliz las diferentes etapas de mi vida. Mi coyote, cuando estudiaba en vos alta para los exámenes, se acostaba y parecía que lo hacía conmigo en silencio, aún creo que aprendía lo mismo que yo o más cuando estudiaba para los exámenes.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
II. HIPÓTESIS.....	4
III. OBJETIVO GENERAL.....	5
III.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
IV. ÁREA DE ESTUDIO.....	6
V. CAPÍTULO 1. ABUNDANCIA Y DISPERSIÓN LARVARIA	
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
V.1 INTRODUCCIÓN.....	12
V.2 ANTECEDENTES.....	14
V.3 OBJETIVOS.....	15
V.4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
V.4.1 Recolección.....	16
V.4.2 Procesamiento de larvas.....	16
V. 5 RESULTADOS.....	18
V. 5.1 Abundancia y dispersión larval.....	18
V. 5.2 Variación temporal de la abundancia de larvas de <i>Thoosa</i> y su relación con la temperatura.....	20
V. 6 DISCUSIÓN.....	21
V.6.1 Abundancia de larvas.....	21

V.6.2 Dispersión de larvas.....	26
---------------------------------	----

VI. CAPÍTULO 2. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y DESCRIPCIÓN

ULTRAESTRUCTURAL

RESUMEN.....	29
ABSTRACT.....	30
VI.1 INTRODUCCIÓN.....	31
VI.2 ANTECEDENTES.....	35
VI.3 HIPÓTESIS.....	37
VI.4 OBJETIVOS.....	38
VI.5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
VI.5.1 Descripción de los cambios morfológicos externos.....	39
VI.5.2 Análisis estadísticos.....	40
VI.5.2.1 Análisis estadísticos para cambios externos en larvas obtenidas de adultos y recolectadas en la zona núcleo Bahía Tiburoneros.....	40
VI.5.2.2 Análisis estadísticos para el número de discos de larvas de <i>Thoosa</i> en sus diferentes fases del desarrollo espicular.....	40
VI.5.3 Descripción ultraestructural.....	41
VI.6 RESULTADOS.....	42
VI.6.1 Cambios externos en larvas obtenidas de adultos y en el plancton de la zona núcleo Bahía Tiburoneros.....	42
VI.6.2 Desarrollo del esqueleto espicular larval.....	44
VI.6.3 Comparación del número de discos de larvas de <i>Thoosa</i> en sus diferentes fases del desarrollo espicular.....	47
VI.6.4 Descripción ultraestructural de larvas obtenidas de adultos.....	48

VI.7 DISCUSIÓN.....	56
VI.7.1 Cambios externos en larvas obtenidas de adultos y en el plancton.....	56
VI.7.2 Descripción ultraestructural de larvas <i>Thoosa</i> obtenidas de adultos.....	57
VI.7.3 Funciones de las células observadas en la larva hoplitomella.....	59
VII. CAPÍTULO 3. DESCRIPCIÓN METAGENÓMICA	
RESUMEN.....	65
ABSTRACT.....	66
VII.1 INTRODUCCIÓN.....	67
VII.2 ANTECEDENTES.....	70
VII.3 HIPÓTESIS.....	73
VII.4 OBJETIVOS.....	74
VII.5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
VII.5.1 Metagenómica de las esponjas <i>Thoosa</i>	75
VII.5.1.1 Recolección de esponjas.....	75
VII.5.1.2 Extracción de ADN.....	75
VII.5.1.3 Amplificación de ADN (PCR).....	76
VII.5.2 Metagenómica del hábitat (agua) donde se encuentran las esponjas	
<i>Thoosa</i>	77
VII.5.2.1 Recolección de muestras de agua y procesamiento para extraer el	
ADN bacteriano.....	77
VII.5.2.2 Extracción de ADN.....	79
VII.5.3 Secuenciación.....	79
VII.5.4 Reporte de secuencias del secuenciador Ion Torrent.....	80
VII.5.5 Análisis bioinformático.....	80

VII.5.6	Análisis de los archivos xls generado por QIIME.....	83
VII.5.7	Análisis estadístico.....	83
VII.6	RESULTADOS.....	84
VII.6.1	Muestras de esponja.....	85
VII.6.2	Muestras de agua.....	86
VII.6.3	Análisis estadístico.....	87
VII.7	DISCUSIÓN.....	89
VII.7.1	Bacterias asociadas.....	89
VII.7.2	Transmisión vertical y horizontal de bacterias.....	91
VIII.	CONCLUSIONES.....	95
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	97
	ANEXOS.....	104

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Larva hoplitomella. (Tomado de Maldonado 2006)	2
Figura 2. Ubicación de la isla Isabel, Nayarit, México.	8
Figura 3. Número de larvas de <i>Thoosa</i> recolectadas en zona núcleo Bahía Tiburoneros (ZNBT) y zona núcleo Las Monas (ZNLN) y suroeste (SW) de la isla y sus respectivas estaciones de recolecta dentro del área de estudio.	19
Figura 4. Variación de la abundancia de larvas de <i>Thoosa</i> en la zona núcleo Bahía Tiburoneros durante el periodo de muestro. Línea discontinua indica la variabilidad temporal de la temperatura del agua.	20
Figura 5. Las tres Manchas Cálidas del Pacífico. Las tres manchas de agua cálida pueden ser vistas en la costa de América del Norte desde Alaska hasta México. La imagen corresponde al 1 de septiembre de 2014 (NOAA).	23
Figura 6. Anomalías de la temperatura superficial del mar en el Pacífico de julio a diciembre durante las fases iniciales de los eventos El Niño de 1982, 1997 y 2015. Los eventos El Niño más fuertes en la historia reciente ocurrieron durante 1982-83, 1997-98 y 2015-16, siendo el último el evento más fuerte registrado por la NOAA (NOAA 2015). La diferencia de El Niño 2015-16 con respecto a los otros, es que previo a este, el noreste del Pacífico ya presentaba temperaturas cálidas anormales a causa del raro fenómeno <i>The Blob</i> o La	24

Mancha Cálida.

- Figura 7.** Discos monoaxonicos en larvas del género *Thoosa*. **A)** Cara externa y **B)** cara interna de un disco de larva *T. calpulli*, **C)** Cara externa y **D)** cara interna de un disco de larva *T. mismalolli*. (Modificado de Amillano-Cisneros 2014) **33**
- Figura 8.** Discos monoaxónicos en larvas de *Thoosa* obtenidas de esponjas adultos y recolectadas en el plancton de la zona núcleo Bahía Tiburoneros. (A) Discos de una larva de *Thoosa calpulli* obtenida de adulto. (B) Discos de una larva de *Thoosa mismalolli* obtenida de un adulto. (C) Discos de *Thoosa calpulli* recolectada en el plancton de la zona núcleo. (D) Discos en *Thoosa mismalolli* recolectada en el plancton de la zona núcleo. **42**
- Figura 9.** Desarrollo del esqueleto espicular de larvas hoplitomella del género *Thoosa* obtenidas de adultos. A) Desarrollo inicial, B) desarrollo medio, C) desarrollo final. **45**
- Figura 10.** Larvas *Thoosa* obtenidas de adulto con diferentes fases de desarrollo. A y B) Larva *T. mismalolli* con desarrollo inicial, C y D) larva *T. mismalolli* con desarrollo final, E y F) larva *T. calpulli* con desarrollo medio, G y H) larva *T. calpulli* sin estilo aparente. A, C, E y G corresponden a las larvas antes de ser degradada. B, D, F y H corresponden a las larvas degradadas con HNO₃. **46**
- Figura 11.** **A)** Corte del cuerpo de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida de un organismo adulto. Barra de escala: 10 µm. **B)** Detalle de un **50**

esclerocito conteniendo un disco monoaxónico de una larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 1 μm . **C)** Célula gris contenida en la capa de células grises. Barra de escala: 2 μm . **D)** Acercamiento de una región de la célula gris. Nótese las inclusiones osmiofílicas, inclusiones fibrilares con colágeno y múltiples partículas de glicógeno presentes en el citoplasma. Barra de escala: 0.5 μm . **Leyendas:** B, bacteria; Cg, célula gris; Cv, célula vacuolar; Dm, disco monoaxónico; Es, esclerocito; Fc, fibra de colágeno; Gl, glicógeno; If, inclusión fibrilar; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; Mh, mesohilo de la esponja adulto; N, núcleo; V, vacuola.

- Figura 12.** **A)** Capa encontrada bajo la capa de células grises de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida de un organismo adulto. Barra de escala: 2 μm . **B)** Acercamiento de una célula vacuolar encontrada bajo la capa de células grises. Barra de escala: 2 μm . **C)** Célula semejante a célula gris ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises. Barra de escala: 2 μm . **D)** Acercamiento de célula semejante a célula gris ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises. Barra de escala: 1 μm . **Leyendas:** AG, aparato de Golgi; B, bacteria; Cg, célula gris; Fc, fibra de colágeno; Gl, glicógeno; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; N, núcleo; V, vacuola; VB, vacuola conteniendo bacteria.

- Figura 13.** **A)** Célula con núcleo prominente ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida

de un organismo adulto. Barra de escala: 5 μm . **B)** Acercamiento de célula con núcleo prominente. Nótese las partículas de glicógeno y bacterias en el citoplasma. Barra de escala: 1 μm . **C)** Acercamiento de la región central de célula con núcleo prominente. Nótese las partículas de glicógeno, bacterias y los múltiples aparatos de Golgi que rodean el núcleo. Barra de escala: 1 μm . **D)** Espacio extracelular de la capa amplia bajo la capa de células grises. Nótese las bacterias, partículas de glicógeno, inclusiones osmiofílicas grandes, vacuolas y bacterias dentro de vacuolas. Barra de escala: 1 μm . **Leyendas:** AG, aparato de Golgi; B, bacteria; Gl, glicógeno; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; N, núcleo; V, vacuola; VB, vacuola conteniendo bacteria.

Figura 14. **A)** Región central de la larva de *Thoosa mismalolli*. Barra de escala: 10 μm . **B)** Acercamiento de célula granular ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Nótese los diferentes gránulos e inclusiones que presenta el citoplasma. Barra de escala: 2 μm . **C)** Acercamiento de célula con forma y tamaño similar a célula granular pero carece de gránulos. Barra de escala: 2 μm . **D)** Célula microgranular ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 2 μm . **Leyendas:** Ar, arqueocito; B, bacteria; Celsn, célula indiferenciada sin núcleo; CG, célula granular; CGsg, célula con forma y tamaño similar a célula granular pero carece de gránulos; G, gránulo; I, inclusión; N, núcleo.

- Figura 15.** **A)** Acercamiento de célula indiferenciada sin núcleo ubicada en la región central de la larva de *Thoosa mismalolli*. Nótese las partículas de glicógeno, inclusiones y vacuolas que presenta el citoplasma. Barra de escala: 1 μm . **B)** Formación de un estilo en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 2 μm . **C)** Acercamiento de un estilo ubicado en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 0.5 μm . **D)** Estructura en forma de triángulo ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 0.5 μm . **Leyendas:** Gl, glicógeno; I, inclusión; V, vacuola. **54**
- Figura 16.** **A)** Región central de la larva de *Thoosa mismalolli* donde se observa la presencia de coanocitos arreglados para formar una cámara. Nótese que alrededor de estas células hay presencia de una gran cantidad de bacterias libres. Barra de escala: 5 μm . **B)** Acercamiento de coanocitos ubicados en la región central de larva *T. mismalolli*. Nótese las partículas de glicógeno, inclusiones y microvellosidades citoplasmáticas, siendo las últimas, características de estas células. Barra de escala: 2 μm . **C)** Acercamiento del espacio entre dos coanocitos ubicados en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 1 μm . **Leyendas:** B, bacteria; Co, coanocito; Gl, glicógeno; I, inclusión; Mc, microvellosidad citoplasmática. **55**
- Figura 17.** Abundancia relativa (% de todas las secuencias) de phyla bacterianos dentro de *Leucetta prolifera*. Los **71**

phyla están enlistados en orden de mayor a menor.
(Tomado de Fromont *et al.* 2015)

- Figura 18.** Curva de rarefacción de esponjas *T. mismalolli* y agua. **82**
En el eje X se muestra el esfuerzo de muestreo efectuado (número de secuencias por muestra). El eje Y representa el número de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) observadas. **Líneas:** roja, esponja adulto con larva; azul marino, esponja adulto sin larva; naranja, esponja larva obtenida de adulto; verde, esponja larva planctónica; morado, agua a 1.5m de profundidad; amarillo, agua superficial; verde azulado claro, agua adyacente a coral 1; rosa, agua adyacente a coral 2.
- Figura 19.** Abundancia relativa (99% de las secuencias) de phyla bacterianos dentro de las larvas de *Thoosa mismalolli* **85**
en distintos estadios de desarrollo (*T. mismalolli* obtenida de adulto y planctónica), adultos de la misma especie (*T. mismalolli* con y sin larva) y muestras del medio circundante donde están las larvas y adultos (agua superficial, 1.5m profundidad, adyacente coral 1 y 2).
- Figura 20.** Distribución de la comunidad microbiana en las **88**
muestras de agua y esponjas en el análisis de componentes principales (ACP) de acuerdo a la presencia de phyla y su abundancia dentro de la muestra. **Marcas:** círculo azul rey, esponja adulto con larva; cuadro naranja, esponja adulto sin larva; rombo rojo, esponja larva planctónica; triángulo boca arriba verde claro, esponja larva obtenida de adulto; cruz gris,

agua adyacente al coral 1; hexágono verde azulado, agua a 1.5m de profundidad; triángulo boca abajo azul cielo, agua superficial; estrella verde oscuro, agua adyacente al coral 2.

- Figura 21.** Modelo de interacción esponja-bacteria. Los círculos representan las bacterias que entran al mesohilo desde el agua de mar, donde algunas permanecen a través del tiempo. Los triángulos representan las bacterias que han sido transmitidas vía los estadios reproductivos y están ausentes en el agua de mar. (Tomado de Hentschel *et al.* 2003) **93**
- Figura 22.** Esquema de la información generada en el presente trabajo. **94**

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de las larvas parenquímula <i>Cacospongia mollior</i> y <i>Scopalina lophyropoda</i> . (Modificado de Uriz <i>et al.</i> 2008)	36
Tabla 2. Resultados de la ANOVA no paramétrica para discos de larvas de <i>Thoosa calpulli</i> y <i>T. mismalolli</i> obtenidas de adultos y de arrastres de plancton. <i>Tc</i> y <i>Tm</i> de adulto, larvas obtenidas de esponjas adultos; <i>Tc</i> y <i>Tm</i> de plancton, larvas recolectadas en el plancton.	43
Tabla 3. Número de discos monoaxónicos registrados en las larvas de <i>Thoosa calpulli</i> y <i>T. mismalolli</i> obtenidas de adultos y de arrastres de plancton.	44
Tabla 4. Resultados de la ANOVA no paramétrica para discos de larvas de <i>Thoosa calpulli</i> en sus diferentes fases del desarrollo espicular. <i>Tc D ini</i> , larvas <i>T. calpulli</i> con desarrollo inicial; <i>Tc D med</i> , larvas <i>T. calpulli</i> con desarrollo medio; <i>Tc D fin</i> , larvas <i>T. calpulli</i> con desarrollo final.	47
Tabla 5. Resultados de la ANOVA paramétrica para discos de larvas de <i>Thoosa mismalolli</i> en sus diferentes fases del desarrollo espicular. <i>Tm D ini</i> , larvas <i>T. mismalolli</i> con desarrollo inicial; <i>Tm D med</i> , larvas <i>T. mismalolli</i> con desarrollo medio; <i>Tm D fin</i> , larvas <i>T. mismalolli</i> con desarrollo final.	48
Tabla 6. Comparación entre algunas plataformas de secuenciadores de ADN. Los precios (\$) están dados en	68

dólares americanos. (Modificado de Mardis 2008)

- Tabla 7.** Protocolo de preparación de la mezcla maestra para amplificar el gen ARNr 16S mediante PCR. **76**
- Tabla 8.** Listado de secuencias totales y secuencias limpias y cortadas de las muestras de esponjas y agua. **81**

RESUMEN

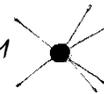
Las esponjas excavadoras, como las del género *Thoosa*, son responsables de la mayor parte de la bioerosión interna de los arrecifes coralinos y son capaces de retirar en forma de partículas hasta 23 kg por m² por año de material coralino. De los 8 tipos de larvas que existen en las esponjas, la larva hoplitomella del género *Thoosa* tiene una capacidad de dispersión única. En el presente estudio se cuantificó la abundancia y la capacidad de dispersión de estas larvas en muestras de plancton recolectadas a diferentes distancias de la isla Isabel (Nayarit), desde julio de 2014 a noviembre de 2015. También se describieron los cambios morfológicos externos e internos de la larva mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión, comparando las recolectadas en el plancton, con las extraídas de organismos adultos, así como la comunidad bacteriana asociadas a ellas mediante metagenómica. Los resultados mostraron la influencia de fenómenos climáticos (*The Blob* o La Mancha Cálida y El Niño) sobre la abundancia de las larvas, siendo muy baja cuando se dieron estas condiciones, en comparación con años anteriores. En relación a la dispersión, se comprobó la gran capacidad de dispersión al recolectar larvas a 2 km de la costa más cercana. Con respecto a los cambios morfológicos externos, destaca la reorganización de las estructuras de flotación (estilos) a lo largo de su desarrollo. Inicialmente, los estilos atraviesan el cuerpo de la larva. A continuación, algunos estilos atraviesan el cuerpo de esta y otros se organizan desde la mitad del cuerpo, sobresaliendo hacia fuera del mismo. Finalmente, los estilos se colocan desde el centro de la larva y todos sobresalen hacia fuera de esta estructura. El estudio al TEM determinó la presencia de grandes cantidades de bacterias (algunas en proceso de fagocitosis), partículas de glicógeno e inclusiones lipídicas, las cuales confirman la hipótesis de que la larva posee reservas energéticas que le permiten desplazarse durante su estadio planctónico. El estudio metagenómico confirmó la presencia de una gran variedad de bacterias (48 phyla), y la existencia de transmisión vertical y horizontal de bacterias, lo cual sugiere que algunas bacterias son simbiosis mientras que otras son consumidas por la esponja mediante fagocitosis bacteriana. En resumen, la larva hoplitomella *Thoosa*, presenta estructuras que cambian durante su desarrollo larvario, una gran variedad de bacterias, diferentes células que contienen partículas de glicógeno e inclusiones lipídicas, las cuales confirman que la larva hoplitomella del género *Thoosa* posee una enorme capacidad de dispersión.

Palabras claves: Larvas, hoplitomella, *Thoosa*, abundancia, dispersión, temperatura, morfología, ultraestructura, metagenómica.

ABSTRACT

Boring sponges such as the genus *Thoosa* are the responsible for most of the internal bioerosion of the coral reef. They are capable of removing up to 23 kg by m² by year in the form of small particles of coral material. The larva hoplitomella of *Thoosa* is one of the eight types of sponge larvae, which has long distance dispersal capability. In this study was defined the abundance and dispersion capacity of these larvae during the period sampling from July 2014 to November 2015. The sponge larvae were collected at different distance from Isabel island (Nayarit). Also, was described external e internal morphologic changes of the larvae by optical and electron transmission microscopy, comparing samples collected in plankton with those extracted from adult organisms. Besides, using metagenomics technique, was described the bacterial community present in these larvae. The results have demonstrated that the larval abundance was significantly lower in the summer months comparing to previous studies, because during our study there were two extreme climatic events (The Blob and El Niño). In relation to the dispersion, was proved the great dispersal ability of the larva because it was collected at 2 km off the nearest coast. It was observed the changes that occur in the styles organization of the larvae during their development inside the adult sponge. At the beginning of the larval development, the styles are crossing the larval body. In the next developmental stage, some styles continue crossing the larval body and others are arranged from the middle of the body and protrude out of the larvae body. Finally, the styles are organized from the center of the body and protrude out of the larvae body. The TEM study showed the presence of a lot of bacteria (some in phagocytosis process), glycogen particles and lipid inclusions, which confirms the hypothesis that this larvae have energy reserves that allow it to live long time as a full planktonic larvae. The metagenomics study confirms the clear existence presence of a great variety of bacteria (48 phyla), and vertical and horizontal transmission, which indicate that some bacteria are symbionts of the sponges and others are prey of these organism by bacterial phagocytosis. In summary, the hoplitomella *Thoosa* has structures that change during its larval development, a variety of bacteria and different cells that contain lipids and glycogen particles, which confirm that larvae of *Thoosa* has a great capacity for dispersal.

Key words: Larvae, hoplitomella, *Thoosa*, abundance, dispersion, temperature, morfology, ultrastructure, metagenomics.



I. INTRODUCCIÓN GENERAL

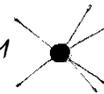
Las esponjas (phylum Porifera) son organismos acuáticos multicelulares que no poseen tejidos ni órganos verdaderos. En esencia una esponja es una agrupación de células que funcionan juntas (Carballo *et al.* 2008). Los miembros de este Phylum presentan características que las distinguen del resto de los animales, como son la presencia de poros y canales a través de todo su cuerpo (excepto las esponjas carnívoras), razón por la que se las llamó Porifera, significando en latín *porus* = poro y *ferre* = poseer o llevar (Gómez 2002).

Las esponjas constituyen el primer grupo animal en términos evolutivos, y son muy importantes para entender la evolución del resto de los metazoos (Carballo *et al.* 2008). Existen al menos 15,000 especies (Hooper y Van Soest 2002) siendo la clase Demospongiae con 6,000 especies descritas, la más importante (Hooper y Van Soest 2002). Los organismos de la subclase Tetractinomorpha (Demospongiae) se caracterizan por ser ovíparos. A su vez, en algunos órdenes de esta subclase se encuentran especies ovovivíparas y vivíparas. Como ejemplo, el orden Astrophorida incluye género ovovivíparos como *Alectona* y *Thoosa*, y el orden Hadromerida el género vivíparo *Stylocordyla* (Vacelet 1999; Sarà *et al.* 2002; Borchiellini *et al.* 2004; Ereskovsky 2010).

De las múltiples formas de esponjas existentes, las excavadoras son el tipo más común de organismos perforadores macroendolíticos y responsables de la mayor parte de la bioerosión interna de los arrecifes coralinos (Perry 1998).

La importancia ecológica de este tipo de esponjas radica en que son capaces de destruir y modelar estructuras coralinas, retirando hasta 23 kg por m² por año de material coralino (Spencer y Viles 2002) en forma de partículas pequeñas, las cuales posteriormente llegan a ser parte de la fracción fina del sedimento del arrecife. Así, las esponjas desempeñan un papel clave en el reciclamiento del CaCO₃ (Carballo *et al.* 2008).

Dentro del grupo de esponjas excavadoras están incluidas especies de los géneros *Aka*, *Alectona*, *Cliona*, *Pione*, *Sphaciospongia* y *Thoosa* (Carballo *et al.* 2004). Dentro del phylum Porifera, existen 8 tipos de larvas (amphiblastula, calciblastula, trichimella, cinctoblastula, clavablastula, parenquímula, dispherula y hoplitomella), las cuales presentan características de desarrollo y de comportamiento muy propias entre los distintos grupos taxonómicos (Maldonado 2006). Las especies del género *Thoosa* (Hancock 1849) son un



tipo de esponjas excavadoras que habitan dentro de los corales u otros sustratos calcáreos, y presentan larvas planctónicas, al igual que las del género *Alectona*, que son conocidas como hoplitomella (término propuesto por Vacelet 1999) (**Fig. 1**).

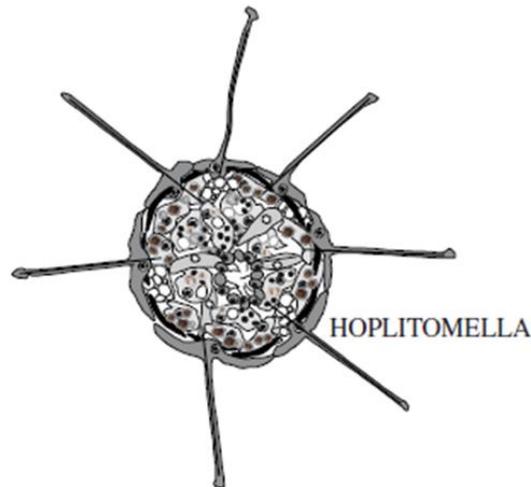
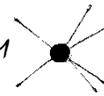


Figura 1. Larva hoplitomella. (Tomado de Maldonado 2006)

La larva hoplitomella presenta características muy diferentes a los restantes tipos de larvas de esponjas como son el poseer unas proyecciones o estilos que sobresalen de su cuerpo, mismas que le sirven para flotar en el plancton, siendo esta una estrategia de permanencia en este medio y de posible dispersión, similar a la presentada por otros organismos microscópicos como los radiolarios (Belmonte *et al.* 1997; Vacelet 1999; Maldonado y Bergquist 2002; Maldonado 2006; Bautista-Guerrero *et al.* 2010; Ereskovsky 2010). Además, esta larva a nivel ultraestructura presenta elementos de diferentes tipo como células grises, partículas de glicógeno, bacterias y hasta coanocitos (Garrone 1974).

Es poco conocida la función ecológica de esta larva de esponja en el medio planctónico, ya que no se sabe si consume mediante filtración u otro mecanismo algún microorganismo, porque aún no se conoce si en esta etapa de desarrollo ya presenta coanocitos funcionales. También se ignora si la larva es consumida por algún tipo de organismo. Sólo se sabe que los organismos adultos donde provienen las hoplitomella, se alimentan de microorganismos mediante filtración y cumplen la función de perforar estructuras de carbonato de calcio como corales, contribuyendo de este modo al ciclo del carbonato de calcio en el medio donde están presentes.

La finalidad de este trabajo fue determinar la capacidad de dispersión, describir la variación en el número discos y los cambios en la organización de los estilos (cambios



externos), así como los cambios que suceden nivel ultraestructural (presencia de reservas energéticas de glicógeno, lípidos y bacterias) y en la comunidad de bacterias (metagenómica) que presentan las larvas del género *Thoosa* en sus diferentes etapas del desarrollo ontogénico.

II. HIPÓTESIS

La larva hoplitomella presenta una mayor capacidad de dispersión en el plancton porque posee estructuras de flotación externas, y a nivel ultraestructural, tiene elementos tales como partículas de glicógeno, lípidos y bacterias, así como procesos de fagocitosis bacteriana que le sirve como aporte de reservas energéticas.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de dispersión de las larvas del género *Thoosa*, describir los cambios tanto externos como a nivel ultraestructural que muestran en sus diferentes etapas del desarrollo ontogénico y describir la comunidad de bacterias que presentan estas estructuras, así como las esponjas adulto donde provienen las larvas y el ambiente donde se encuentran estos organismos.

III.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Capítulo 1

- 1- Cuantificar la abundancia de larvas planctónicas del género *Thoosa*.
- 2- Determinar la capacidad de dispersión de larvas planctónicas del género *Thoosa*.

Capítulo 2

- 1- Describir los cambios morfológicos externos (discos y estilos) de las larvas del género *Thoosa* durante su desarrollo y durante la fase de vida libre.
- 2- Describir la ultraestructura de la larva de *Thoosa mismalolli* en desarrollo dentro de una esponja adulto.
- 3- Describir la presencia de elementos (bacterias, acumulación de granos de glicógeno y lípidos) y procesos (fagocitosis de bacterias) que pueden servir a la larva como reserva de energía.

Capítulo 3

- 1- Describir la comunidad bacteriana presente en los distintos estadios de las larvas de *Thoosa mismalolli* (dentro del adulto y planctónica), la contenida en las esponjas adultos de la misma especie y la que está en el medio circundante (ambiente) donde están las larvas y los adultos.
- 2- Comparar la comunidad bacteriana presente en los estadios de las larvas de *Thoosa mismalolli*, la contenida en las esponjas adultos de la misma especie y la que está en el medio circundante donde están las larvas y los adultos.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

La Isla Isabel es una isla tropical que pertenece al municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. Su posición geográfica es 21°52'30" N y 105°54'54" W, y se encuentra localizada a 28 km de la costa del estado de Nayarit y a 61.5 Km al NE de las islas Mariás (**Fig. 2**).

Es de origen volcánico, con una altitud máxima de 140 msnm (Ríos-Jara *et al.* 2008), una superficie de 82.16 ha, una longitud máxima de 1.8 km y un ancho promedio de 0.7 km. La isla se encuentra en la provincia biogeográfica Panámica que se extiende desde el sur de California, EUA, hasta Perú (Briggs 1974).

Presenta 4 caras muy bien delimitadas por sus características fisiográficas y tipos de fondo. La cara norte es una zona con fondos de arenas gruesas y formaciones rocosas con pendientes abruptas, que forman paredes de hasta 25 m de profundidad. Ésta es, junto con la cara oeste, una zona muy dinámica a causa de su exposición al oleaje y corrientes. La zona este se caracteriza por 2 formaciones rocosas (Las Monas) que sobresalen del mar alrededor de 15 metros y están rodeadas en el fondo por canto rodado y sustratos mixtos como rocas y arenas. La cara oeste es una zona de planicies compuesta de rocas volcánicas que llegan a formar estructuras, como canales, huecos y hoyos en el fondo marino, es el área con las condiciones más extremas y de mayor dinámica debido al intenso oleaje y corrientes. La bahía que se forma en la parte sur de la isla es la de mayor variedad de hábitats. En ella se encuentran arrecifes polimorfos compuestos de roca volcánica, cuevas de grandes dimensiones, paredes y monolitos, y se presentan las condiciones más estables en cuanto a oleaje y corrientes, por lo que es un área de resguardo natural para las especies de peces e invertebrados bénticos que residen en la isla (Ríos-Jara *et al.* 2008). Los animales característicos que habitan en esta isla son iguanas, falsos coralillos y cangrejos ermitaños en tierra y, en aire, pájaros bobos de patas azules (*Sula nebouxii*) y fragatas o tijeretas (*Fregata magnificens*).

La bahía tiene una profundidad media de 5-7 m, y en los bordes se desarrolla una comunidad coralina constituida principalmente por especies del género *Pocillopora* que construyen matrices arrecifales discontinuas, siendo *Pocillopora damicornis* y *P. verrucosa* las especies más representativas. La comunidad coralina posee la mayor riqueza de corales en la zona central del Pacífico mexicano (Bautista-Guerrero 2010). En esta bahía se

concentra la mayor diversidad de organismos acuáticos de la isla que incluyen esponjas, moluscos, crustáceos, equinodermos y peces.

En la isla sobre el lindero de Las Monas, existen otras formaciones coralinas de forma dispersa a una profundidad entre 3-6 m.

Esta isla, por decreto federal (publicado en el Diario Oficial de la Federación el 8 de diciembre de 1980), fue declarada como Parque Nacional. En el 2000 pasó a ser Área Natural Protegida. Esta isla se encuentra incluida como Sitio Ramsar en la Lista de Humedales de Importancia Internacional. Actualmente la administración de la isla es responsabilidad del Instituto de Ecología de la UNAM junto con la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

En esta isla existe presencia temporal de investigadores, pescadores, turistas y una localidad denominada Campamento Isla Isabel.

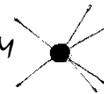


Figura 2. Ubicación de la isla Isabel, Nayarit, México.



Capítulo 1

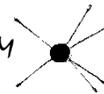
ABUNDANCIA Y DISPERSIÓN LARVARIA



RESUMEN

En este capítulo se cuantificó la abundancia y se determinó la capacidad de dispersión de la larva hoplitomella *Thoosa*. Esto se llevó a cabo realizando arrastres planctónicos en dos zonas núcleo y en distintas estaciones alejadas con referencia al área de estudio isla Isabel, Nayarit. Previo a este trabajo, los reportes de esta larva mostraban que los picos de máxima abundancia larval se presentaban generalmente en los meses de verano. No obstante, en el presente, esto cambió de manera muy significativa, ya que la abundancia se vio ampliamente reducida durante esta temporada. Esta reducción larval fue a causa de que justo un mes antes de que comenzara el periodo de muestreos (junio 2014), se presentó un raro fenómeno que se denominó *The Blob* o La Mancha Cálida, el cual ocasionó un incremento anormal de la temperatura del agua de esta zona de muestreos y siguió manifestándose hasta julio de 2015 y después, dando lugar al evento El Niño el cual perduró hasta enero del presente año y, según la NOAA, ha sido el evento más fuerte registrado. Aunque esta abundancia se vio reducida en estos meses, en noviembre de 2014 y 2015, en especial 2014, la abundancia larval fue un tanto similar a la presentada en los meses cálidos en años anteriores y esto se puede explicar al analizar las temperaturas de estos noviembres donde fue muy similar a las presentadas en los meses veraniegos de años anteriores con temperaturas normales. Por lo tanto, las esponjas de este género usaron algún mecanismo de sobrevivencia para aletargar de alguna manera su periodo reproductivo cuando la condición fue adversa a causa de las temperaturas anómalas y, cuando mejoró la situación, estos organismos continuaron su ciclo productivo. Si bien, el número de larvas no fue lo suficientemente alto como para tener una mayor posibilidad de encontrarlas a una distancia significativa respecto a la isla y zonas núcleo, aun así se pudo recolectar algunas larvas a diferentes distancias (una larva 200m SW isla, una larva 200m y 2km S de zona núcleo bahía tiburoneros). El haber encontrado estas estructuras a tales distancias, es indicativo que la larva (a pesar de no tener estructura alguna de nado a comparación de otros tipos de larvas) puede resistir tiempo en el agua como para lograr ser encontrada tan lejos ya que el tamaño de esta es muy pequeño (<300 μm) respecto a la inmensidad del mar. Además, estas al ser planctónicas, están a merced de las corrientes superficiales imperantes, mismas que cambian de dirección de acuerdo a la época del año y pueden acarrear a las larvas en distintas direcciones respecto al lugar donde comúnmente se encuentran.

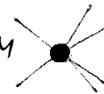
Palabras claves: Larva, hoplitomella, *Thoosa*, abundancia, temperatura, La Mancha Cálida, El Niño, dispersión, corrientes superficiales.



ABSTRACT

In this chapter was defined the abundance and dispersion of the hoplitomella *Thoosa*. This was carried out making planktonic tows in two nucleo zones and different stations respect to study area Isabel island. Before this work, the reports of this larvae shown that the pick of abundance usually occur in summer's months. Nevertheless, in the present study this was different because a previous month sampling (june 2014), in the area of study was present a rare fenomen called The Blob, wich caused a noncomun increase of water temperature and then led to the event El Niño which lasted until January of this year and, according the NOAA, has been the strongest ever recorded event. In november 2014 and 2015 the larval abundance and the seawater temperatura was like in the warm months in previous years. The sponges *Thoosa* used a survival mechanism to accommodate their reproductive period when the condition was adverse because of the abnormal temperaturas and, when improved this situation, they continued their reproductive period. Although the number of larvae found was not high enough, some were collected at different distances from the island (one larvae at 200 m SW island, one at 200 m y one at 2 km S nucleo zone Bahía Tiburoneros). The having found these larvae in this distances, is indicative that the larvae can remain in the water to be found away, even though it is small ($<300 \mu\text{m}$) compared with the sea. Further, these planktonic larvae can be carried by surface currents to different directions away where they are commonly found.

Key words: Larvae, hoplitomella, *Thoosa*, abundance, temperature, The Blob, El Niño, dispersion, surface current.

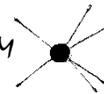


V.1 INTRODUCCIÓN

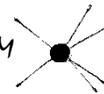
La dispersión de invertebrados sésiles depende de sus estadios de vida libre (propágulos sexuales principalmente), y de aspectos relacionados con señales químicas, duración del período larvario, comportamiento de nado, y características asociada con el asentamiento (Zimmer y Butman 2000; Harii *et al.* 2007, Uriz *et al.* 2008). Generalmente las larvas de esponjas meroplantónicas son tradicionalmente clasificadas como lecitotróficas (no se alimentan) con limitadas habilidades de nado y de dispersión, siendo la filopatría un patrón común dentro de las larvas de la clase Demospongiae (Bergquist y Sinclair 1968; Zea 1993). Sin embargo, algunos autores (Rützler *et al.* 1980; Vacelet 1999) sugieren que la larva hoplitomella, como la del género *Alectona*, aunque no posea capacidad de nado, presenta una gran capacidad de dispersión, ya que hay reportes de haberlas encontrado en altamar lejos de donde se encuentran las poblaciones parentales (Karawaiew 1896; Rützler *et al.* 1980; Vacelet 1999; Maldonado 2006).

Las proyecciones que presentan algunos organismos planctónicos tales como larvas de esponjas (hoplitomella) y radiolarios sirven como aparato de flotación. Adicionalmente, estas proyecciones podrían cumplir un papel clave en la supervivencia de los organismos durante la fase planctónica (Belmonte *et al.* 1997), tal vez, en la protección contra ciertos depredadores. La larva hoplitomella tiene un aparato especial de flotación que aprovecha las fuerzas viscosas del agua, evitando su hundimiento. Se caracteriza por poseer de 6 a 10 espículas largas que incrementan su área superficial sin adicionar masa significativa al cuerpo; estrategia similar a la desarrollada por los radiolarios y otros organismos microscópicos no ciliados del plancton (Maldonado y Bergquist 2002; Maldonado 2006). Las puntas de estas protuberancias están recubiertas de una estructura orgánica translúcida, de la que se cree que también está vinculada con la flotabilidad de estas larvas y con los cambios de posición en la columna de agua (Maldonado 2006; Bautista-Guerrero *et al.* 2010; Amillano-Cisneros 2014).

En particular, la dispersión larvaria es desconocida para la mayoría de las especies de esponjas debido al tamaño de la larva, lo que hace muy difícil entender la distribución de las esponjas (Uriz *et al.* 2008; Winston 2012). Sólo se conoce la dispersión de larvas a pequeña escala cerca de las poblaciones parentales (larva lecitotrófica).

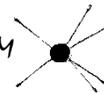


El propósito de este capítulo fue determinar la capacidad de dispersión y la abundancia de larvas del género *Thoosa* a través de muestreos realizados en la zona donde habitan las esponjas parentales y se asientan las larvas, y en diferentes puntos distantes en mar abierto.



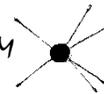
V.2 ANTECEDENTES

Las larvas de las esponjas exhiben distintos comportamientos, y tienen diferentes capacidades de dispersión (Mariani *et al.* 2005). Por ejemplo, el potencial de dispersión de las larvas parenquímula a pequeña escala, depende de sus estructuras de nado (posición y tamaño de cilios) características de comportamiento (tipo de nado, sensibilidad a la luz) y de la presencia de reservas de energía (glicógeno, lípidos y fagocitosis de bacterias) (Uriz *et al.* 2008). La presencia de larvas de esponjas lecitotróficas como la parenquímula, ha sido reportada muy ocasionalmente en estudios de plancton. Sin embargo, existen reportes de haber encontrado larvas tipo hoplitomella en alta mar (Karawaiew 1896; Rützler *et al.* 1980; Vacelet 1999; Maldonado 2006; Ereskovsky 2010). Maldonado (2006) menciona que la flotabilidad de estas larvas depende de su aparato de flotación (forma radial con 6-10 espículas largas) porque al incrementar su área superficial evita el hundimiento en el agua. En este sentido, Belmonte *et al.* (1997) señalan que las proyecciones que presentan algunos organismos planctónicos son una importante estructura de flotación y, además asume que tales estructuras cumplen una función clave en la supervivencia de organismos durante la fase planctónica.



V.3 OBJETIVOS

- 1- Cuantificar la abundancia de larvas planctónicas del género *Thoosa*.
- 2- Determinar la capacidad de dispersión de larvas planctónicas del género *Thoosa*.



V.4 MATERIAL Y MÉTODOS

V.4.1 Recolección

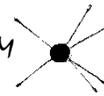
Los muestreos para recolectar las larvas de la esponja *Thoosa* se realizaron a diferentes intervalos de tiempo desde julio de 2014 hasta noviembre de 2015 siguiendo esta estrategia.

Muestreos en zonas núcleo: Se entiende como zona núcleo a la zona donde se asientan las poblaciones de esponjas excavadoras. Para el presente trabajo se utilizaron dos; las comunidades coralinas que están en Bahía Tiburoneros, y las formaciones coralinas que se encuentran en colindancia con los islotes Las Monas. Para recolectar las larvas se implementaron dos estrategias de muestreo. Primero, con una manga de plancton de 22 cm de diámetro de boca y una luz de malla de 80 μm , se realizaron arrastres entre 1 y 2 m de profundidad durante 5 minutos. Segundo, se realizaron arrastres en las inmediaciones de las colonias de coral mediante un sistema neumático diseñado a partir del recolector eléctrico de plancton horizontal (HOPLASA) (Rützler *et al.* 1980).

Muestreos en las zonas de dispersión: Se entiende como zona de dispersión a la zona de mar abierto frente a la zona núcleo. Teniendo esto en consideración, se establecieron estaciones al sur de Bahía Tiburoneros, este de Las Monas y suroeste de la isla a 200 m, 2, 4 y 8 km de distancia y se realizaron arrastres de plancton superficiales (1-2 m) y profundos (6-8 m) durante 5 minutos con una manga de 22 cm de diámetro y luz de 80 μm . Todo el muestreo se realizó por triplicado. Las mangas de plancton fueron provistas de un sensor CRESSI-SUB que registró la profundidad y temperatura durante cada arrastre, y de un HOBO® PendantTemp/Light Data Logger programado para obtener temperatura del agua para analizar si la presencia de larvas en la columna del agua se puede relacionar con la temperatura en el medio.

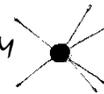
V.4.2 Procesamiento de las larvas

Después de realizar cada arrastre, las muestras obtenidas se almacenaron en diferentes contenedores y se anotó el día, la hora, la estación, la distancia, las coordenadas, la estrategia de muestreo y el número de revoluciones de flujómetro. Las larvas se separaron en un laboratorio de campo, el cual se instalaba provisionalmente en la isla durante cada muestreo. Esto se hizo tamizando en una malla de 150 μm las muestras con agua obtenidas de los arrastres y el producto del tamiz se observó con un microscopio estereoscópico



(lupa) para lograr ver, contar y separar las larvas de las esponjas del género *Thoosa*. Una vez separadas, estas se conservaron en alcohol al 96%.

Además, para cada muestreo se obtuvo la temperatura promedio mensual del agua de la zona núcleo Bahía Tiburonerros para posteriormente determinar la posible relación entre las variables temporales en la abundancia de las larvas y la temperatura del mar.



V.5 RESULTADOS

V.5.1 Abundancia y dispersión larval

La mayor abundancia de larvas de *Thoosa* se presentó en noviembre de 2014 y 2015. En el primer año, la abundancia fue mayor con 84 larvas en total y en 2015 sumó un número de 37 larvas encontradas.

La zona núcleo Bahía Tiburoneros (ZNBT) fue la que presentó mayor abundancia: en julio de 2014 se encontraron 8 larvas en esta zona y se recolectó una a 200 m y otra a 2 km de distancia respecto a dicha área, siendo esta última la mayor distancia en la que se ha encontrado una larva de *Thoosa*. No se encontraron larvas ni a 4 ni a 8 km al sur de esta zona núcleo. En septiembre únicamente se encontraron 4 larvas. Mientras que en noviembre, se encontró la mayor cantidad de larvas en el periodo de muestreo con 80 larvas. En enero de 2015, en esta misma zona se encontraron sólo 7 larvas y, en marzo sólo una. En junio incrementó el número de larvas encontradas en la bahía con 13 y en noviembre hubo un nuevo incremento con 26 larvas (**Fig. 3**).

En la zona núcleo de Las Monas (ZNLM), no se pudieron hacer arrastres en julio debido a que las condiciones marinas de la zona no lo permitieron. En septiembre únicamente se hicieron arrastres a 200 m y 2 km al este de la ZNLM y no se obtuvo ninguna larva. En noviembre se hizo arrastre tanto en la zona núcleo como en las estaciones correspondientes, pero únicamente se encontraron 3 larvas en esta zona. En enero y marzo de 2015 se hicieron arrastres de la misma manera, sin embargo, no se encontró larva alguna. En junio se encontraron 2 larvas en la ZNLM, mientras que en noviembre se encontraron 11, el mayor número de larvas para esta zona en el periodo de muestreo (**Fig. 3**).

También se planeó realizar arrastres en las estaciones de 200 m, 2, 4 y 8 km al suroeste de la isla que está orientada hacia las islas Marías, aunque no fuera una zona núcleo. En julio y septiembre no se hicieron arrastres en estas estaciones. En noviembre, se realizaron arrastres en las 4 estaciones y de ellas, solamente se obtuvo una larva en la estación de 200 m. En enero de 2015 se hicieron arrastres en las mismas estaciones y no se encontraron larvas. En marzo no se hicieron arrastres en estas estaciones porque de los realizados en zona núcleo BT se encontró sólo una larva. En junio y noviembre tampoco se realizaron arrastres (**Fig. 3**).

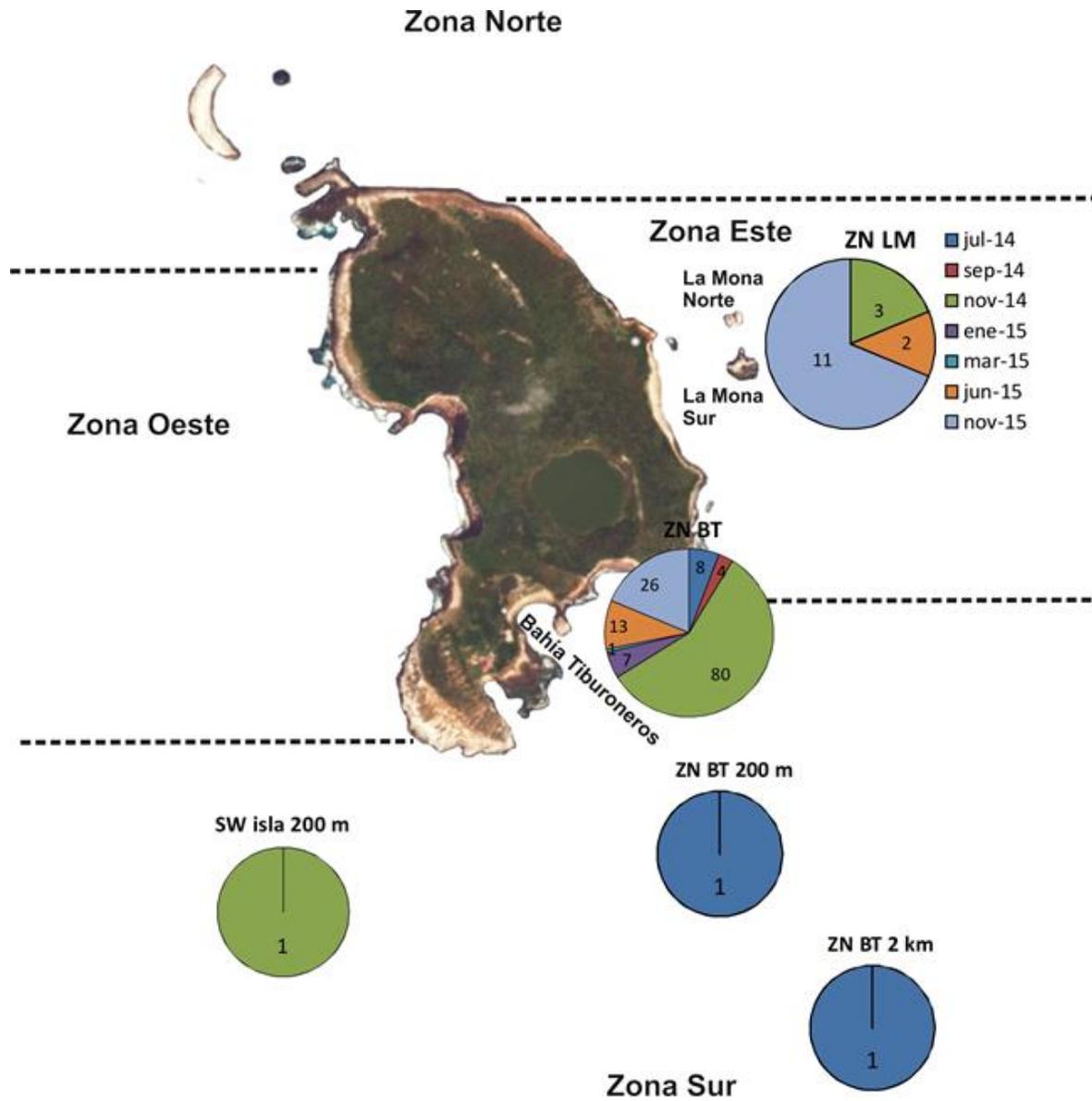
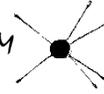
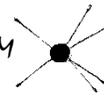


Figura 3. Número de larvas de *Thoosa* recolectadas en zona núcleo Bahía Tiburoneros (ZNB) y zona núcleo Las Monas (ZNLN) y suroeste (SW) de la isla y sus respectivas estaciones de recolecta dentro del área de estudio.



V.5.2 Variación temporal de la abundancia de larvas de *Thoosa* y su relación con la temperatura

Para poder realizar esta relación entre abundancia larvaria y la variable temperatura, se consideró únicamente el número de larvas recolectadas en la zona núcleo de Bahía Tiburoneros, por ser la única zona donde se encontraron larvas en todos los muestreos realizados. La temperatura son datos de temperaturas promedio mensuales del agua del mismo periodo de cuando se recolectaron los organismos.

La temperatura presentó un patrón anual con valores altos en el verano (entre 30.1 y 31.6 °C) y bajos durante el invierno (entre 22.2 y 24.3 °C). Los meses con las mayores cantidades de larvas de *Thoosa* encontradas en el periodo de estudio, fueron un mes después de que la temperatura promedio marcó entre 27.4 y 30.8 °C (noviembre de 2014 y 2015). En cambio, los meses en que se registraron las menores cantidades de larvas, fueron un mes después de que la temperatura promedio marcó <24.3°C y >31.5 °C (Fig. 4).

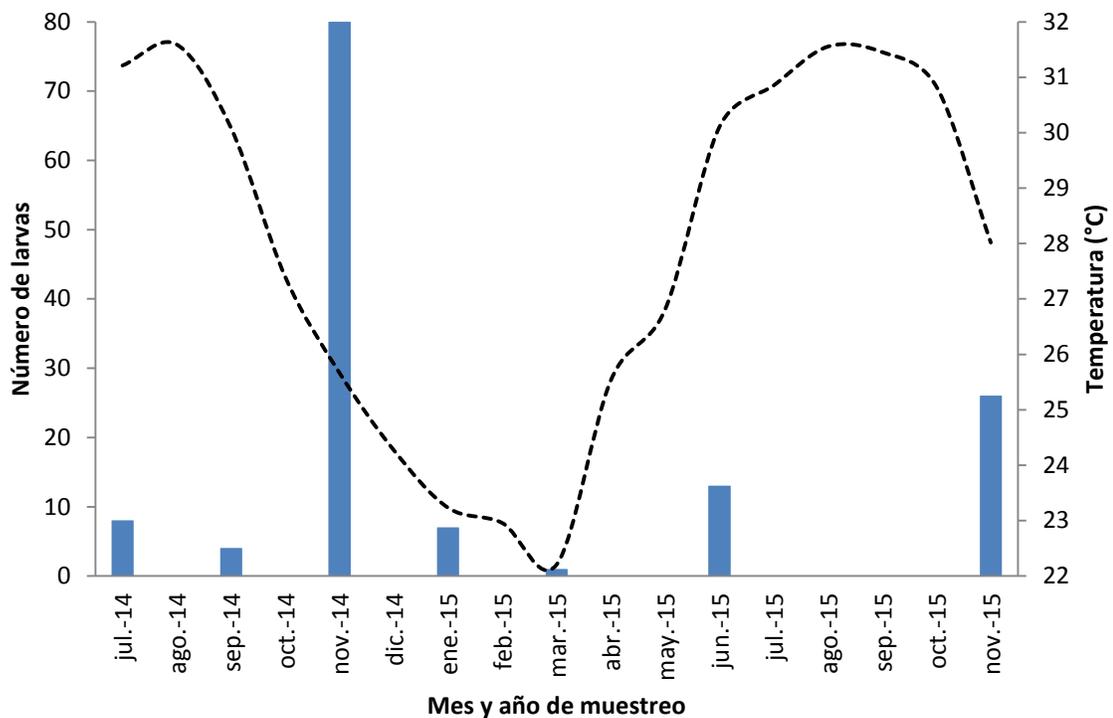
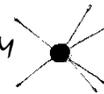


Figura 4. Variación de la abundancia de larvas de *Thoosa* en la zona núcleo Bahía Tiburoneros durante el periodo de muestro. Línea discontinua indica la variabilidad temporal de la temperatura del agua.



V.6 DISCUSIÓN

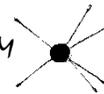
V.6.1 Abundancia de larvas

Según Bergquist y Sinclair (1973), Zea (1993) y Maldonado (2006); las esponjas pueden presentar pulsos de desove y liberar pequeñas cantidades de larvas a través del año, aunque pueden ocurrir picos masivos de liberación una o dos veces al año asociados principalmente a los meses de temperatura cálida. Esto coincide con los resultados encontrados por Amillano-Cisneros (2014) en larvas de *Thoosa mismalolli* y *T. calpulli* donde los picos más altos de abundancia tanto para *T. mismalolli* como para *T. calpulli* se presentaron en los meses de verano (temperaturas entre 25.4°C y 31°C). Este es el periodo cuando la población de la esponja *T. mismalolli* se reproduce sexualmente (Bautista-Guerrero *et al.* 2010).

Contradictoriamente, en el presente estudio, en los meses de verano cuando las temperaturas del agua fueron más altas (>31 °C) (mayor a las normales), fue menor el número de larvas (<15). Sin embargo, este número incrementó al disminuir la temperatura un mes antes de los muestreos de noviembre de 2014 y 2015 (27.4°C y 30.8°C), bajando prácticamente a las mismas temperaturas máximas normales de la zona en meses de verano (27-31 °C).

El incremento anormal de la temperatura del agua relacionada con la reproducción de los organismos, a veces, es un factor muy importante, ya que esta puede causar al atraso o adelanto de este proceso biológico. Según la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), cuando hay un incremento anormal de 0.5°C en la temperatura del mar en la zona del Pacífico Ecuatorial centro-este, de por lo menos tres meses, se considera que existe un evento El Niño. Mientras que si hay una disminución anormal de 0.5°C en la temperatura del mar en la misma zona y durante el mismo tiempo, se considera que existe un evento La Niña.

Un estudio realizado (Abdul-Wahab *et al.* 2014) de marzo de 2010 a junio de 2012 sobre la reproducción sexual de la esponja de la gran barrera arrecifal *Carteriospongia foliascens*, indicó que la temperatura es el parámetro que más influye en su ciclo reproductivo. Por lo regular, la reproducción se reduce cuando la temperatura es menor a 23 C, y se incrementa cuando la temperatura rebasa los 23°C, siendo el pico de liberación larval en temperatura anual máxima (>28 °C). Sin embargo, durante este estudio, se resaltó que entre julio y



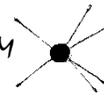
diciembre de 2010, a partir de un incremento anómalo de temperatura y una alta intensidad de lluvia causada por el evento La Niña, se redujo la producción larvaria de esta esponja. La reducción observada en la producción de larvas en el primer ciclo reproductivo (se siguieron dos en este estudio) podría ser atribuida a que mantuvo un equilibrio metabólico para un mayor control del estrés fisiológico durante el período de aumento de las lluvias (Abdul-Wahab *et al.* 2014).

En otro estudio (Asa *et al.* 2000) sobre reproducción sexual de una esponja del Golfo de Tailandia (*Petrosia* sp.) realizado entre diciembre de 1997 y abril de 2001, se encontró que dentro de estos organismos hubo quistes espermáticos, ovocitos, embriones y larvas entre diciembre de 1997 y abril de 1998. Pero, a causa de un severo fenómeno de blanqueamiento de coral en este Golfo en abril y mayo de 1998 (ocasionado por la influencia del fenómeno del Niño de 1997-1998), hubo una desaparición de quistes espermáticos y ovocitos de mayo-octubre de 1998. También, hubo ausencia de embriones y larvas entre mayo-noviembre del mismo año. Después de este evento, la presencia de estos elementos reproductivos volvió a ser normal.

En el presente estudio, es posible que la disminución aparente en el número de larvas de *Thoosa* en los meses cálidos (jul-sep) donde en años anteriores (2011 y 2012) se presentaron los máximos picos de abundancia anuales (Amillano-Cisneros 2014), haya sido causada por el incremento anormal de la temperatura, ya que en esta región del mar donde se realizó el presente trabajo, en el primer periodo de muestreo (jul-sep 2014), se presentó un raro suceso denominado *The Blob* o La Mancha Cálida (Bond *et al.* 2015), la cual posteriormente (julio 2015), se convirtió en un evento El Niño que se mantuvo hasta comienzos (enero) del año 2016.

The Blob o La Mancha Cálida (Bond *et al.* 2015) es una masa de agua cálida con temperaturas superiores a las normales ($> 2^{\circ}\text{C}$) que comenzó a formarse en el Golfo de Alaska durante el otoño de 2013 y después se propagó a través de todo el Pacífico Norte en verano de 2014 (**Fig. 5**) y persistió hasta julio de 2015 cuando se formó El Niño de 2015 (**Fig. 6**).

Inicialmente, se reportó que La Mancha Cálida tenía un tamaño de 800 km de ancho y 91 m de profundidad. Después, se expandió e incrementó al doble de ancho (1,600 km) en junio de 2014 y fue cuando se acuñó el término *The Blob*. La Mancha continuó



expandiéndose hasta abarcar en el verano de 2014, la costa de América del Norte desde México hasta Alaska en un tramo de más de 3,200 km, formando tres parches distintos de estas masas de agua cálidas. El primero, abarcó la costa de Canadá, Washington, Oregon, y California. El segundo incluyó Alaska y el Mar de Bering. Mientras que el tercero y más pequeño, se ubicó al sur de California y oeste de México (**Fig. 5**).

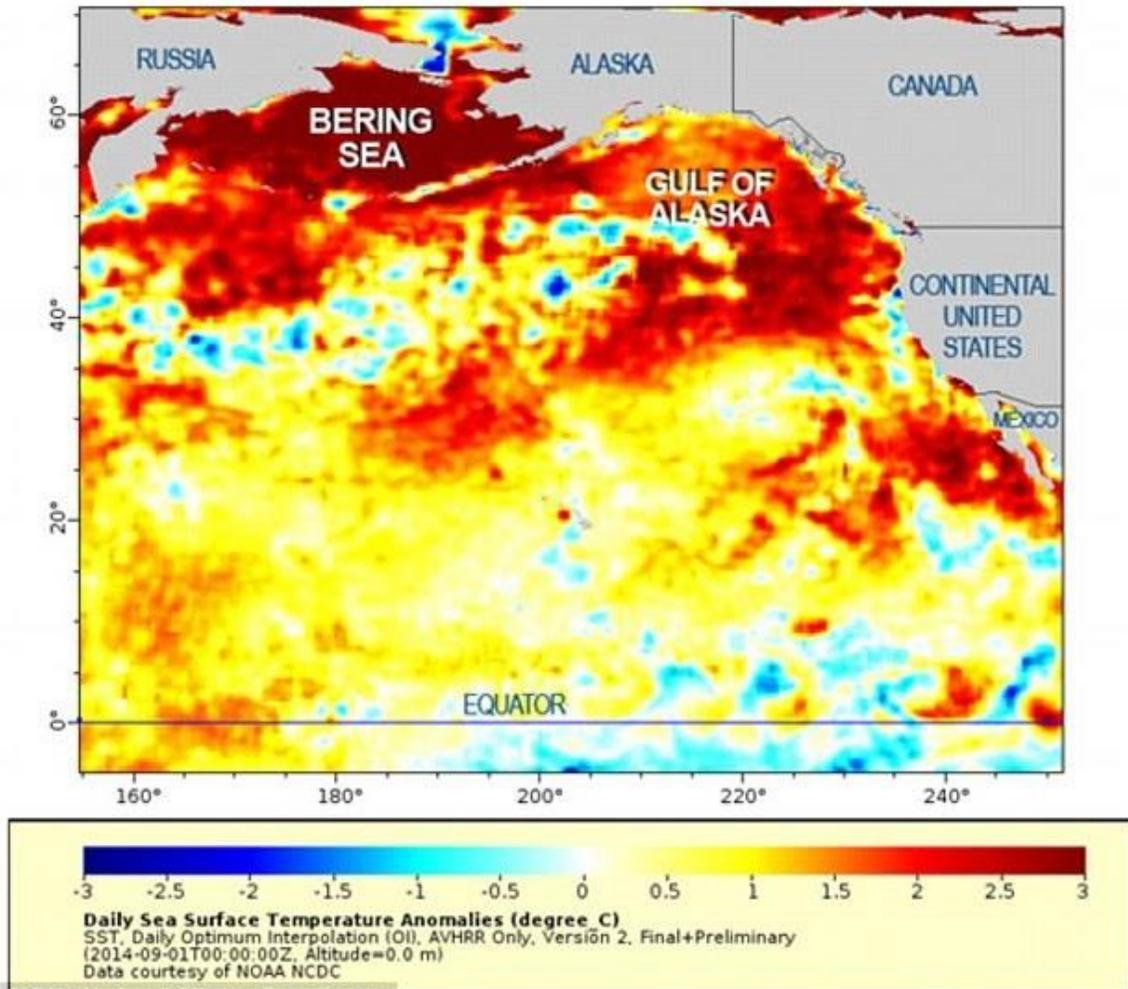


Figura 5. Las tres Manchas Cálidas del Pacífico. Las tres manchas de agua cálida pueden ser vistas en la costa de América del Norte desde Alaska hasta México. La imagen corresponde al 1 de septiembre de 2014 (NOAA).

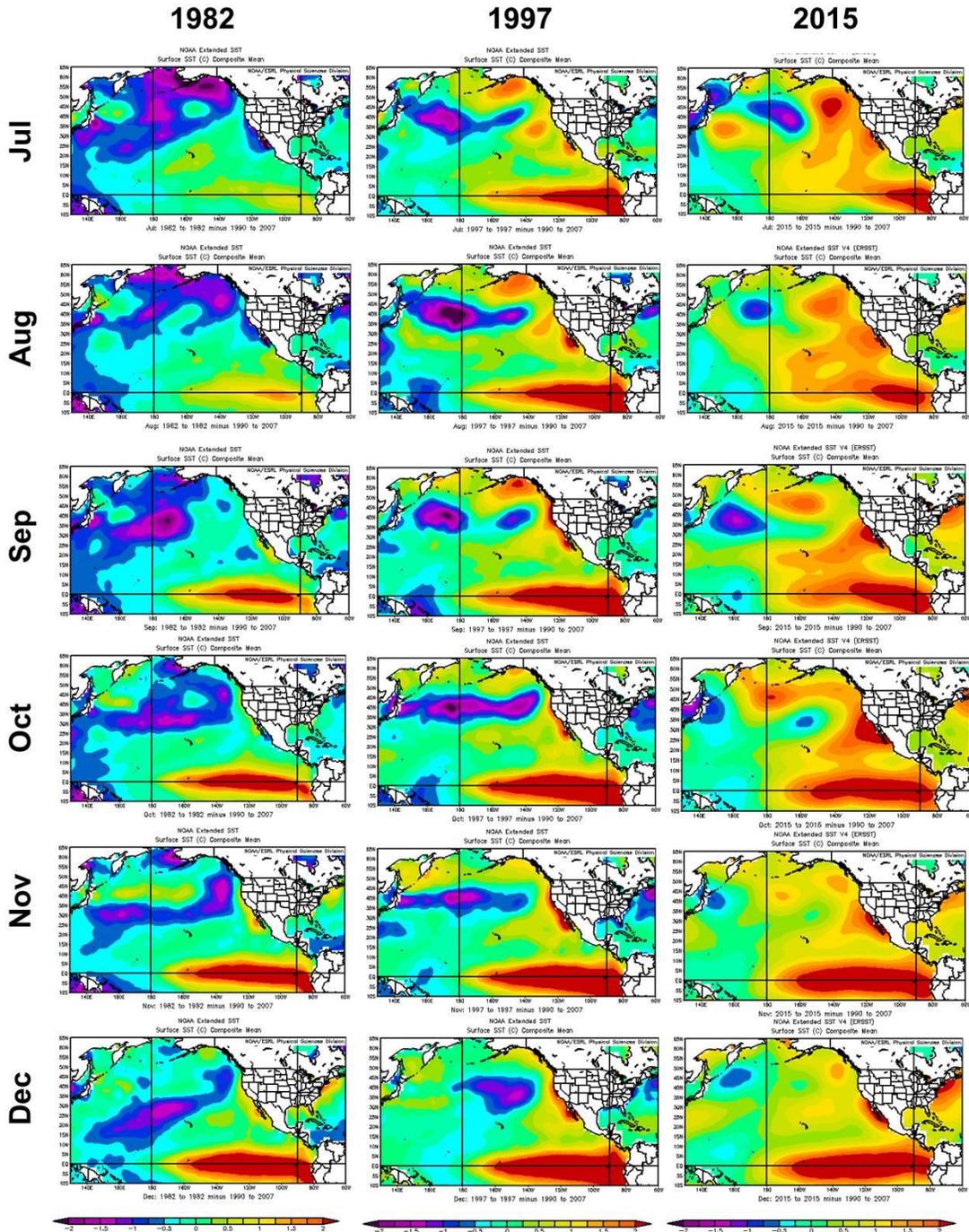
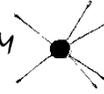
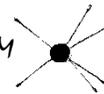


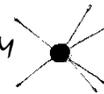
Figura 6. Anomalías de la temperatura superficial del mar en el Pacífico de julio a diciembre durante las fases iniciales de los eventos El Niño de 1982, 1997 y 2015. Los eventos El Niño más fuertes en la historia reciente ocurrieron durante 1982-83, 1997-98 y 2015-16, siendo el último el evento más fuerte registrado por la NOAA (NOAA 2015). La diferencia de El Niño 2015-16 con respecto a los otros, es que previo a este, el noreste del Pacífico ya presentaba temperaturas cálidas anormales a causa del raro fenómeno *The Blob* o La Mancha Cálida.



En base a los eventos acontecidos en el periodo de muestreos de este trabajo, *The Blob* (verano de 2014 a julio de 2015) provocó el blanqueamiento y posterior muerte de las colonias de coral vivas (género *Pocillopora* principalmente y hábitat de las esponjas excavadoras como las del género *Thoosa*) de la zona de estudio. Asimismo, este fenómeno atrasó el ciclo reproductivo en los organismos adultos de las esponjas del género *Thoosa* y se vio reflejado en la disminución de la abundancia en verano de larvas en el plancton cuando regularmente se presentaban los máximos picos de abundancia (Amillano-Cisneros 2014).

Después de la Mancha Cálida o *The Blob*, se presentó el evento El Niño (julio 2015 a enero 2016), siendo este el fenómeno más fuerte registrado en la historia reciente (mayor que los eventos de 1982-83 y 1997-98) (NOAA 2015). Este fenómeno al igual que La Mancha, continuó retrasando el periodo reproductivo de la esponja del género *Thoosa*, e incluso, provocó que la abundancia larval en el mes de noviembre de 2015 disminuyera fuertemente a comparación de la abundancia de noviembre de 2014.

Esta modificación del ciclo reproductivo con relación a la presencia de temperaturas anormales, pudo ser un mecanismo biológico de sobrevivencia de las esponjas ante un factor de estrés, ya que la reproducción es un proceso que requiere de mucha energía y algunos organismos ante una condición de estrés pueden anular el proceso hasta que las condiciones vuelvan a ser óptimas.



V.6.2 Dispersión de larvas

La dispersión en esponjas por medio de larvas es diferente entre especies y tipos de larva a causa de su morfología, comportamiento durante la fase planctónica y tiempo de vida (Mariani *et al.* 2006). Además, el número de larvas producidas es variable entre las distintas especies de esponjas, y esto puede determinar las tasas de sobrevivencia larvaria (Mariani *et al.* 2006). A mayor sobrevivencia de larvas, hay mayor probabilidad de asentamiento y reclutamiento (ya como esponja juvenil) a la población. Así también, el número de larvas puede ser un factor importante en la dispersión.

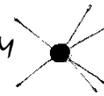
Existen modelos de dispersión larval en el mar que frecuentemente consideran variables hidrográficas (corrientes), velocidades de nado y duración de la vida planctónica como variables principales, prestando poca atención a las diferencias de comportamiento. Sin embargo, para integrar la historia de vida de la larva (incluyendo comportamiento) y los componentes hidrográficos, se requiere un esfuerzo considerable (Mariani *et al.* 2006).

Los propágulos sexuales, tales como las larvas de esponjas, pueden ser dispersados pasivamente a través de corrientes.

Las corrientes superficiales imperantes en las distintas regiones del mar, son un factor clave que pueden disminuir o incrementar las posibilidades de dispersión de organismos planctónicos que no tienen capacidad de nado.

Dependiendo de la región del mar, las corrientes superficiales varían según la época del año. Esta variación depende de los cambios en la dirección y localización de los vientos, así como del relieve (costa) que en ocasiones desvían estas corrientes. En el noroeste de México (Baja California, Baja California Sur, Sonora, norte y centro de Sinaloa), los vientos dominantes tienen influencia en la dirección de las corrientes superficiales de esta región. En las estaciones de otoño, invierno y primavera, en esta región noroeste de México dominan los vientos NW-SE, por lo que las corrientes también tienen la misma dirección. Mientras que en verano (en la misma región) dominan los vientos del SE-NW (CONABIO 2005).

En cambio, en la región donde se realizó el presente trabajo (isla Isabel, Nayarit), la dirección de las corrientes superficiales de otoño, invierno y primavera son diferentes a las del noroeste de México. A partir de un análisis visual en un periodo de dos años y medio (enero de 2015 a junio de 2016) de datos de corrientes oceánicas superficiales



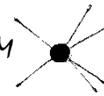
(https://earth.nullschool.net/#2015/11/14/0000Z/ocean/surface/currents/overlay=sea_surface_temp/orthographic=-106.95,22.41,3000/loc=-106.451,21.632) del noroeste de México y de la región de estudio de este trabajo, se logró determinar que esta diferencia se debe a que las corrientes del noroeste de México influenciadas por los vientos NW-SE, golpean el sur de la costa de Sinaloa y norte de la costa de Nayarit y, a partir del choque con el relieve costero, tales corrientes cambian de dirección (NE-SW) desviándose hacia el área de estudio (isla Isabel) y continúan su traslado hacia las islas Marías. No obstante, las corrientes influenciadas por los vientos de verano (SE-NW) son las mismas tanto en la región noroeste de México como en la región donde se realizó el presente estudio.

Aunque se cree que la larva hoplitomella presenta una gran capacidad de dispersión (Karawaiew 1896; Rützler *et al.* 1980; Vacelet 1999; Maldonado 2006), no se señala a que distancia con respecto a una población parental han sido encontradas. En el presente trabajo, la mayor distancia donde se encontró una larva de este tipo (julio de 2014) fue a 2 km de la zona donde se encuentra una población de esponjas parentales (*Thoosa*). Sin embargo, el número de larvas encontradas pudo ser mayor a uno, o bien, haberse encontrado a mayor distancia, si la producción de larvas en las zonas núcleo hubiese sido tan abundante como lo eran en condiciones normales de temperatura. Además, en el presente trabajo no se midieron las corrientes a la hora de realizar los arrastres para recolectar estas larvas planctónicas. Por lo tanto, si se hubiera considerado desde un principio el hecho de que en ciertas épocas del año hay corrientes dominantes (NE-SW de otoño a primavera y SE-NW en verano) en los alrededores de las zonas núcleo que pudieran acarrear de mejor manera a estos organismos, tal vez, se pudo haber encontrado más larvas hoplitomella a 2 km, o bien, a mayor distancia (4 y 8 km) donde se realizaron los arrastres de recolecta y, de esta forma, poder comprobar que este tipo de larvas pueden transportarse a otros lugares (colonias de corales distintas del origen) donde podrían asentarse y formar una nueva población.



Capítulo 2

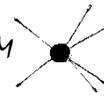
CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y
DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL



RESUMEN

En el presente capítulo, se hizo una descripción de los cambios en el número de discos y organización de los estilos que suceden en la larva hoplitomella *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* durante su desarrollo dentro de la esponja adulto y cuando se encuentra en su estadio planctónico. Además, se describió la ultraestructura de una larva *T. mismalolli* que se encontraba en desarrollo dentro de un organismo adulto. El número de discos así como la organización de los estilos varía en la larva durante su desarrollo dentro del organismo adulto. Durante el desarrollo inicial, los estilos atraviesan el cuerpo de la larva. Durante el medio, algunos estilos siguen atravesando el cuerpo y otros se disponen desde el radio corporal hacia fuera de la larva. Mientras que en el final, antes de que la larva salga al plancton, los estilos están arreglados del radio corporal hacia fuera. Con respecto al número de discos, en *T. calpulli* hubo diferencias entre el desarrollo inicial con el final. Mientras que en *T. mismalolli* las diferencias fueron entre el desarrollo inicial con el final y entre el medio con el final. Referente a la ultraestructura, en la larva en desarrollo se encontró que esta posee una gran variedad de estructuras celulares, las cuales están organizadas en capas y estas, a su vez, están dispuestas a través del cuerpo larval. Estas estructuras van desde bacterias y coanocitos en formación, hasta células granulares y grises que producen estructuras lipídicas y de glicógeno que pueden servir como reserva de energía a la larva en alguna etapa de su desarrollo.

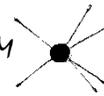
Palabras claves: Larvas, hoplitomella, *Thoosa calpulli*, *T. mismalolli*, cambios, morfología, discos, estilos, ultraestructura, bacterias, lípido, glicógeno, reservas de energía.



ABSTRACT

In this chapter, was made a description of the changes in the number of disks and organization of styles that occur in the hoplitomella *Thoosa calpulli* and *T. mismalolli* during development in the adult sponge and their planktonic stage. Also, was described the ultrastructure of a developing larvae *T. mismalolli* found in an adult. In both species larvae, the number of disks and organizing styles had variation during development in the adult sponge. In the initial development, styles through the larval body. In the medium development, some styles continue through the larval body and others are arranged from the body radius out of the larva. In the final development, the styles are arranged from the body radius out of the larva. Regarding to disks number, in *T. calpulli* had difference between inicial development with final development. While in *T. mismalolli* had difference between inicial development with final development and between medium development with final development. Concerning the ultrastructure, the developing larvae *T. mismalolli* found in an adult has a variety of cellular structures, wich are organized in layers inside the larval body. These structures ranging from bacteria and coanocites in formation, to granule and gray cells wich produce lipids and glycogen structures that can serve as an energy reserve for the larva at some stage of their development.

Key words: Larvae, hoplitomella, *Thoosa calpulli*, *T. mismalolli*, changes, morfology, disks, styles, ultrastructure, bacteria, lipid, glycogen, energy reserve.



VI.1 INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las larvas planctónicas hoplitomella, de las que se pensó en un inicio que eran radiolarios, se han hecho algunos trabajos que describen el tamaño y la estructura esquelética (discos y estilos o espículas) de este tipo de larva.

Karawaiew (1896), quien pensaba inicialmente que las larvas hoplitomella eran radiolarios, indicó que su diámetro era de 200 a 300 μm y que el cuerpo del organismo poseía una cubierta de placas de silicio y múltiples espículas radiales que llamó estilos. Las mediciones de la larva hoplitomella de *Alectona millari* señaladas por Trégouboff (1942, 1957), coinciden fielmente con las medidas por Karawaiew.

Garrone (1974) describió que la larva hoplitomella de *Alectona* está recubierta por numerosas placas de silicio ovales que presentan una depresión prominente en el centro y numerosas espículas largas que se implantan desde la región central de la larva y, tanto los discos como los estilos están cubiertos de una delgada membrana translúcida.

Vacelet (1999) refirió que las discotrienas y los estilos que están presentes en las larvas de *Alectona wallichii* y *A. mesatlantica* tienen diferencias en su tamaño. En *A. wallichii*, las discotrienas miden entre 90 y 120 μm y los estilos de 280 a 650 μm de largo y de 2 a 3 μm de ancho. Mientras que en *A. mesatlantica* estas estructuras tienen mayor tamaño, las discotrienas con una medida entre 130 y 150 μm y los estilos 1125 μm de largo y de 4 a 5 μm de ancho.

Maldonado y Bergquist (2002) señalaron que el epitelio exterior de la larva hoplitomella está constituido por una capa de 50 a 80 placas subcirculares, a las cuales llaman discotrienas y estas larvas también poseen de 6 a 10 protuberancias largas y delgadas radiadas.

Amillano-Cisneros (2014) indicó que la larva hoplitomella de *Thoosa calpulli* tiene en promedio 59 discos monoaxónicos que cubren la capa exterior y *T. mismalolli* posee 82 de estos discos. También, describió que las larvas de ambas especies poseen hasta 11 proyecciones delgadas y largas, las cuales están recubiertas por una matriz orgánica translúcida, que se extiende desde la base hasta la parte distal de la proyección. En resumen

Resumidamente, la larva hoplitomella presenta características morfológicas únicas entre las demás larvas de esponjas, como son: presentar una superficie cubierta por espículas, discotrienas en el género *Alectona* y discos monoaxónicos en *Thoosa* los cuales están



ausentes en el estado adulto, no presentar una polaridad anterior-posterior, no presentar células ciliadas externamente, presentar un gran desarrollo de fibras de colágeno que es inusual en embriones de esponjas, que además se mantienen durante los siguientes estadios, así como una larga vida planctónica (Vacelet 1999; Maldonado 2006; Bautista-Guerrero *et al.* 2010; Ereskovsky 2010).

El tamaño de las larvas hoplitomella varía entre especies midiendo 200-300 μm en *Alectona millari* (Trégouboff 1942), 150-200 μm en *Thoosa calpulli* y 200-300 μm en *T. mismalolli* (Amillano-Cisneros 2014). Las discotrienias de *Alectona* son ovaladas con una depresión prominente en el centro (Garrone 1974). Los discos monoaxónicos en larvas del género *Thoosa* son ovalados, con dos caras (externa e interna) y presentan características distintivas entre especies. En *T. calpulli*, los discos presentan múltiples ornamentaciones redondeadas en la mayor parte de la cara externa y una depresión en la parte media (**Fig. 7A**). La cara interna de los discos de esta especie es lisa con una pequeña elevación en la parte media (**Fig. 7B**). En *T. mismalolli*, los discos en la cara externa presentan una marcada depresión en la parte central y múltiples ornamentaciones redondeadas en esta (**Fig. 7C**). Los discos de esta especie en su cara interna son lisos con una prominente elevación en la parte media (**Fig. 7D**) (Amillano-Cisneros 2014).

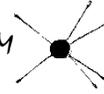
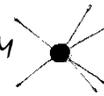


Figura 7. Discos monoaxonicos en larvas del género *Thoosa*. **A)** Cara externa y **B)** cara interna de un disco de larva *T. calpulli*, **C)** Cara externa y **D)** cara interna de un disco de larva *T. mismalolli*. (Modificado de Amillano-Cisneros 2014)

Por otra parte, la presencia de gránulos de glicógeno, gotas de lípidos y bacterias que se observan a nivel ultraestructural en las larvas de esponjas, pueden estar relacionadas con la capacidad de natación, dispersión y tiempo en que puede permanecer en el plancton antes de su asentamiento. En teoría, mientras más reservas de energía tengan las larvas, mayor tiempo podrá durar en el plancton y a su vez, tendrá mayor probabilidad de dispersión. Por el contrario, las larvas de organismos que no tienen reservas energéticas para alimentarse son de vida corta, permaneciendo estas sólo unas horas como plancton antes de asentarse (Winston 2012).

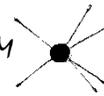
La duración de la vida libre en larvas lecitotróficas, tal como la larva parenquímula, depende principalmente de los recursos de energía disponible que se observan a nivel ultraestructural (Uriz *et al.* 2008). Por ejemplo, en la larva de *Scopalina lophyropoda* la fuente de energía son lípidos, mientras que *Cacospongia mollior* almacena glicógeno, lípidos y bacterias simbiotes que utiliza como fuente de energía (Uriz *et al.* 2008).

Por tanto, los estudios morfológicos a nivel ultraestructural, utilizando microscopia electrónica, son muy importantes, ya que a partir de ellos se pueden observar algunas



ultraestructuras que pueden resultar fuentes de reservas energéticas (glicógeno, lípidos) y de esta forma deducir algunos comportamientos que no se comprenden a simple vista.

El presente capítulo pretende describir los cambios que sufre la larva del género *Thoosa* tanto a nivel externo (discos y estilos) como ultraestructural durante su desarrollo desde que está dentro del organismo adulto hasta que está libre en el plancton. La descripción ultraestructural es con el fin de observar las estructuras (glicógeno, lípidos y/o bacterias) que pudieran servir como fuente de energía a la larva y ver cómo cambian estas a lo largo de su desarrollo para relacionarlos con la gran dispersión que se le presupone, poseen.



VI.2 ANTECEDENTES

El único análisis a nivel ultraestructura de la larva hoplitomella se debe a Garrone (1974), quien encontró que la larva del género *Alectona* está formada por células de diferente tipo, y separadas por un medio intercelular muy rico en fibrillas. También indicó, que dentro de la larva hay partículas de glicógeno, bacterias, células grises y coanocitos, aunque no describe si son funcionales. Las células grises son las encargadas de la síntesis y acumulación de glicógeno, y responsables de su traslado a sitios de metabolismo más intenso (Boury-Esnault 1977).

Uriz *et al.* (2008) analizaron la ultraestructura y el comportamiento de dos larvas parenquímula de las especies *Scopalina lophyropoda* y *Cacospongia mollior*, y encontraron una serie de peculiaridades un tanto diferentes en las características ultraestructurales y de comportamiento entre las larvas de estas dos especies (**Tabla 1**). Las larvas de *C. mollior* tienen estructuras de nado representadas por cilios en forma de penacho, contienen reservas energéticas de lípidos y glicógeno (una rápida fuente de energía) siendo esta última extraordinariamente abundante en las células ciliadas; poseen además numerosas bacterias extracelulares que son frecuentemente fagocitadas por las células ciliadas internas, lo que probablemente representa una fuente suplementaria de alimentos. Estas características favorecen que la larva tenga un nado continuo y la presencia de diversas fuentes de energía, sugiere un buen rendimiento para viajar grandes distancias, concordando con la amplia distribución de esta especie. En cambio, encontraron bajas cantidades de reserva de energía (únicamente lípidos) en las larvas de *S. lophyropoda*, indicando que tienen una baja dispersión y permanecen cerca de donde se encuentran los padres (comportamiento filopátrico).

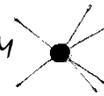
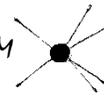


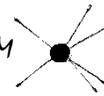
Tabla 1. Características de las larvas parenquimula de *Cacospongia mollior* y *Scopalina lophyropoda*. (Modificado de Uriz *et al.* 2008)

<i>Cacospongia mollior</i>	<i>Scopalina lophyropoda</i>
Reservas de energía	
Lípidos	Lípidos
Glicógeno	-
Fagocitosis de bacterias	-
Estructuras de nado	
Largos cilios en el polo posterior	Cilios uniformemente cortos
Anillo posterior con pigmento oscuro	Uniformemente pigmentado
Características de comportamiento	
Nado continuo y rápido	Nado lento
Fotonegativo	Indiferente a la luz
Nado direccional	Nado errático



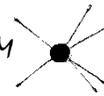
VI.3 HIPÓTESIS

Las fases de desarrollo de las larvas de *Thoosa* a nivel externo, presentan variación en el número discos y organización de los estilos y, a nivel ultraestructura, poseen estructuras como bacterias, granos de glicógeno, lípidos y vacuolas con capacidad de fagocitar bacterias que pueden contribuir a las larvas en sus reservas de energía para que tenga una gran capacidad de dispersión.



VI.4 OBJETIVOS

- 1- Describir los cambios morfológicos externos (discos y estilos) de las larvas del género *Thoosa* durante su desarrollo y durante la fase de vida libre.
- 2- Describir la ultraestructura de la larva de *Thoosa mismalolli* en desarrollo dentro de una esponja adulto.
- 3- Describir la presencia de elementos (bacterias, acumulación de granos de glicógeno y lípidos) y procesos (fagocitosis de bacterias) que pueden servir a la larva como reserva de energía.



VI.5 MATERIAL Y MÉTODOS

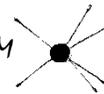
VI.5.1 Descripción de los cambios morfológicos externos

Se utilizaron larvas de las especies *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* obtenidas directamente del adulto, mediante disección, y larvas planctónicas recolectadas en la zona núcleo de Bahía Tiburoneros (ZNBT).

La obtención de larvas de las dos especies dentro de adultos fue realizada llevando una serie de pasos que se aplicaron en distintos muestreos, debido a que los organismos de *T. calpulli* son menos abundantes y es más difícil encontrarlos en ciertas épocas del año. Estos pasos consistieron primero en obtener de la ZNBT estructuras de coral que se trasladaban (con agua de mar) hacia el laboratorio de campo para comprobar la presencia de esponjas. Una vez que estas se identificaban a nivel especie, se conservaban en alcohol al 96%. Las larvas se obtuvieron mediante la disección de las esponjas en el laboratorio del ICMYL, UNAM, Unidad Mazatlán, donde se les realizó una fotografía para observar la estructura externa, medir el diámetro del cuerpo (μm), y tener un registro visual de la muestras antes de su posterior procesamiento. La fotografía a las larvas se hizo por medio de un microscopio estereoscópico (Leica) que tiene integrada una cámara digital conectada a un programa de computadora (Leica Application Suite Version 3.6.0).

Las larvas obtenidas del plancton se conservaron en alcohol al 96%, y también se les realizó una fotografía para observar la estructura externa, medir el diámetro del cuerpo y tener registro visual de la muestras antes de su procesamiento. La fotografía se realizó de la misma manera que las larvas obtenidas de adultos.

Para poder describir estos cambios, se colocó una larva (obtenida del adulto o del plancton) en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos. Posteriormente, el portaobjetos se puso sobre una plancha eléctrica a una temperatura aproximada de 65°C y se agregaron gotas de ácido nítrico (HNO_3) al 68%, hasta que la materia orgánica se degradó completamente. Una vez degradada la materia orgánica, el portaobjetos con el esqueleto espicular (discos y estilos) se quitó de la plancha y se le agregó gotas de alcohol etílico al 100% para limpiar y eliminar el remanente orgánico no degradado con el HNO_3 . Enseguida, el esqueleto se fijó con la resina entellan cubriéndolo con un cubreobjetos y se dejó secar durante 24 horas para su posterior observación en el microscopio óptico. Este proceso se le realizó a 30 larvas de cada especie, tanto para las obtenidas de esponjas



adultos por disección, como para las recolectadas por arrastres de plancton en ZNBT. Una vez fijado el esqueleto de cada larva con el entellan, cada portaobjeto se observó en un microscopio óptico mediante la técnica de contraste de fases para contar, medir y observar la forma de los discos y estilos, y visualizar los cambios que presentan en número, tamaño y forma entre las larvas durante sus fases de desarrollo.

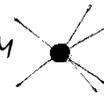
VI.5.2 Análisis estadísticos

VI.5.2.1 Análisis estadísticos para cambios externos en larvas obtenidas de adultos y recolectadas en la zona núcleo Bahía Tiburoneros

Para realizar el análisis de los cambios externos (comparación en el número de discos) presentados en larvas de *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* obtenidas (por disección) en esponjas adultos y recolectadas en el plancton de la zonas núcleo Bahía Tiburoneros, primero se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad a través de pruebas de Lilliefors y Bartlett respectivamente, fallando ambas pruebas. Para determinar si había diferencias significativas entre el número de discos presentes en larvas del género *Thoosa* (*T. calpulli* y *T. mismalolli*) obtenidas de adultos y del plancton, fue empleada la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples ANOVA Kruskal-Wallis a un 5% de significancia.

VI.5.2.2 Análisis estadísticos para el número de discos de larvas de *Thoosa* en sus diferentes fases del desarrollo espicular

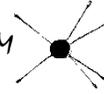
Para determinar si el número de discos varía en las diferentes fases del desarrollo (estas se describieron a partir de un criterio de la disposición de estilos en el cuerpo larval y se les denominó como desarrollo inicial, medio y final) de las larvas del género *Thoosa*, primero se contaron los discos de las larvas establecidas con este criterio y los datos se acomodaron en grupos separando las especies (*T. calpulli* y *T. mismalolli*). Después se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por medio de las pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente, fallando la de homogeneidad de varianzas para *T. calpulli* y resultando positiva ambas pruebas para *T. mismalolli*. Para determinar si había diferencias significativas en el número de discos en las diferentes fases de desarrollo, fue empleada la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples ANOVA Kruskal-Wallis en *T. calpulli*. En el caso de *T. mismalolli* se aplicó una ANOVA paramétrica y la prueba



de comparación múltiples de Student Newman Keuls (SNK). Estas pruebas se realizaron a un 5% de significancia.

VI.5.3 Descripción ultraestructural

Para describir la ultraestructura de la larva de *Thoosa mismalolli* en desarrollo dentro de una esponja adulto por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM), se tomaron trozos de esponjas recién recolectadas que contenían en su interior larvas en desarrollo. Estos trozos se colocaron en tubos eppendorf, los cuales contenían dentro un fijador conformado de glutaraldehído (25%), cloruro sódico (0.34 M) y una mezcla de fosfato monobásico e hidróxido de sodio (solución buffer fosfatos PBS) (0.4 M). Después, los tubos fueron enviados a laboratorio de microscopía electrónica donde las muestras se lavaron con una mezcla compuesta de PBS (0.4 M) y cloruro sódico (0.6 M). Una vez lavadas, las muestras se fijaron en tetraóxido de osmio (4 %) y PBS (0.4 M). Después se deshidrataron en una serie de alcohol y embebieron en resina Spurr. Las muestras puestas en resina se cortaron con ultramicrotomo (Ultracut Reichert-Jung). Las muestras cortadas fueron montadas sobre rejillas de oro y teñidas con acetato uranilo por 30 minutos y citrato de plomo por 10 minutos. Las muestras fueron observadas mediante microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010) operando a 80 kV y equipado con un módulo Gatan para la adquisición de las imágenes.



VI.6 RESULTADOS

VI.6.1 Cambios externos en larvas obtenidas de adultos y en el plancton de la zona núcleo Bahía Tiburoneros

Se comparó en el número de discos presentes en larvas de *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* obtenidas de esponjas adultos y recolectadas en el plancton de la zonas núcleo Bahía Tiburoneros (Fig. 8). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los discos de las dos especies. Asimismo, la ANOVA no mostró diferencia entre los discos presentes en larvas obtenidas directamente de individuos adultos y en larvas recolectadas en el plancton para cada especie de *Thoosa*.

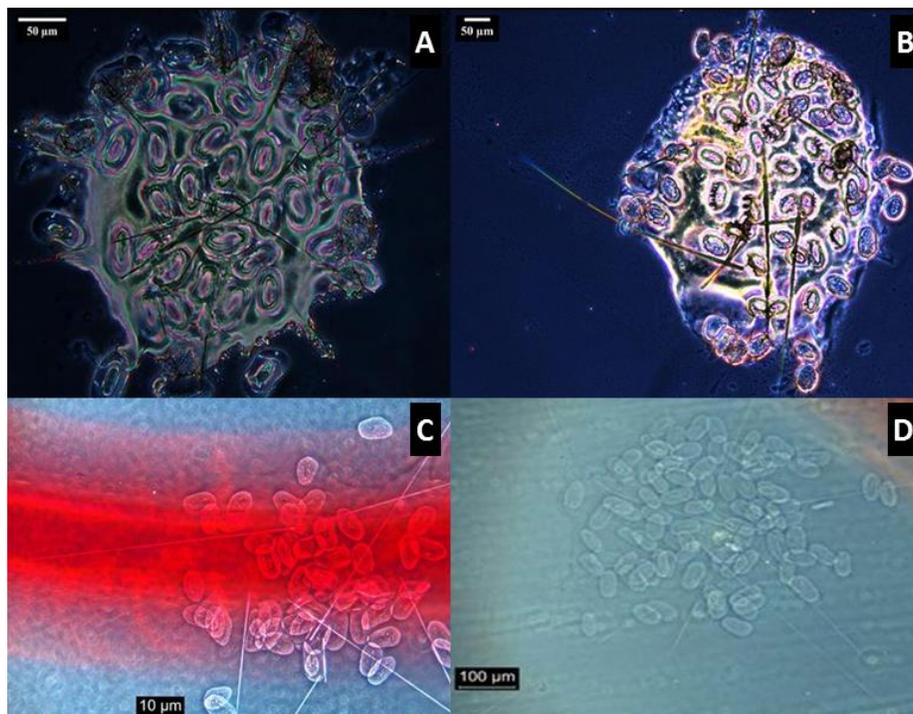


Figura 8. Discos monoaxónicos en larvas de *Thoosa* obtenidas de esponjas adultos y recolectadas en el plancton de la zona núcleo Bahía Tiburoneros. (A) Discos de una larva de *Thoosa calpulli* obtenida de adulto. (B) Discos de una larva de *Thoosa mismalolli* obtenida de un adulto. (C) Discos de *Thoosa calpulli* recolectada en el plancton de la zona núcleo. (D) Discos en *Thoosa mismalolli* recolectada en el plancton de la zona núcleo.

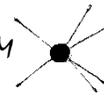


Tabla 2. Resultados de la ANOVA no paramétrica para discos de larvas de *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* obtenidas de adultos y de arrastres de plancton. *Tc* y *Tm de adulto*, larvas obtenidas de esponjas adultos; *Tc* y *Tm de plancton*, larvas recolectadas en el plancton.

Depend.: Dato	Valores p Comparaciones Múltiples (2-colas); Dato (Discos de <i>Thoosa</i> dentro de adulto y plancton) Variable independiente (agrupada): Código Prueba Kruskal-Wallis: H (3,N=120)=87.95049 p=.0000			
	Tc de adulto R:22.700	Tm de adulto R:81.617	Tc de plancton R:41.183	Tm de plancton R:96.500
Tc de adulto		0.0000	0.2376	0.0000
Tm de adulto	0.0000		0.0000	0.5850
Tc de plancton	0.2376	0.0000		0.0000
Tm de plancton	0.0000	0.5850	0.0000	



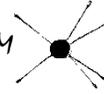
Tabla 3. Número de discos monoaxónicos registrados en las larvas de *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* obtenidas de adultos y de arrastres de plancton.

<i>T. calpulli</i> de adulto	<i>T. mismalolli</i> de adulto	<i>T. calpulli</i> plancton	<i>T. mismalolli</i> plancton
41	64	47	73
46	67	68	72
40	77	54	87
48	67	56	78
46	75	61	89
48	68	51	93
56	69	65	90
52	69	72	90
58	70	49	88
48	74	59	94
56	68	62	68
56	75	57	86
54	65	60	68
50	74	58	91
56	86	64	63
52	72	61	82
56	68	68	75
53	65	64	91
55	71	65	84
54	65	63	82
61	79	60	89
50	83	61	79
59	90	55	91
61	83	69	87
57	85	48	82
58	82	60	92
58	84	72	71
56	79	47	65
54	80	52	93
51	87	54	70
Prom.	53	74.7	59.4

VI.6.2 Desarrollo del esqueleto espicular larval

Antes de degradar con HNO_3 larvas de esponjas obtenidas de organismos adultos (por medio de disección) y así lograr ver el número de discos y estilos que estas presentan, se notó que algunas de ellas al observarlas bajo la lupa, mostraban ciertas diferencias externas. Por tanto, se optó tomarles fotografías previas a la degradación con la finalidad de compararlas posteriormente cuando se hayan pasado por HNO_3 .

Al observar las larvas tratadas con HNO_3 en microscopio óptico (técnica contraste de fases), se logró apreciar que estas diferencias (discos y estilos) se deben al desarrollo



progresivo que sufre la larva cuando aún se encuentra dentro de la esponja. En algunas larvas se notó que los estilos atravesaban el cuerpo de estas (desarrollo inicial) (**Figs. 9 y 10**), mientras que en otras, los estilos estaban dispuestos desde el radio del cuerpo (forma de disco) hacia afuera del mismo (desarrollo final) (**Figs. 9 y 10**). Sin embargo, otras más presentaron tanto estilos que atravesaban el cuerpo como otros que iban del radio corporal hacia afuera (desarrollo medio) (**Figs. 9 y 10**).

Además, en otras larvas observadas antes y después de degradarlas, se notó que estas no poseían estilos en su cuerpo y, también se apreció que estaban presentes (previo al desarrollo de los estilos) y aparentemente formados en su totalidad los discos monoaxónicos (**Fig. 10**), los cuales son característicos de este género particular.

Todas estas observaciones sugieren que la formación de los estilos en las larvas, ocurre del interior de esta (centro del cuerpo) hacia afuera y que los discos son las primeras estructuras esqueléticas que se forman en estas larvas.

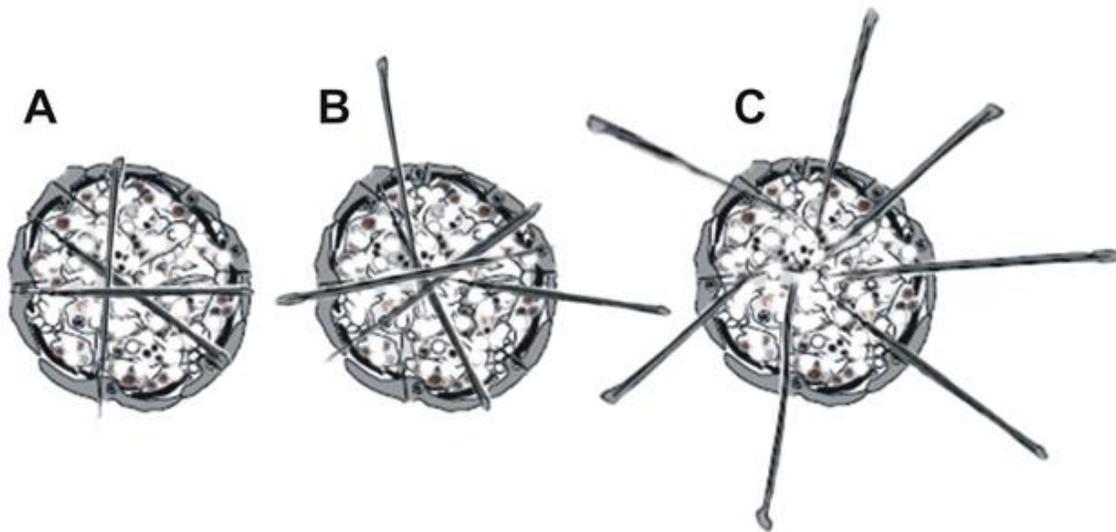


Figura 9. Desarrollo del esqueleto espicular de larvas hoplitomella del género *Thoosa* obtenidas de adultos. A) Desarrollo inicial, B) desarrollo medio, C) desarrollo final.

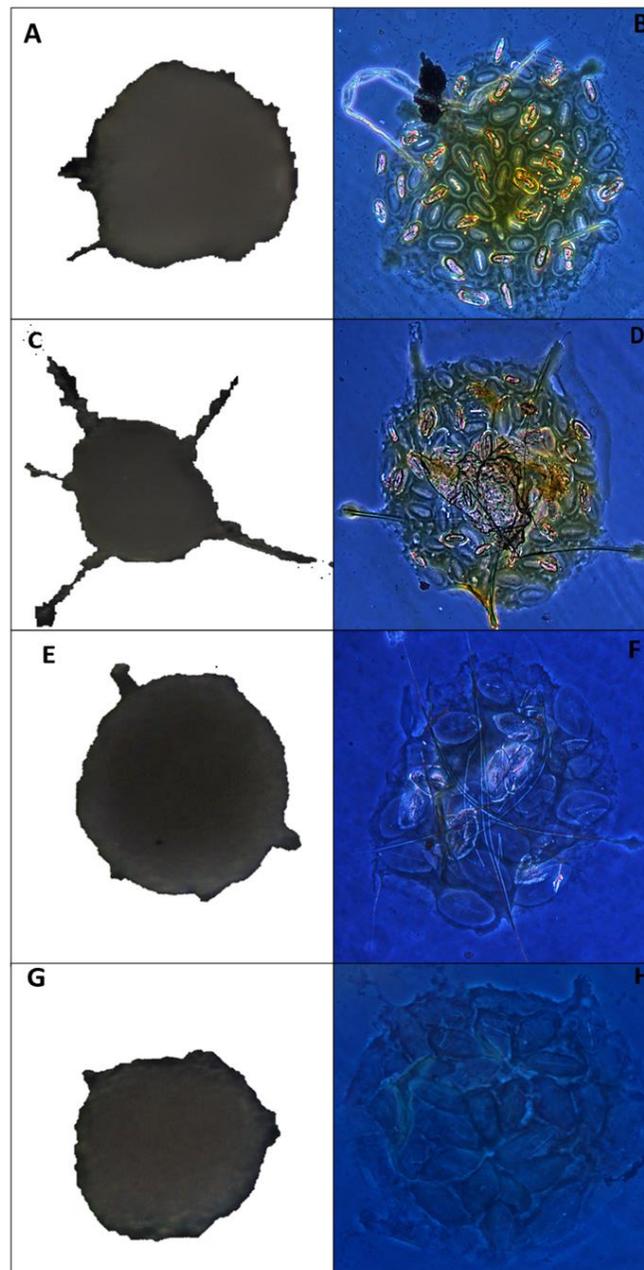
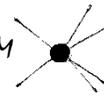


Figura 10. Larvas *Thoosa* obtenidas de adulto con diferentes fases de desarrollo. A y B) Larva *T. mismalolli* con desarrollo inicial, C y D) larva *T. mismalolli* con desarrollo final, E y F) larva *T. calpulli* con desarrollo medio, G y H) larva *T. calpulli* sin estilo aparente. A, C, E y G corresponden a las larvas antes de ser degradada. B, D, F y H corresponden a las larvas degradadas con HNO_3 .



VI.6.3 Comparación del número de discos de larvas de *Thoosa* en sus diferentes fases del desarrollo espicular

Al describir las fases de desarrollo (inicial, medio y final) del esqueleto espicular de las larvas, principalmente se tomó en cuenta la posición de los estilos, ya que estos estaban dispuestos de diferente manera en la estructura larval, en comparación de los discos que guardaban la misma disposición cubriendo el cuerpo larvario.

Para determinar si el número de discos varía entre las fases del desarrollo descritas a partir de la disposición de los estilos y comprobar si estos discos ya están formados en su totalidad antes de que inicie la formación de estilos, se contaron los discos de las larvas establecidas con este criterio de desarrollo. Los datos se organizaron en grupos y se separaron por especies (*T. calpulli* y *T. mismalolli*) para compararlos estadísticamente.

Los resultados de la ANOVA no paramétrica en *T. calpulli* mostraron que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de discos entre las larvas con desarrollo inicial y final. Mientras que la ANOVA paramétrica en *T. mismalolli* mostró que hubo diferencias ($p < 0.05$) entre el número de discos entre las larvas con desarrollo inicial y final y entre el número de discos entre larvas con desarrollo medio y final.

Tabla 4. Resultados de la ANOVA no paramétrica para discos de larvas de *Thoosa calpulli* en sus diferentes fases del desarrollo espicular. *Tc D ini*, larvas de *T. calpulli* con desarrollo inicial; *Tc D med*, larvas de *T. calpulli* con desarrollo medio; *Tc D fin*, larvas de *T. calpulli* con desarrollo final.

Depend.: Dato	Valores p Comparaciones Múltiples (2-colas); Dato (Discos de larvas <i>Thoosa calpulli</i> en desarrollo) Variable independiente (agrupada): Código Prueba Kruskal-Wallis: H (2,N=30)=11.29460 p=.0035		
	Tc D ini R:8.6000	Tc D med R:16.200	Tc D fin R:21.700
Tc D ini		0.1607	0.0026
Tc D med	0.1607		0.4872
Tc D fin	0.0026	0.4872	

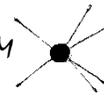


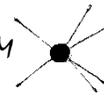
Tabla 5. Resultados de la ANOVA paramétrica para discos de larvas de *Thoosa mismalolli* en sus diferentes fases del desarrollo espicular. *Tm D ini*, larvas de *T. mismalolli* con desarrollo inicial; *Tm D med*, larvas de *T. mismalolli* con desarrollo medio; *Tm D fin*, larvas de *T. mismalolli* con desarrollo final.

Cell No.	Prueba Newman-Keuls; Dato variable (Discos de larvas <i>Thoosa mismalolli</i> en desarrollo) Probabilidades aproximadas para pruebas Post Hoc Error: Entre MS = 23.648, df = 27.000			
	Código	{1} 70.000	{2} 70.900	{3} 83.200
1	Tm D ini		0.6824	0.0001
2	Tm D med	0.6824		0.0001
3	Tm D fin	0.0001	0.0001	

VI.6.4 Descripción ultraestructural de larvas obtenidas de adultos

Se describieron los componentes a nivel ultraestructural que presenta la larva hoplitomella de la esponja *T. mismalolli* que fue obtenida de organismos adultos. Se observó que la larva presenta estructuras distintas que forman capas o regiones definidas. La primera capa o capa superficial está formada por esclerocitos que están formando los discos monoaxónicos (**Figs. 11A-B**), que cubren la superficie externa del cuerpo. Después de los esclerocitos (hacia el interior) hay una capa de células grises (**Figs. 11A, 11C-D**), las cuales, en su interior, contienen partículas de glicógeno citoplasmático, inclusiones osmiofílicas grandes y muchas inclusiones fibrilares pequeñas con colágeno y algunas bacterias que están dentro de vacuolas. Los espacios entre estas células están llenos de fibras de colágeno (**Figs. 11A, 11C-D**).

Bajo la capa conformada por células grises, se encuentra otra muy amplia, compuesta por células vacuolares, células semejantes a células grises localizadas después de los discos monoaxónicos, bacterias, partículas de glicógeno y vacuolas (**Figs. 11A, 12A-B y 12D**). Las células vacuolares al igual que las células grises, contienen partículas de glicógeno e inclusiones osmiofílicas grandes (**Fig. 12B**). Estas células también presentan numerosas vacuolas y algunas de ellas contienen en su interior una o más bacterias (**Figs. 12A-B**). Las células vacuolares en comparación con las células grises, carecen de inclusiones fibrilares y aparato de Golgi. Las células similares a las células grises de esta capa, se diferencian de las células grises encontradas al lado de los discos monoaxónicos de la larva porque poseen



un mayor número de inclusiones osmiofílicas grandes, algunas inclusiones pequeñas, vacuolas y varios aparatos del Golgi (**Figs. 12C-D**). También hay células que poseen un núcleo que abarca la cuarta parte de su superficie, partículas de glicógeno, algunas inclusiones osmiofílicas, gran cantidad de bacterias libres y múltiples aparatos de Golgi (**Figs. 13A-C**). En esta capa amplia, los espacios extracelulares están repletos de vacuolas vacías, partículas de glicógeno, bacterias libres y otras dentro de vacuolas (**Fig. 13D**). Estos espacios también contienen fibras de colágeno, pero la cantidad es menor en comparación con la capa anterior.

La parte central del cuerpo contiene una amplia variedad de estructuras que se diferencian unas con otras e incluyen arqueocitos (**Fig. 14A**), células granulares (**Figs. 14A-B**) caracterizadas por tener gránulos de similar y mayor tamaño que su núcleo, células con la misma forma y tamaño que las células granulares pero no tienen sus estructuras granulosas diferenciadas (**Figs. 14A y 14C**), células microgranulares con gránulos de tamaño similar y menor que su núcleo (**Fig. 14D**), células indiferenciadas sin núcleo (**Figs. 14A y 15A**) que contienen vacuolas, inclusiones osmiofílicas y glicógeno. En esta parte del cuerpo también se aprecian bacterias libres (**Fig. 14A**), estilos (**Figs. 15B-C**) (el centro de estos está compuesto de otra estructura distinta al sílice, mismo que conforma la parte externa del estilo) y estructuras en forma de triángulo (**Figs. 15D**).

También, en la región central de la larva, es muy notoria la presencia de coanocitos en desarrollo dispuestos de cierta manera para formar una cámara (**Fig. 16A**).

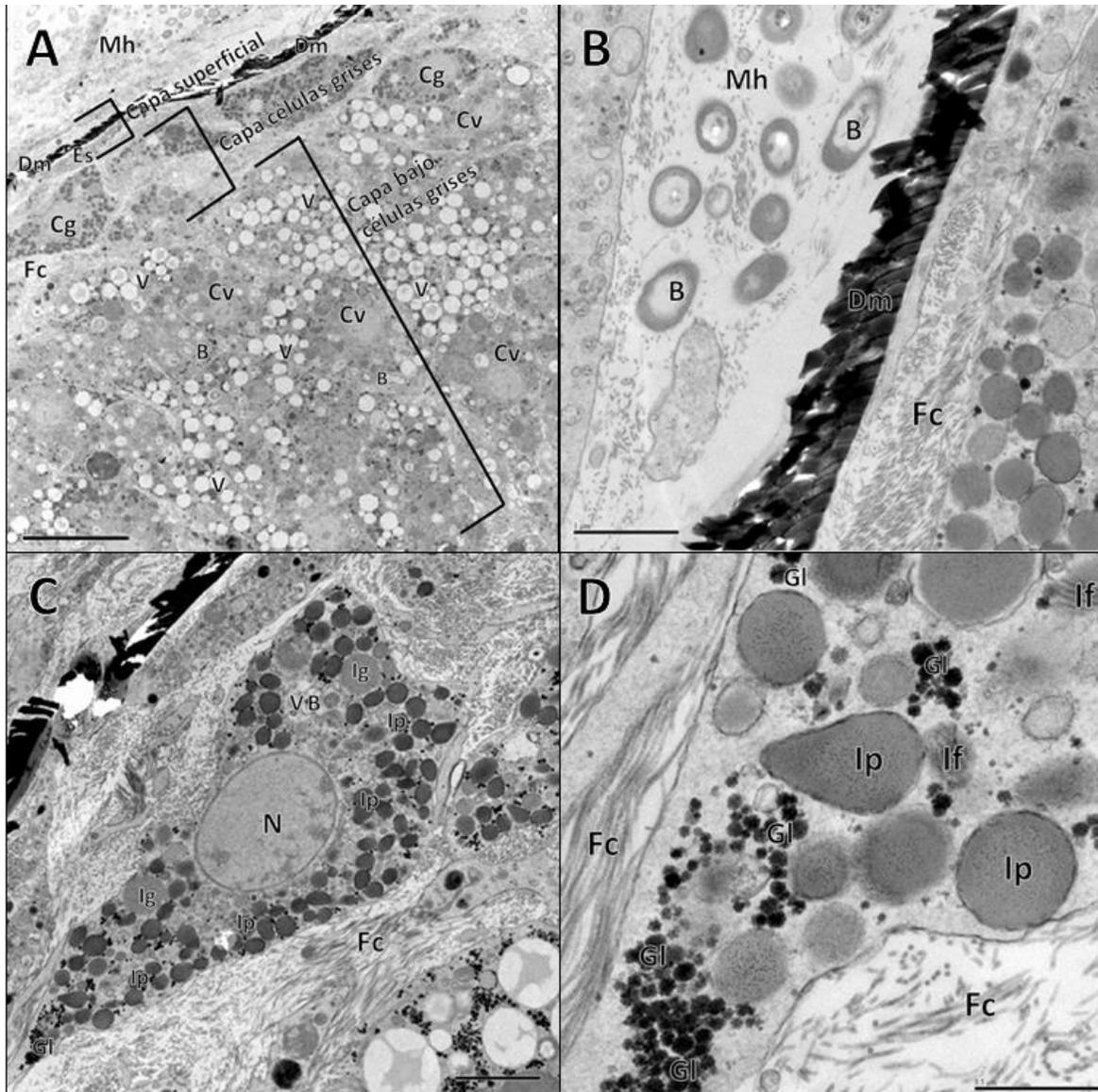
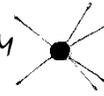


Figura 11. A) Corte del cuerpo de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida de un organismo adulto. Barra de escala: 10 μm . B) Detalle de un esclerocito conteniendo un disco monoaxónico de una larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 1 μm . C) Célula gris contenida en la capa de células grises. Barra de escala: 2 μm . D) Acercamiento de una región de la célula gris. Nótese las inclusiones osmiofílicas, inclusiones fibrilares con colágeno y múltiples partículas de glicógeno presentes en el citoplasma. Barra de escala: 0.5 μm . **Legendas:** B, bacteria; Cg, célula gris; Cv, célula vacuolar; Dm, disco monoaxónico; Es, esclerocito; Fc, fibra de colágeno; Gl, glicógeno; If, inclusión fibrilar; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; Mh, mesohilo de la esponja adulto; N, núcleo; V, vacuola.

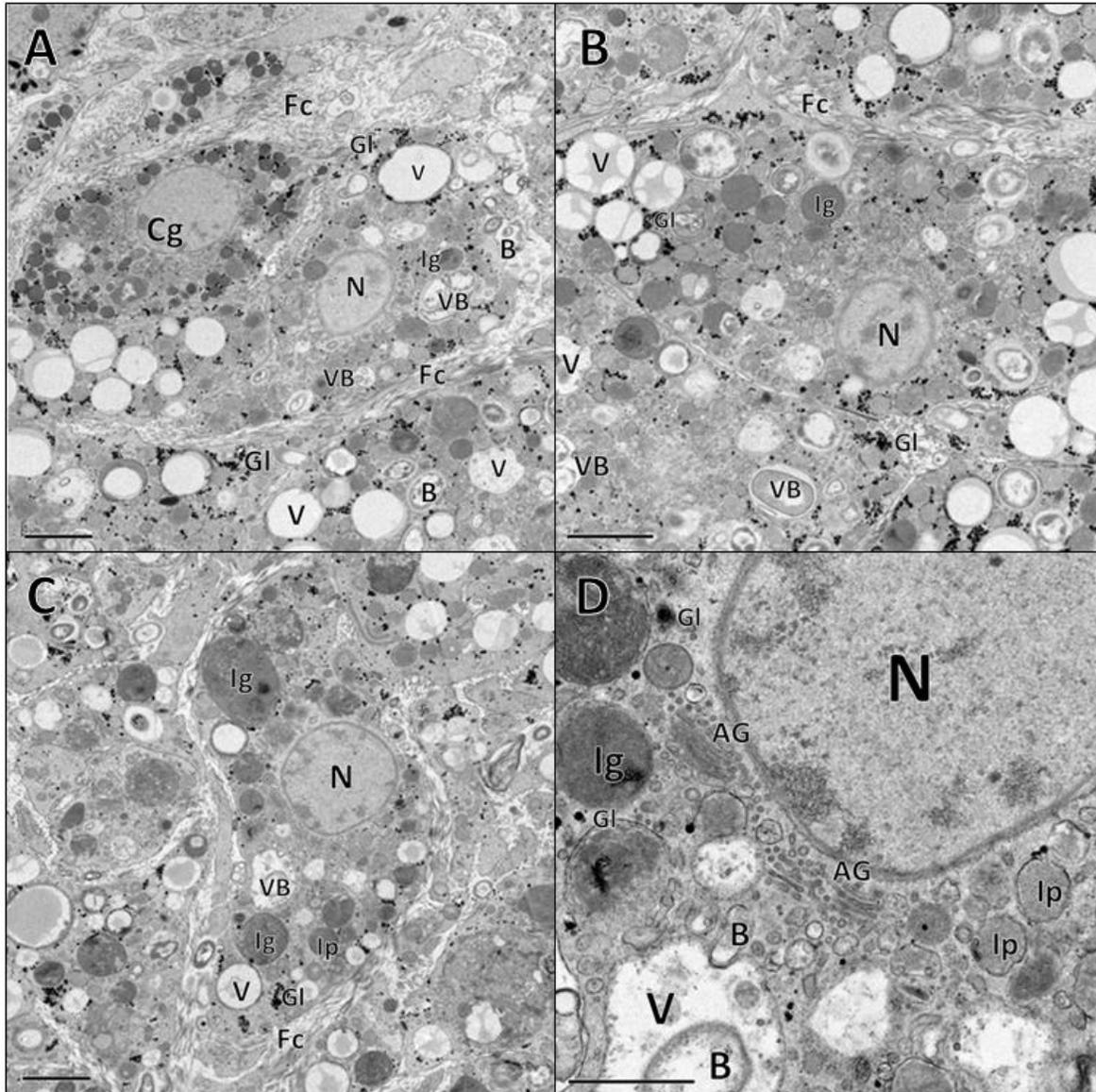


Figura 12. A) Capa encontrada bajo la capa de células grises de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida de un organismo adulto. Barra de escala: 2 µm. B) Acercamiento de una célula vacuolar encontrada bajo la capa de células grises. Barra de escala: 2 µm. C) Célula semejante a célula gris ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises. Barra de escala: 2 µm. D) Acercamiento de célula semejante a célula gris ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises. Barra de escala: 1 µm. **Leyendas:** AG, aparato de Golgi; B, bacteria; Cg, célula gris; Fc, fibra de colágeno; Gl, glicógeno; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; N, núcleo; V, vacuola; VB, vacuola conteniendo bacteria.

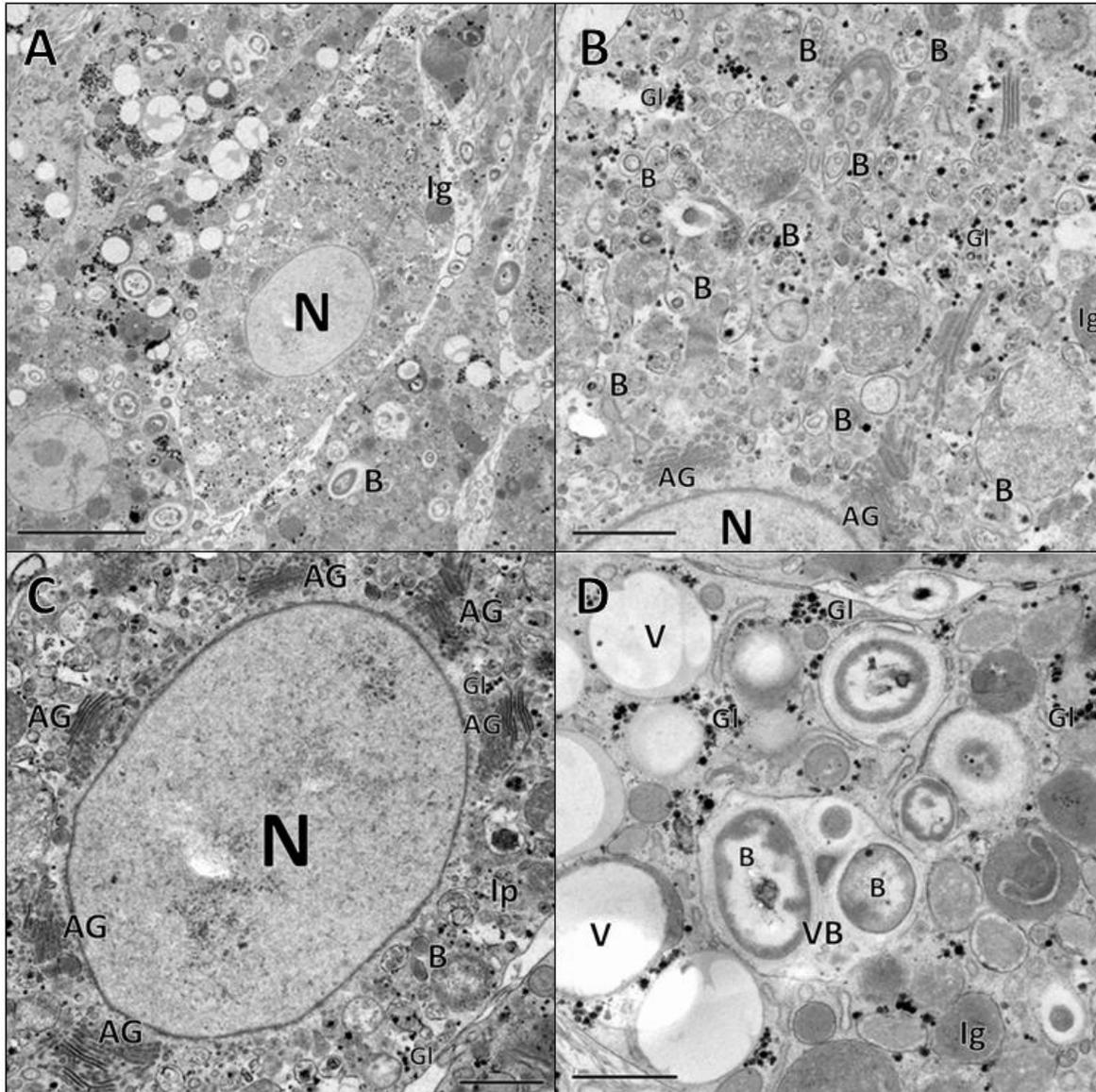


Figura 13. **A)** Célula con núcleo prominente ubicada en la capa amplia bajo la capa de células grises de una larva hoplitomella de la esponja *Thoosa mismalolli* obtenida de un organismo adulto. Barra de escala: 5 μm . **B)** Acercamiento de célula con núcleo prominente. Nótese las partículas de glicógeno y bacterias en el citoplasma. Barra de escala: 1 μm . **C)** Acercamiento de la región central de célula con núcleo prominente. Nótese las partículas de glicógeno, bacterias y los múltiples aparatos de Golgi que rodean el núcleo. Barra de escala: 1 μm . **D)** Espacio extracelular de la capa amplia bajo la capa de células grises. Nótese las bacterias, partículas de glicógeno, inclusiones osmiofílicas grandes, vacuolas y bacterias dentro de vacuolas. Barra de escala: 1 μm . **Leyendas:** AG, aparato de Golgi; B, bacteria; Gl, glicógeno; Ig, inclusión osmiofílica grande; Ip, inclusión osmiofílica pequeña; N, núcleo; V, vacuola; VB, vacuola conteniendo bacteria.

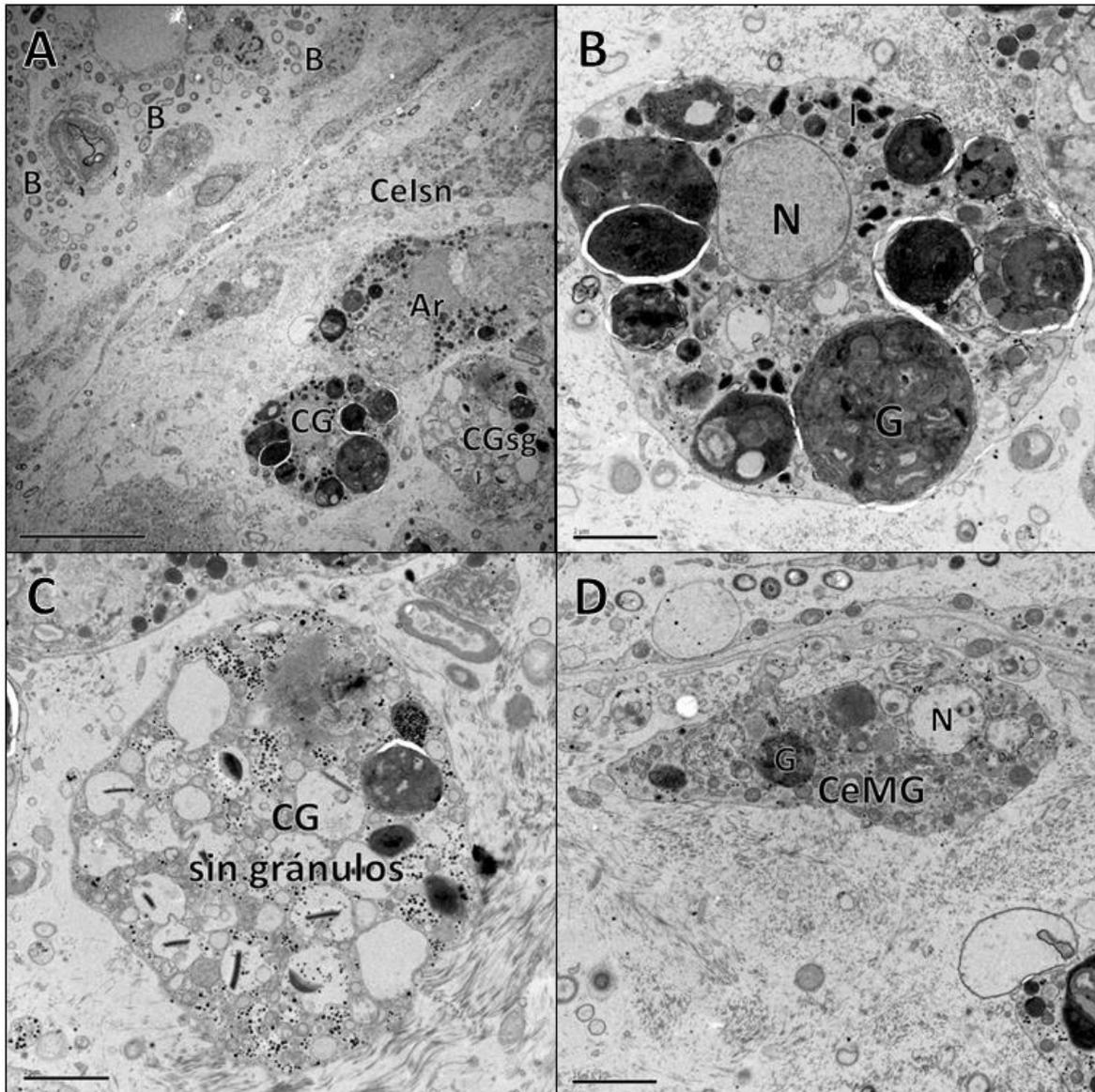


Figura 14. A) Región central de la larva de *Thoosa mismalolli*. Barra de escala: 10 μm . B) Acercamiento de célula granular ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Nótese los diferentes gránulos e inclusiones que presenta el citoplasma. Barra de escala: 2 μm . C) Acercamiento de célula con forma y tamaño similar a célula granular pero carece de gránulos. Barra de escala: 2 μm . D) Célula microgranular ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 2 μm . **Legendas:** Ar, arqueocito; B, bacteria; Celsn, célula indiferenciada sin núcleo; CG, célula granular; CGsg, célula con forma y tamaño similar a célula granular pero carece de gránulos; G, gránulo; I, inclusión; N, núcleo.

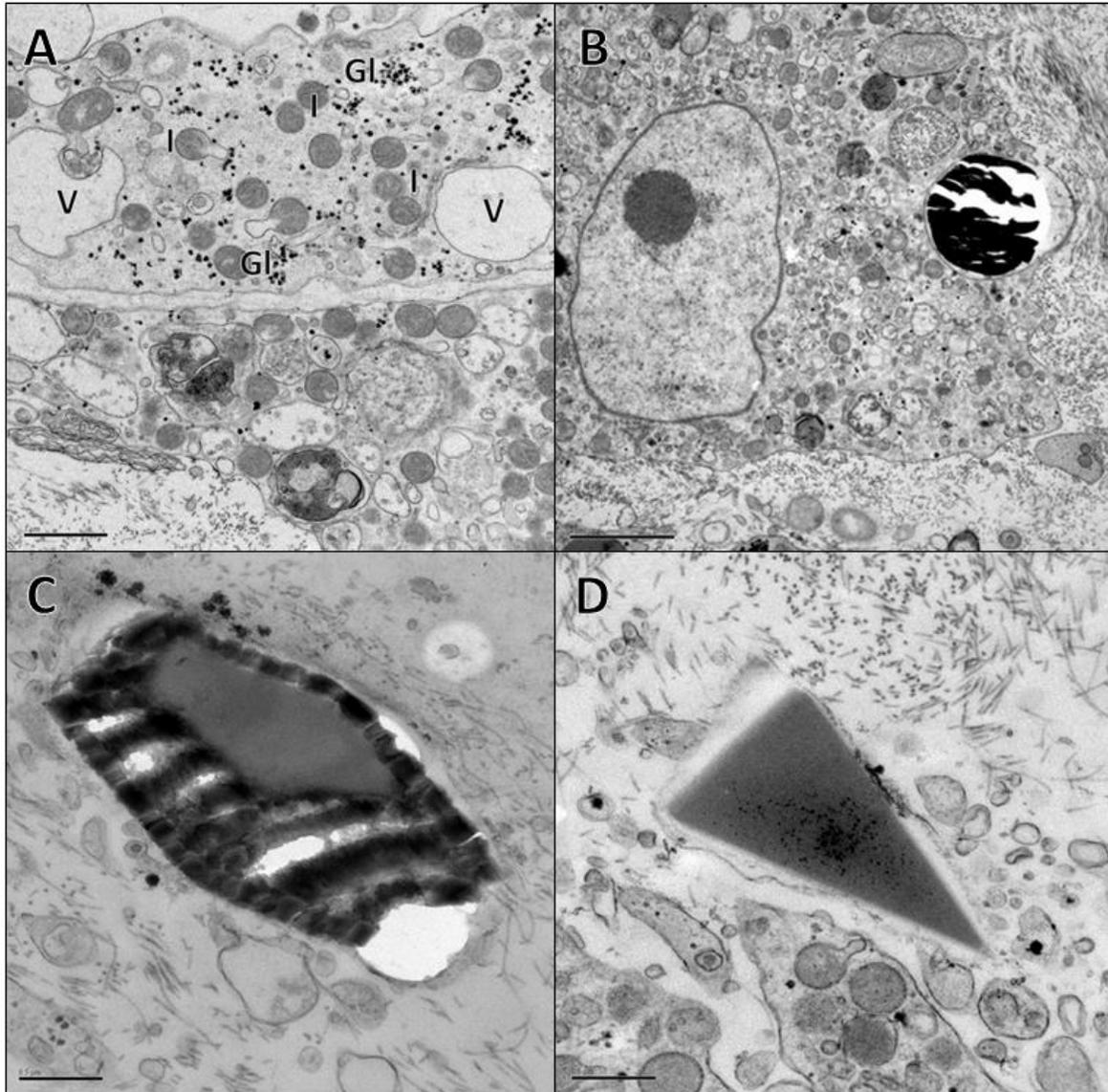


Figura 15. **A)** Acercamiento de célula indiferenciada sin núcleo ubicada en la región central de la larva de *Thoosa mismalolli*. Nótese las partículas de glicógeno, inclusiones y vacuolas que presenta el citoplasma. Barra de escala: 1 μm . **B)** Formación de un estilo en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 2 μm . **C)** Acercamiento de un estilo ubicado en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 0.5 μm . **D)** Estructura en forma de triángulo ubicada en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 0.5 μm . **Leyendas:** Gl, glicógeno; I, inclusión; V, vacuola.

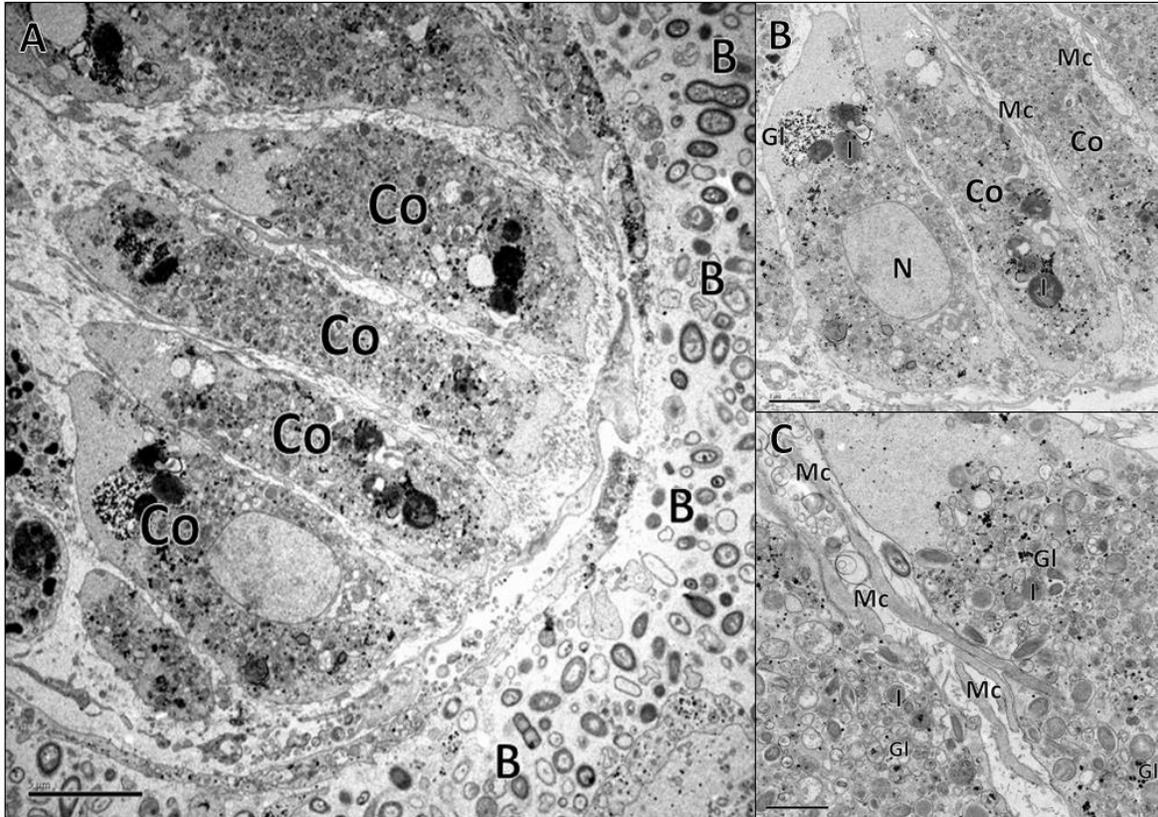
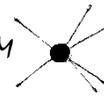


Figura 16. A) Región central de la larva de *Thoosa mismalolli* donde se observa la presencia de coanocitos arreglados para formar una cámara. Nótese que alrededor de estas células hay presencia de una gran cantidad de bacterias libres. Barra de escala: 5 μm . B) Acercamiento de coanocitos ubicados en la región central de larva *T. mismalolli*. Nótese las partículas de glicógeno, inclusiones y microvellosidades citoplasmáticas, siendo las últimas, características de estas células. Barra de escala: 2 μm . C) Acercamiento del espacio entre dos coanocitos ubicados en la región central de larva *T. mismalolli*. Barra de escala: 1 μm . **Leyendas:** B, bacteria; Co, coanocito; Gl, glicógeno; I, inclusión; Mc, microvellosidad citoplasmática.



VI.7 DISCUSIÓN

VI.7.1 Cambios externos en larvas obtenidas de adultos y en el plancton

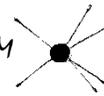
Existen estudios donde se han descrito la estructura esquelética (discos y estilos) de larvas hoplitomella, pero estos, tratan sobre su fase planctónica (Garrone 1974; Vacelet 1999; Maldonado y Bergquist 2002; Amillano-Cisneros 2014).

En el presente trabajo, se hizo una descripción esquelética tanto de las larvas de *Thoosa calpulli* y *T. mismalolli* que fueron obtenidas del interior del organismo adulto como del plancton.

Al comparar el número de discos que están presentes en larvas dentro del adulto con las que están en el plancton, resultó que hubo diferencias entre las dos especies. En *T. calpulli*, las larvas que estaban dentro de los individuos adultos presentaron 53 discos en promedio y las del plancton 59.4 discos. En *T. mismalolli*, las larvas dentro de adultos tuvieron un promedio de 74.7 discos, mientras que las planctónicas tuvieron 82.1 de estas estructuras.

Además, las larvas obtenidas de los organismos adultos, presentaron características externas distintivas, por lo que se optó por degradarlas con ácido nítrico (HNO_3) para ver la estructura esquelética y determinar a que se debían tales diferencias. Al visualizar el esqueleto, se observó que estas diferencias se deben al desarrollo progresivo que sufre la larva cuando aún se encuentra dentro de la esponja antes de formar parte del plancton. Se consideró la posición de los estilos dentro del cuerpo larval para determinar en qué fase de desarrollo se encontraba la larva. Cuando los estilos atraviesan el cuerpo de la larva, estas se encuentran en fase de desarrollo inicial. Otras larvas, donde algunos estilos atraviesan el cuerpo larval y otros se distribuyen en el radio corporal hacia afuera, se encuentran en una fase media de desarrollo. Mientras que en otras, donde los discos están dispuestos desde el radio del cuerpo larval hacia afuera de este, se encuentran en una fase final de desarrollo. Sin embargo, en otras larvas observó que después de degradarlas y ver su estructura esquelética, estas no tenían estilos, pero los discos aparentemente estaban formados en su totalidad.

Al comparar el número de discos entre las distintas larvas en desarrollo de las dos especies de estudio, se determinó que en las larvas de *T. calpulli* hubo diferencias significativas en el número de discos en larvas con desarrollo inicial con respecto al



desarrollo final. Mientras que en las larvas de *T. mismalolli*, las diferencias fueron entre larvas con desarrollo final con relación a las del desarrollo inicial y medio.

En base a estas observaciones, se sugiere que los discos son las primeras estructuras esqueléticas que se forman en las larvas hoplitomella del género *Thoosa* y están presentes sólo en la capa externa del cuerpo. Una vez formado la mayoría de los discos, da inicio la formación de los estilos en la región central de la larva (**Fig. 15B**) y a medida que se va desarrollando esta, estos cambian su organización en el cuerpo larval antes de salir del organismo adulto para formar parte del plancton.

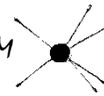
El desarrollo en el número de los discos es continuo mientras se forman y organizan los estilos en las distintas fases de desarrollo. Dado esto, es distinto el número de discos entre las distintas fases de desarrollo en las larvas hoplitomella de *Thoosa*.

VI.7.2 Descripción ultraestructural de larvas de *Thoosa* obtenidas de adultos

Diferentes trabajos han descrito la ultraestructura de algunos tipos de larva del phylum Porifera (Garrone 1974; Simpson 1984; Uriz *et al.* 2008). Uno de estos es el de Garrone (1974), quien al describir la ultraestructura de una larva hoplitomella planctónica del género *Alectona*, encontró que se distinguen tres regiones o zonas (superficial, media y central) con ciertas características distintivas. Desde entonces no se han realizado trabajos que describan la ultraestructura de este tipo de larva, salvo el de Simpson (1984) quien retomó lo dicho por Garrone.

En el presente trabajo, se describió la ultraestructura de la larva tipo hoplitomella de la especie *Thoosa mismalolli* estando aún dentro de un organismo adulto. Al analizar la ultraestructura es notorio que existen diferentes regiones o capas que presentan algunas similitudes y diferencias con respecto a la larva planctónica descrita por Garrone (1974) y retomada por Simpson (1984).

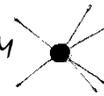
En la capa superficial se asemejan en que tienen formados discos silíceos llamados discos monoaxónicos en larvas del género *Thoosa* y discotrienas en *Alectona*. La diferencia en esta capa radica en que en la larva de *Alectona* las discotrienas por la parte exterior de la larva están rodeadas de unas células denominadas T-exopinacocitos e inmediatamente se encuentran algunas células esferulosas provistas de bacterias. Mientras que en la misma capa, en la larva de *T. mismalolli* solo hay esclerocitos formando los discos monoaxónicos.



Esto implica que la larva aún se encuentra en alguna etapa de desarrollo. Por la parte externa de la larva en desarrollo, los esclerocitos están rodeados por el mesohilo de la esponja adulto, el cual contiene bacterias libres, células de diferente tipo y fibras de colágeno.

La siguiente capa se asemeja en que tienen las llamadas células grises, las cuales contienen glicógeno en el citoplasma, inclusiones osmiofilicas y fibrilares, y bacterias dentro de vacuolas. Sin embargo, existen ciertas diferencias entre estas células. En la larva de *Alectona*, las inclusiones osmiofilicas son homogéneas (similar tamaño), mientras que en las de *T. mismalolli* existen algunas inclusiones grandes y muchas pequeñas. Otra semejanza en esta capa, es la presencia de colágeno en los espacios que hay entre las células. Las diferencias entre estas capas son que en *Alectona*, además de las células grises, hay arqueocitos que contienen bacterias intravacuolares, gran cantidad de glicógeno en el citoplasma, inclusiones fibrilares y alta acumulación inusual de glicógeno rodeando la membrana. Otro tipo de célula presente es la célula granular la cual está compuesta de glicógeno y numerosos microvesículas. En *T. mismalolli*, en tal capa no se encuentran dichas células.

La siguiente capa, al compararlas, resulta que son muy diferentes entre las larvas de los dos géneros. En *Alectona*, esta capa denominada zona central es caracterizada por la presencia de coanocitos organizados dentro de cámaras. También contiene otras células, pero dado el aspecto uniforme de su núcleo y de su citoplasma, no es posible determinar el tipo de célula porque están degeneradas. Mientras que en *T. mismalolli* la capa bajo las células grises es muy amplia y está formada por células vacuolares, las cuales son caracterizadas por poseer numerosas vacuolas y algunas de ellas tienen dentro bacterias. También en esta capa hay células semejantes a células grises pero estas tienen un mayor número de inclusiones osmiofílicas grandes y varios aparatos de Golgi, así como células con un núcleo que abarca la cuarta parte de su superficie y poseen una gran cantidad de bacterias libres en el citoplasma y múltiples aparatos de Golgi. Los espacios entre estas células están llenos partículas de glicógeno, vacuolas tanto vacías como con bacterias, y bacterias libres. Además, entre estas estructuras hay fibras de colágeno pero en menor medida que la capa anterior donde sólo hay células grises.



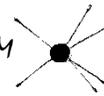
Bajo esta capa en *T. mismalolli*, se encuentra finalmente la capa central del cuerpo. Esta contiene numerosas estructuras las cuales se diferencian unas con otras. En la capa están presentes arqueocitos, células granulares, células con forma y tamaño similar que las granulares pero que no tienen los gránulos característicos de estas células, así como células microgranulares, células indiferenciadas sin núcleo que poseen vacuolas, inclusiones y glicógeno. Asimismo, en el corte de esta capa se observan numerosas bacterias libres, estilos y estructuras en forma de triángulo. La presencia de estilos en esta región, indica que ahí se originan estos y es a partir de las células llamadas esclerocitos. En el corte del estilo, es notorio que el centro de este (canal axial) está compuesto de colágeno, el cual es el punto de origen de la asimilación de sílice que conforma la capa externa de los estilos. Con respecto a las estructuras en forma de triángulo, estas aún son de naturaleza desconocida, aunque tienen un color similar que el canal axial de los estilos vistos al corte, por lo que se podría asumir que esta estructura es previa a la formación de los estilos si la larva aún se encuentra en desarrollo dentro del organismo adulto.

También, en la región central de la larva de *T. mismalolli* obtenida del organismo adulto, se nota al igual que en la larva planctónica de *Alectona*, la presencia de coanocitos organizados para formar una cámara, pero estas células aún se encuentran en desarrollo en *T. mismalolli*.

VI.7.3 Funciones de las células observadas en la larva hoplitomella

Las diferentes células contenidas en cualquier organismo cumplen diferentes funciones dentro de este. En esponjas, las funciones de estas células van desde la protección y reparación del mesohilo, provisión de nutrientes, así como formación de estructuras de soporte que le dan la forma al organismo (espículas y fibras de colágeno).

En las larvas hoplitomella (de *Alectona* y de *Thoosa mismalolli*) es muy notoria la presencia de células grises, las cuales, al parecer, se relacionan con la síntesis y acumulación de glicógeno (Boury-Esnault 1977), así como con la elaboración y secreción de colágeno (Garrone 1974; Boury-Esnault 1977). También, las células grises son una fuente clave de energía metabólica para procesos regenerativos y de crecimiento (Boury Esnault 1977; Boury Esnault y Doumenc 1979). El glicógeno producido funciona como una gran fuente de energía. Mientras que el colágeno, comúnmente producido por lofocitos y



colencitos en esponjas adultas, son los encargados de dar protección y soporte al cuerpo de la esponja.

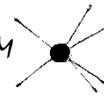
Con respecto a las denominadas inclusiones osmiofílicas, Simpson (1984) indicó que estos gránulos o inclusiones no reaccionan con peróxido e infirió que podrían ser lípidos, los cuales fungen como una fuente de energía.

Otras células presentes en las larvas de *Alectona* y de *T. mismalolli* son arqueocitos, células granulares, coanocitos y esclerocitos. Los arqueocitos tienen la función de fagocitar partículas y diferenciarse en otros tipos de células para cumplir otras funciones, por lo que también se les conoce como células totipotentes.

Referente a las células granulares, Rützler *et al.* (2003) no explicaron una función específica de este tipo de células, pero intentaron definir la función de los gránulos presentes en el citoplasma de estas células en organismos adultos de la esponja caribeña de arrecifes de coral *Svenzea zeai* y asumieron que tales estructuras pueden estar compuestas de proteínas o lípidos, ya que ellas no tienen propiedades minerales, absorben la tinción histológica, son fagocitadas y digeridas durante la formación de embriones. También, encontraron que las lavas de esta esponja (parenquímula) poseen las mismas células, pero sus gránulos son pequeños con respecto a las células de adultos. Basándose en tal argumento y dado que se encontraron también en las larvas de *Thoosa* del presente estudio (antes en hoplitomella de *Alectona*), estas células también pueden poseer gránulos compuestos de proteínas o lípidos y cumplir la función de proveer energía de reserva a la larva.

Los coanocitos (células que tienen un flagelo central rodeado por un collar de microvellosidades citoplasmáticas) no son comunes en las larvas, pero en los adultos provocan corrientes de agua hacia el interior del organismo, las cuales transportan partículas como virus, bacterias, fitoplancton y materia orgánica en suspensión que después quedan atrapadas para ser fagocitadas y puedan usarse como alimento. Los esclerocitos son los encargados de la síntesis intracelular de espículas.

En los espacios intercelulares de las larvas de ambas especies (*Alectona* y *Thoosa mismalolli*) hay vacuolas vacías, vacuolas con bacterias, así como bacterias libres. Las bacterias, cuando son fagocitadas por las vacuolas, sirven como una fuente de nutrientes y



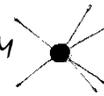
energía adicional al organismo para llevar a cabo sus funciones vitales y poder resistir más en el estadio planctónico.

La larva planctónica hoplitomella descrita por Garrone (1974) también tiene T-exopinacocitos y células esferulosas. Los T-exopinacocitos son células en forma de T que cubren la superficie libre de la esponja y que la delimita con el medio externo (Boury-Esnault y Rutzler 1997). Las células esferulosas son un componente obligatorio del mesohilo en esponjas adultas, tienen una importante función de protección (immune) y secretora (Ereskovsky 2010).

En el presente estudio, al describir la larva hoplitomella de *Thoosa* dentro de un organismo adulto, estas células estaban ausentes. Sin embargo, tenía otras que no estaban en la larva planctónica de *Alectona*, tales como células vacuolares, células microgranulares caracterizadas por tener gránulos como las células granulares pero de tamaño menor, células semejantes a células grises, células con gran núcleo con inclusiones similares a las células grises, células con misma forma y tamaño que las células granulares pero no poseen los gránulos característicos, así como células indiferenciadas sin núcleo que contenían vacuolas, inclusiones osmiofílicas y glicógeno. Las células vacuolares contienen vacuolas y bacterias las cuales pueden ser fagocitadas cuando se requiere otra fuente de energía, además del glicógeno y lípidos. Con respecto a las células microgranulares dentro de esponjas, Simpson (1984) menciona que no están involucradas en la síntesis de colágeno y Sciscioli *et al.* (2000) mencionan que participan en la síntesis de la glicoproteína componente de la matriz extracelular.

Es posible que las larvas de estos organismos al ser de distinta especie, desarrollen distintos tipos de células, o bien, algunas de las ausentes en ambas larvas se pueden desarrollar en otra etapa de desarrollo.

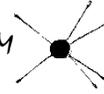
De la variedad de células encontradas tanto en la larva planctónica de *Alectona* por Garrone como en la larva de *T. mismalolli* obtenida de un adulto en el presente trabajo, algunas de ellas presentan semejanzas en la forma y organización de sus organelos. Las semejanzas atribuidas entre las células permiten considerar las relaciones que hay entre los diferentes tipos celulares (Garrone 1974), mismas que al presentar organelos similares posiblemente realicen también funciones parecidas como producir fibras de colágeno, así como generar, poseer y consumir distintas reservas de energía.



Si comparamos la estructura de la larva tipo hoplitomella de *Alectona millari* y de *Thoosa mismalolli*, existen diferencias claras en las células y otras estructuras presentes en las distintas capas. Pero, estas diferencias no son suficientes para determinar si hay variación ultraestructural entre estas larvas y menos si pueden tener una misma capacidad de dispersión, ya que el análisis corresponden a larvas obtenidas en diferentes estadios de desarrollo (larva planctónica de *A. millari* y larva en desarrollo en adulto de *T. mismalolli*). Para determinar adecuadamente si hay o no diferencias entre estas larvas, es necesario recolectar y analizar larvas con las mismas condiciones de desarrollo. No obstante, al analizar la estructura esquelética (discotrienias y discos monoaxónicos) entre las larvas planctónicas de ambas especies, está claro que hay diferencias entre ellas (las discotrienias de *Alectona* tienen una depresión en el centro y los discos de *T. mismalolli* también tienen una depresión en la misma zona pero tal depresión tiene múltiples ornamentaciones redondeadas), por lo que se puede sugerir que existe alguna diferencia a nivel ultraestructura entre las larvas hoplitomella de *A. millari* y de *T. mismalolli*.

En los organismos de los distintos phyla, los diferentes elementos energéticos que contienen (ATP, carbohidratos, lípidos y proteínas), tienen la función de proveer reservas para llevar a cabo procesos vitales. La composición de estos elementos es diferente entre los grupos de organismos, variando por ello su función. En esponjas adultas, sirven para proveer los nutrientes necesarios para poder llevar a cabo un adecuado ciclo reproductivo principalmente (el cual requiere de mucha energía), así como reserva alimenticia ante alguna situación estresante.

Las reservas de energía contenidas en los propágulos de organismos bentónicos de diferentes grupos taxonómicos, se puede correlacionar con la duración de vida planctónica y con la distancia de dispersión (Shanks *et al.* 2003). Los propágulos de algunos organismos permanecen en el plancton algunos minutos y otros incluso meses, y este tiempo se relaciona con la distancia de dispersión que van desde pocos metros hasta miles de kilómetros. Por ejemplo, la larva del tunicado *Diplosoma similis* permanece 3.8 minutos en promedio en el plancton y se dispersa 2.2 metros en promedio (Shanks *et al.* 2003). En cambio, la larva del gasterópodo *Cymatium parthenopeum* puede permanecer hasta 293 días en el plancton y dispersarse hasta 4400 km (Shanks *et al.* 2003).



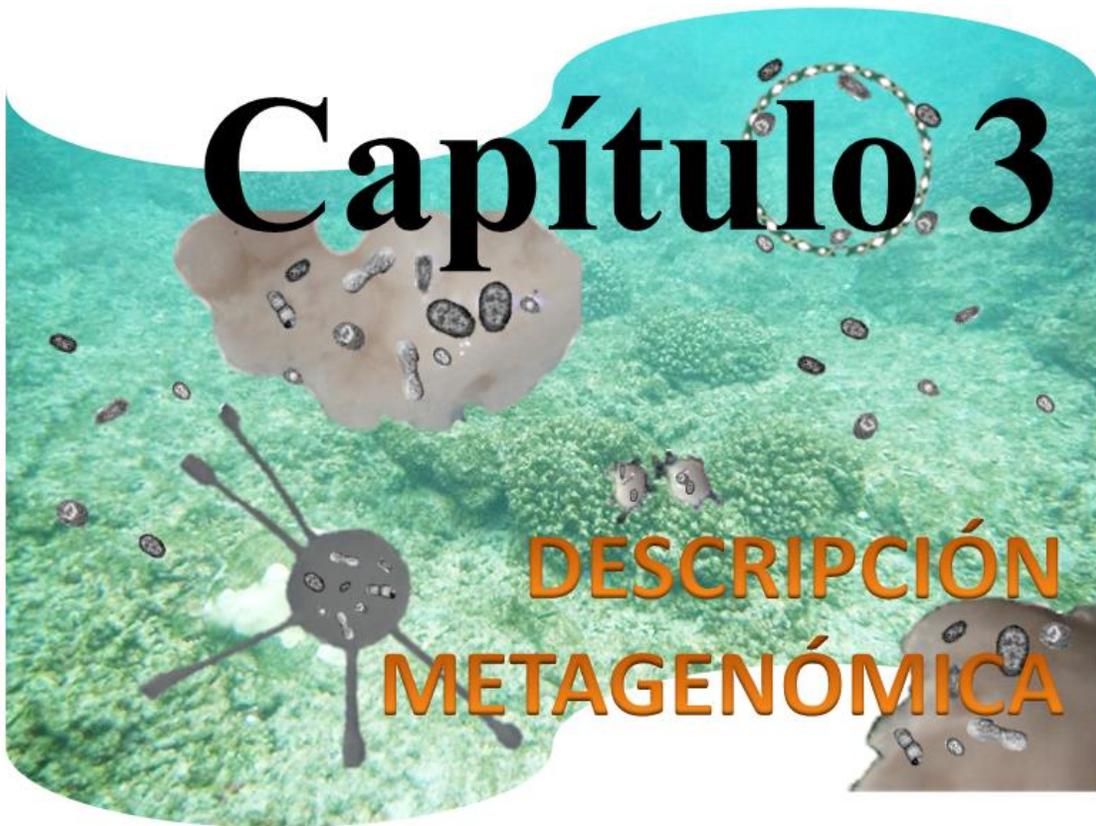
En esponjas, se puede definir el comportamiento que tienen los distintos tipos de larvas en el medio conforme a los elementos energéticos que presentan, así como el tiempo que permanece en el plancton. Sin embargo, en un mismo tipo de larva, pero de distinta especie, estos componentes pueden variar, provocando así que el comportamiento y la dispersión sean diferentes. Por ejemplo, las estructuras que presentan las larvas tipo parenquímula de las especies *Cacospongia mollior* y *Scopalina lophyropoda*, son distintas. La larva de *C. mollior* tiene lípidos, glicógeno y bacterias extracelulares que son fagocitadas por células ciliadas que están en el interior de la larva (Uriz *et al.* 2008). Esta variedad de elementos les sirven como una gran fuente energética para el nado y una mayor capacidad de dispersión, comprobada por la amplia distribución de la especie. En cambio, la larva de *S. lophyropoda* sólo contiene lípidos como reserva de energía y esto causa que tenga un nado discontinuo y baja capacidad de dispersión (Uriz *et al.* 2008).

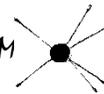
En la larva tipo coeloblastula o amphiblastula de la esponja calcárea *Leucosolenia laxa*, Amano y Hori (2001) encontraron que de las cuatro tipos de células que posee (células flageladas, con forma de botella, vacuolares y libres en la cavidad central) algunas contienen en su interior como reserva energética gotas de lípido (células flageladas y en forma de botella). Además, esta larva posee bacterias simbiotes en la cavidad central. Amano y Hori también indicaron que esta larva se asienta después de nadar y estar en la columna de agua un periodo próximo de 36 horas. Este corto periodo de vida larvaria está influenciado por la escasa variedad de reserva de energía que posee, misma que se agota con más rapidez ya que el organismo en cuestión es nadador. Dado esto, se podría inferir que su capacidad de dispersión es corta.

En las larvas de *Alectona millari* y *Thoosa mismalolli* se han encontrado diferentes reservas energéticas (partículas de glicógeno, bacterias que pueden ser fagocitadas y lípidos en forma de inclusiones osmiofílicas), por lo que es posible (aunque esta larva no sea nadadora como otros los tipos de larva de esponjas y por lo cual no gasta energía realizando esta actividad), que gracias a tanta energía almacenada permanezca el tiempo suficiente en el plancton como para ser transportada a otro lugar donde pueda asentarse y formar una nueva población.

Capítulo 3

DESCRIPCIÓN
METAGENÓMICA

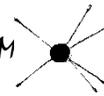




RESUMEN

Por medio de metagenómica, se hizo una descripción de las bacterias que están presentes en larvas *Thoosa mismalolli* en etapa de desarrollo y planctónica, adultos de la misma especie y agua donde se encuentran estos organismos. El número de phyla encontrados fue considerable (48), de los cuales 14 representaron más del 99% de la abundancia bacteriana, la cual varió entre las muestras. Además, al comparar el número de phyla presentes entre las distintas muestras, se notó que algunos sólo se encuentran en las larvas de esponja y sus adultos, mientras que otros están tanto en las esponjas como en las muestras de agua donde se encontraron. El haber encontrado phyla sólo en esponjas como Chloroflexi, es indicativo de que existe una transmisión vertical de bacterias de los organismos adultos hacia las larvas cuando éstas se encuentran en desarrollo dentro del parental y dado esto, se asume hay una asociación simbiótica entre estos tipos de bacterias con la esponja. Igualmente, al encontrarse otros phyla como Proteobacteria en las esponjas y en el medio donde se recolectaron estos organismos, mostró que también existe la llamada transmisión horizontal de bacterias desde el medio acuático hacia las esponjas y, gracias a este proceso, es posible la interacción predador-presa entre las esponjas y bacterias, misma que es indispensable para la sobrevivencia de estos organismos filtradores.

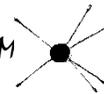
Palabras claves: Metagenómica, *Thoosa mismalolli*, larva, plancton, adulto, agua, transmisión vertical, simbiosis, transmisión horizontal, interacción predador-presa.



ABSTRACT

Using metagenomics technique, was made a description of the bacteria contained in larvae *Thoosa mismalolli* in development and planktonic stage, adult sponge and seawater where they live. In the samples was found 48 phyla, with 14 represent more than 99% of the bacterial abundance and this was different between the samples. Moreover, when comparing the number of phyla between different samples, it was noted that some of them are only found in sponge larvae and adults, while others are both in sponges and in the seawater. Among phyla, having found Chloroflexi only in sponge, is indicative that there a vertical transmission of bacteria from adults to larvae and, given this, it is assumed that there is a symbiotic association between this type of bacteria with the sponge. Alike, having found Proteobacteria in sponges and seawater, showed that there is also the called horizontal transmission of bacteria from the aquatic environment into sponges and, through this process is possible predator-prey interaction between sponges and bacteria, which is indispensable for the survival of these filter feeders.

Key words: Metagenomics, *Thoosa mismalolli*, larvae, plankton, adult, seawater, vertical transmission, symbiotic association, horizontal transmission, predator-prey interaction.



VII.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios donde se describen bacterias en esponjas, y en el medio ambiente, comenzaron hace más de dos décadas (Wilkinson 1978b; Santavy *et al.* 1990; Santavy y Colwell 1990) siguiendo métodos que han ido evolucionado a lo largo del tiempo.

El primer método para detectar bacterias en esponjas fue mediante microscopía (óptica y electrónica), del cual se han realizado múltiples trabajos (Garrone 1974; Vacelet y Donadey 1977; Wilkinson 1978b, 1978c, Simpson 1984; Friedrich *et al.* 1999; Friedrich *et al.* 2001), seguido del cultivo de bacterias (Santavy *et al.* 1990; Santavy y Colwell 1990; Friedrich *et al.* 2001; Webster *et al.* 2001), la fluorescencia de hibridación *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (Friedrich *et al.* 1999; Friedrich *et al.* 2001; Webster *et al.* 2001), y más recientemente, a través de métodos moleculares (Webster *et al.* 2001; Webster y Hill 2001; Enticknap *et al.* 2006, Fromont *et al.* 2015).

Sin embargo, las características morfológicas no son suficientes para clasificarlas taxonómicamente, ya que ciertas bacterias aunque presentan la misma forma, pueden pertenecer a grupos taxonómicos muy diferentes entre sí (Imhoff y Stöhr 2003). Por otra parte, aislar las bacterias de las esponjas para cultivarlas y estudiar características adicionales resulta un método difícil, debido a que estos microorganismos son ampliamente selectivos para la elección de un medio de cultivo convencional, y sólo una pequeña fracción de las bacterias presentes dentro de una esponja se puede cultivar (Santavy *et al.* 1990; Webster y Hill 2001; Friedrich 2001; Imhoff y Stöhr 2003).

La fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH) de las bacterias individuales usando pruebas oligonucleótidas con objetivo el gen ARNr 16S, es una poderosa técnica con la cual se evalúan la identidad filogenética, morfología, abundancia y lugar donde se encuentran estos microorganismos en los entornos ambientales (posición dentro del organismo hospedero, en su caso) (Amann *et al.* 1995; Hugenholtz *et al.* 2001).

El uso de aproximaciones moleculares para la descripción de la diversidad microbiana, ha incrementado el conocimiento de la estructura poblacional en comunidades naturales de microorganismos (Webster *et al.* 2001), y en las esponjas, ha resultado muy efectivo, ya que a partir de segmentos del ADNr y ARNr 16S amplificados, pueden ser obtenidas secuencias específicas y a partir de ellas, se identifican un gran porcentaje de las bacterias contenidas en una muestra. Estas aproximaciones moleculares van desde análisis de



secuencias del gen 16S ARNr (Webster *et al.* 2001; Enticknap *et al.* 2006) y análisis moleculares de bacterias simbioses vía secuenciación de la región V1-V3 del gen ADNr 16S (Fromont *et al.* 2015), las cuales permiten la identificación del 99% de las bacterias que no pueden ser actualmente cultivadas (Rappé y Giovannoni 2003; Chen y Pachter 2005).

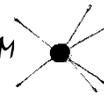
La aplicación de este tipo de técnicas modernas que tienen la finalidad principal de estudiar las comunidades de microorganismos presentes en un ambiente natural (agua, organismos, etcétera), sin tener la necesidad de separarlas y cultivarlas, es conceptualizada como metagenómica (Chen y Pachter 2005).

Las principales ventajas de la técnica metagenómica son que estima el 99% de las especies microbianas contenidas en la muestra, la secuenciación es posible realizarla por medio de diferentes instrumentos los cuales varían en precios y velocidad para generar datos secuenciados, siendo el Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies) relativamente más barato y rápido en comparación a otros aparatos de secuenciación (**Tabla 6**).

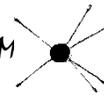
Tabla 6. Comparación entre algunas plataformas de secuenciadores de ADN. Los precios (\$) están dados en dólares americanos. (Modificado de Mardis 2008)

	Plataforma			
	Roche (454)	Illumina	SOLiD	Ion Torrent
Precio del aparato (USD)	\$108,000	\$125,000	\$135,000	\$50,000
Costo por corrida (USD)	\$8,439	\$8,950	\$17,447	\$1,000
Costo por Mb (USD)	\$84.39	\$5.97	\$5.81	\$2.22
Mb/corrida	100 Mb	1,300 Mb	3,000 Mb	300-600Mb
Tiempo/corrida	7 horas	4 días	5 días	4 horas
Longitud de lectura	250 pb	32-40 pb	35 pb	230-260 pb

En este capítulo, se utilizó la metagenómica para comprobar la existencia de bacterias dentro de la especie *Thoosa mismalolli* tanto de adultos como de larvas en sus diferentes estadios de su ciclo (dentro de adulto y plancton), así como las presentes en el medio circundante (hábitat) donde se encuentran los organismos adultos (agua adyacente a colonias de coral) y las larvas planctónicas (agua de la ZNBT). Además, a partir de esto se



observó la variación de estas bacterias en los distintos organismos, con el fin de determinar los mecanismos por los cuales las larvas obtienen bacterias (transmisión vertical y/o medio circundante).



VII.2 ANTECEDENTES

En distintos trabajos que tienen como fin la identificación de bacterias en esponjas y en larvas, se han usado cuatro diferentes métodos (microscopía, cultivo, FISH y análisis moleculares), los cuales se han desarrollado en diferentes épocas, considerando la disponibilidad de recursos (equipo tecnológico y mejoramiento de técnicas para lograr una mejor identificación).

Los métodos basados en análisis moleculares han resultado hoy día los más viables porque a partir de estos se han logrado describir la mayoría de las bacterias contenidas en una muestra. Para lograr la secuenciación de bacterias presentes en esponjas, se han desarrollado trabajos con métodos que utilizan distintas tecnologías (aparatos) de secuenciación y así, llegar finalmente al mismo objetivo. Entre estos trabajos se encuentran el realizado por Webster *et al.* (2001), quienes describieron las bacterias en la esponja *Rhopaloeides odorabile* por medio de secuencias del gen ARNr 16S obtenidos de fragmentos clonados de ADN usando el secuenciador automático ABI 373 (Applied Biosystems, Foster City, California), y encontraron que esta esponja contiene distintos grupos de bacterias (Actinobacteria, Gamma-Proteobacteria, Cytophaga-Flavobacterium y bacteria verde no sulfurosa), correspondiendo el 71% de los clones a los grupos Actinobacteria (30%) y Gamma-Proteobacteria (41%).

Enticknap *et al.* (2006) determinaron que en la esponja *Mycale laxissima* existe una transmisión vertical de bacterias simbiotes del adulto a la larva. A partir de la identificación de las bacterias por medio de secuencias del gen ARNr 16S amplificado del ADN total de la muestra (adulto y larva) y usando el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, California), definieron que eran prácticamente los mismos grupos de bacterias (Alphaproteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Cianobacteria, Actinomycetes y Flexibacter) tanto en el organismo adulto como en la larva.

Otro trabajo referente para detectar bacterias en esponjas fue el realizado por Fromont *et al.* 2015, quienes a través de análisis moleculares de bacterias simbiotes vía secuenciación de la región V1-V3 del gen ARNr 16S usando el secuenciador Illumina, determinaron que hay 25 phyla bacterianos en la esponja calcárea *Leucetta prolifera*, de los cuales algunos tienen facultades simbióticas (Cianobacteria). De este análisis, resultó que de 3 muestras de esta esponja, el 61.5% ($\pm 7.6\%$) de las secuencias correspondieron al phylum



Proteobacteria, el 17.5% ($\pm 3.5\%$) a Bacteroidetes, 16.7% ($\pm 9.1\%$) a Cyanobacteria y 1.5% ($\pm 1.5\%$) a Actinobacteria. Mientras que los phyla restantes contribuyeron con menos del 1% de las secuencias (**Fig. 17**). Para comprobar la relación simbiótica entre esta esponja y las diferentes bacterias que posee, los autores también realizaron un análisis de fosfolípidos derivados de ácidos grasos. A partir de los resultados de tal análisis concluyeron que esta simbiosis es de tipo mutualista, ya que la esponja aprovecha en forma de nutrientes los productos derivados de la fotosíntesis de las cianobacterias y estas, se benefician a su vez de la esponja refugiándose en su tejido.

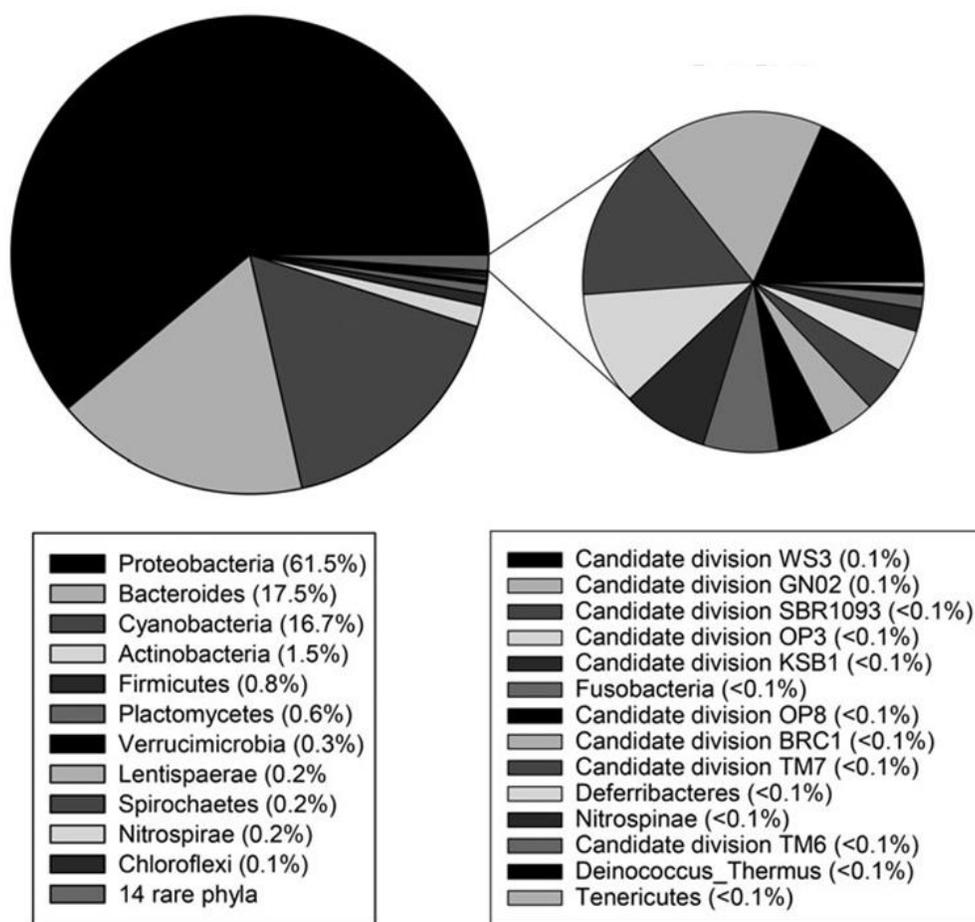
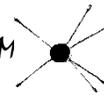
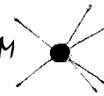


Figura 17. Abundancia relativa (% de todas las secuencias) de phyla bacterianos dentro de *Leucetta prolifera*. Los phyla están enlistados en orden de mayor a menor. (Tomado de Fromont *et al.* 2015)

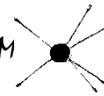


En el presente trabajo, para llevar a cabo la secuenciación de las distintas muestras (agua, larvas y adultos *Thoosa mismalolli*), se utilizó el secuenciador Ion Torrent Personal Genomic Machine (PGM) (Life Technologies).



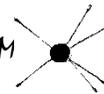
VII.3 HIPÓTESIS

La comunidad bacteriana contenida en las larvas y adultos de *Thoosa mismalolli* es la misma porque existe una transmisión vertical de bacterias con facultades simbióticas en esta especie de esponja.



VII.4 OBJETIVOS

- 1- Describir la comunidad bacteriana presente en los distintos estadios de las larvas de *Thoosa mismalolli* (dentro del adulto y planctónica), la contenida en las esponjas adultos de la misma especie y la que está en el medio circundante (ambiente) donde están las larvas y los adultos.
- 2- Comparar la comunidad bacteriana presente en los estadios de las larvas de *Thoosa mismalolli*, la contenida en las esponjas adultos de la misma especie y la que está en el medio circundante donde están las larvas y los adultos.



VII.5 MATERIAL Y MÉTODOS

VII.5.1 Metagenómica de las esponjas *Thoosa*

VII.5.1.1 Recolección de esponjas

Para recolectar las esponjas adultas de *Thoosa mismalolli*, primero se obtuvieron estructuras de coral de la zona núcleo Bahía Tiburoneros (ZNBT), las cuales contenían las esponjas. Enseguida, el coral se trasladaba (con agua de mar) hacia el laboratorio de campo donde se extraían las esponjas, se identificaban a nivel especie y se conservaban en alcohol al 100%. La recolección de larvas en desarrollo se hizo mediante la disección a esponjas adultos previamente extraídas y conservadas en alcohol. Las larvas planctónicas de la zona núcleo (BT) se recolectaron con una manga de plancton de 22 cm de diámetro de boca y una luz de malla de 80 μm , mediante arrastres entre 1 y 2 m de profundidad. Las larvas recolectadas se conservaron en alcohol al 100% para conservar el ADN, el cual se extrajo posteriormente.

Adultos de *T. mismalolli* y larvas en desarrollo (dentro del adulto) y del plancton se recolectaron simultáneamente con muestras de agua en noviembre de 2015. La recolecta se hizo de esta manera con el objetivo de comparar las distintas comunidades bacterianas entre las diferentes muestras en un mismo tiempo y así determinar de dónde las larvas obtienen las bacterias (transmisión vertical y/o medio circundante).

VII.5.1.2 Extracción de ADN

Para extraer el ADN total (de las esponjas mismas y de las bacterias contenidas en el cuerpo de la esponja), primero se probaron distintos métodos de extracción en algunas esponjas adultos y larvas obtenidas antes del muestreo de noviembre de 2015. Se aplicaron dos métodos caseros de extracción (buffer CTAB y precipitación de cloruro de sodio saturado) y uno utilizando Kit de extracción (DNeasy Blood and Tissue Kit 50 Cat. No. 69504) (**Anexo 2**). Con los caseros no se alcanzó a obtener ADN, mientras que con el Kit se obtuvo cierta cantidad de ADN, variando esta con las distintas muestras. La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó mediante un análisis espectrofotométrico usando un DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc.) y una electroforesis en gel de agarosa al 2% para observar si este método de extracción era viable. Como lo fue, a algunas muestras (una esponja adulto y una larva de *Thoosa mismalolli*) se amplificó (PCR) el gen ARNr 16S mediante el uso de dos BARCODES Forward (45 y 89) y un Reverse (53), se purificó, se



mandó a secuenciar para después mediante el uso programas informáticos, ver si las muestras contenían bacterias y, en caso de así fuera, seguir el mismo método de extracción de ADN, amplificación, purificación, secuenciación y manejo de datos en ordenador. Como en esta prueba, se encontró que efectivamente hay diferentes bacterias en esponjas *Thoosa*, se siguieron los mismos métodos desde la extracción hasta la secuenciación y posterior manejo de datos en computadora (análisis bioinformático) para las muestras de esponjas (adultos, larvas en desarrollo y planctónicas de *T. mismalolli*) obtenidas en el muestreo de noviembre de 2015 y de esta manera lograr determinar las diferentes bacterias que existen en las esponjas *T. mismalolli*. Estos métodos utilizados se encuentran a continuación:

VII.5.1.3 Amplificación de ADN (PCR)

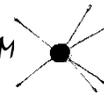
Del ADN extraído de las distintas muestras (esponjas adultos y larvas de *T. mismalolli*) se amplificó la región de 253 pares de base (pb) correspondiente a la región V3 del gen ARNr 16S presente en bacterias y del que se basa la identificación de estos microorganismos. Para lograr esto, se usaron distintos BARCODES para cada muestra, los cuales cortan esta región específica del gen ARNr 16S (**Anexo 3**).

La reacción de PCR con los distintos BARCODES fue llevada a cabo en un volumen total de 11.5 μL por muestra (mezcla maestra o master mix) a la cual se le agrega el ADN (1 μL) previamente extraído de la muestra. Cuando se hizo PCR, cada muestra se puso con tres réplicas con fin de obtener una buena cantidad de ADN a la hora de purificarlo y posteriormente secuenciar.

Los reactivos que se requieren para elaborar PCR con los distintos BARCODES que cortan el gen ARNr 16S (por cada muestra) están en la siguiente tabla.

Tabla 7. Protocolo de preparación de la mezcla maestra para amplificar el gen ARNr 16S mediante PCR.

Reactivo	Cantidad (μL)
H ₂ O DEPC	7.23
MgCl ₂ 2.0 mM	0.75
dNTP's 200 μM	0.66
Buffer 5X	2.5
Primer BARCODE F 800 nM	0.13
Primer BARCODE R 800 nM	0.13
Taq Promega polimerasa 0.625 unidades	0.1
Total	11.5



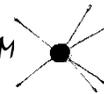
Para la reacción de PCR en termociclador se usaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos que consisten en desnaturalización (94 °C por 1 minuto), alineación (56 °C por 1 minuto) y extensión (72 °C por 1 minuto), y un paso final de extensión de 72 °C por 5 minutos.

Cada vez que se realizaba PCR con los BARCODES, el producto de PCR de las muestras al igual que las réplicas se ponía en una electroforesis en gel de agarosa al 2% para ver si la amplificación fue correcta. Si la PCR era inviable, se realizaba la PCR de nuevo con el mismo primer BARCODE hasta que resultara de manera indicada. Si la PCR era viable, el producto de una muestra se reamplificaba por triplicado con el mismo BARCODE previamente utilizado para la muestra original con el fin de obtener una mejor cantidad de ADN. Si la reamplificación también era viable, los productos amplificados y reamplificados de la muestra con el mismo primer BARCODE se agregaban en tubos contenedores (1 por muestra) para enseguida ponerlas en un gel de electroforesis y hacer la purificación de ADN cortando la parte del gel (**Anexo 4**) donde estaba los pares de base (253 pb) correspondientes a la región V3 del gen ARNr 16S que se mandaba a secuenciar.

VII.5.2 Metagenómica del hábitat (agua) donde se encuentran las esponjas *Thoosa*

VII.5.2.1 Recolección de muestras de agua y procesamiento para extraer el ADN bacteriano

Se recolectaron muestras de agua donde se encuentran tanto los organismos adultos como las larvas planctónicas. Para recolectar estas muestras y ver su viabilidad en la extracción del ADN bacteriano, primero se hizo una revisión bibliográfica (Rivera *et al.* 2003; Jiménez-Taracido 2009) para analizar los distintos métodos de recolecta de agua y extracción de ADN bacteriano y definir cual nos resultaría más conveniente para nuestro trabajo. Ninguno de ellos fue satisfactorio para nuestros requerimientos porque en uno se necesita congelar totalmente la muestra a -80 °C (Jiménez-Taracido 2009) antes de procesarla y extraer el ADN. Mientras que en otro se requiere filtrar el agua recolectada y pasar el filtro por una serie de reactivos (Rivera *et al.* 2003) que no estaban a nuestra disposición.



Dado esto, para el presente trabajo se implementó un método de recolección de muestras de agua y procesado *in situ* que después permitiera extraer adecuadamente el ADN bacteriano. Este método consistió en:

- 1- Recolectar muestras de agua en el hábitat donde se encuentran los organismos adultos de *Thoosa mismalolli* y las larvas planctónicas. Para recolectar el agua en el hábitat (coral) de los adultos, se utilizaron 3 jeringas de 30 ml (por muestra) nuevas y estériles con las cuales se obtuvo el agua que estaba muy cerca del coral (se extrajo el agua adyacente a 2 colonias de coral donde habitan las esponjas *T. mismalolli* adulto). Para la recolección del agua del hábitat donde se encuentran las larvas planctónicas (agua de ZN BT), se usó un frasco de un litro nuevo y estéril por muestra (se extrajo un litro de agua superficial y un litro de agua a 1.5 m de profundidad).
- 2- Las jeringas y los frascos utilizados para recolectar las muestras se mantuvieron en hielo (para disminuir la actividad bacteriana) por menos de una hora mientras se llegaba al lugar de procesamiento de las muestras (laboratorio de campo).
- 3- El procesamiento dio inicio con el filtrado (por separado) de cada muestra de agua usando bomba de vacío con un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm .
- 4- El filtro de nitrocelulosa usado por cada muestra de agua filtrada, se colocó dentro de un tubo Falcon de 15 ml nuevo y estéril. Enseguida, al tubo se le agregó alcohol etílico al 96% hasta cubrir el filtro y conservar de esta manera la muestra para cuando se requiriera extraer el ADN.

Previo a la extracción del ADN, en el laboratorio, al tubo Falcon (con filtro y alcohol dentro) se le colocó en un vortex por 5 minutos con la finalidad de separar la muestra filtrada contenida en el filtro. Enseguida, se quitó el filtro del tubo con una pinza estéril, se esperó a que sedimentara el material del tubo, se homogenizó y se repartió la muestra en volúmenes equitativos usando tubos eppendorf de 1.5 ml (2-3 según la muestra). Después, se colocó un tubo eppendorf por cada muestra en una centrifuga a 13,000 rpm por 5 minutos con la finalidad de que sedimentara el material requerido para el presente estudio (pellet con bacterias). Posteriormente, se retiró el alcohol de los tubos eppendorf, quedando sólo el pellet para dar comienzo la extracción de ADN.



VII.5.2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de estas muestras de agua, se probó primeramente un método casero usado previamente y que no funcionó para extraer el ADN de los adultos y larvas de *Thoosa*. Pero, al ver la cantidad y calidad de ADN de las muestras de agua extraído por este método por medio de análisis espectrofotométrico usando un DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc.) y por una electroforesis en gel de agarosa al 2%, resultó que este método casero fue viable para extraer el ADN de las muestras de agua. Por lo tanto, se usó el método casero para extraer el ADN bacteriano de las muestras de agua (**Anexo 2**).

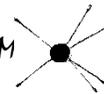
Después de haber obtenido las distintas muestras de agua y habérsele extraído el ADN bacteriano contenido con el método casero, los siguientes procesos (amplificación de la región V3 del gen ARNr 16S y purificación) que llevaron a la secuenciación y posterior manejo de datos para finalmente determinar las diferentes bacterias existentes en las muestras de agua, se siguieron de la misma manera como en el procesamiento de las muestras de esponjas.

VII.5.3 Secuenciación

Previo a la secuenciación, se llevaron a cabo una serie de procedimientos (**Anexo 5**).

Para realizar la secuenciación, se utilizó el secuenciador masivo de Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies, USA) y un chip 316 que tiene un rendimiento de 300-600 Mb de datos de secuencias en una corrida de 4 horas con una capacidad de lectura de 2-3 millones secuencias por corrida. El intervalo con el que trabaja el secuenciador es de 230-260 pb. En el presente trabajo, el tamaño del amplicón fue de 253 pb. Por tanto, la utilización de este aparato resultó ser viable para los objetivos de este estudio.

En la secuenciación, las lecturas realizadas por el secuenciador se transfirieron automáticamente al servidor Torrent (Life Technologies), donde las señales iónicas de los cambios de pH se convirtieron en las bases nitrogenadas y se almacenaron en archivos estándar FASTQ. El formato FASTQ es un archivo en formato texto compuesto por la descripción de la secuencia en una sola línea (FASTA) usando símbolos IUPAC y la calidad de cada base de cada secuencia (Q de Quality score). Después de obtener el archivo FASTQ producto de la secuenciación, se realizó un análisis bioinformático para finalmente



poder analizar la diversidad de bacterias presentes en las distintas muestras de esponjas y de agua recolectadas.

VII.5.4 Reporte de secuencias del secuenciador Ion Torrent

Se secuenció un total de 8 muestras de las cuales 4 fueron derivadas de esponjas adultos y larvas (52,055 lecturas) y las otras 4 de agua (52,005 lecturas). Por lo tanto, se obtuvo un total de 104,060 lecturas, con un promedio de longitud de lectura de 253 pb, valor que cae dentro de lo esperado para la región V3 (<400 pb). Cada uno de los archivos en formato FASTQ resultado de la secuenciación fue compactado en un sólo archivo con la misma extensión para su posterior análisis bioinformático.

VII.5.5 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó mediante programas asociados al sistema operativo MGLinux versión 1.4.1, el cual se encuentra instalado dentro del programa de virtualización Oracle VM VirtualBox.

Los archivos en formato FASTQ, los cuales fueron proporcionados a partir de la secuenciación, se unieron en un sólo archivo para luego limpiar y eliminar todas las secuencias del 18S ribosomal de eucariontes y 16S de mitocondrias y cloroplastos que fueron amplificadas.

Una vez limpiadas y cortadas las secuencias se procedió a analizarlas por medio de QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) empleando un total de 104,060 secuencias (52,055 de esponjas y 52,005 de agua). El análisis por medio de QIIME fue realizado con la finalidad de conocer los OTUs o unidades taxonómicas operacionales (este término se aplica para identificar objetos de estudio que pueden ser especies, géneros, o bien, cualquier otra categoría taxonómica), así como también, archivos xls que representan la abundancia de las mismas para cada una de las clasificaciones taxonómicas (Dominio-Especie).



Tabla 8. Listado de secuencias totales y secuencias limpias y cortadas de las muestras de esponjas y agua.

Nombre muestra	Código muestra	Secuencias totales	Secuencias limpias y cortadas
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> obtenida de adulto	BTLA1TM	4096	3841
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> planctónica	BTLP1TM	18601	17147
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> con larva	BTAB1TM	17791	16666
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> sin larva	BTAB3TM	15185	14428
Agua superficial	BTWB3NA	19062	17213
Agua a 1.5m de profundidad	BTWB2NA	9132	8473
Agua adyacente a coral 1	BTWC1NA	10353	8900
Agua adyacente a coral 2	BTWC2NA	19733	17419

Además, el análisis por QIIME generó las curvas de rarefacción o de cobertura a partir de las secuencias obtenidas y de los OTUs. Estas curvas sirven para determinar de forma gráfica si el esfuerzo de muestreo supone una fracción significativa de la diversidad, es decir, si el número de secuencias obtenidas es representativo de la muestra natural.

Al observar la curva de rarefacción (**Fig. 18**) de las muestras (esponjas y agua) del presente estudio, se notó que hubo variación en las curvas entre las muestras. Las muestras que presentaron mayor número de secuencias (**Tabla 8**) tuvieron mejor ajuste en la gráfica (**Fig. 18**). En cambio, las muestras en las cuales fue menor el número de secuencias (**Tabla 8**) mostraron menos ajuste en la gráfica (figura curva de rarefacción).

A pesar de estas variaciones en las curvas, el número de secuencias obtenidas tanto para las muestras de esponja como para las muestras de agua, fueron representativas de la muestra natural, es decir, hubo una fracción significativa de la diversidad.

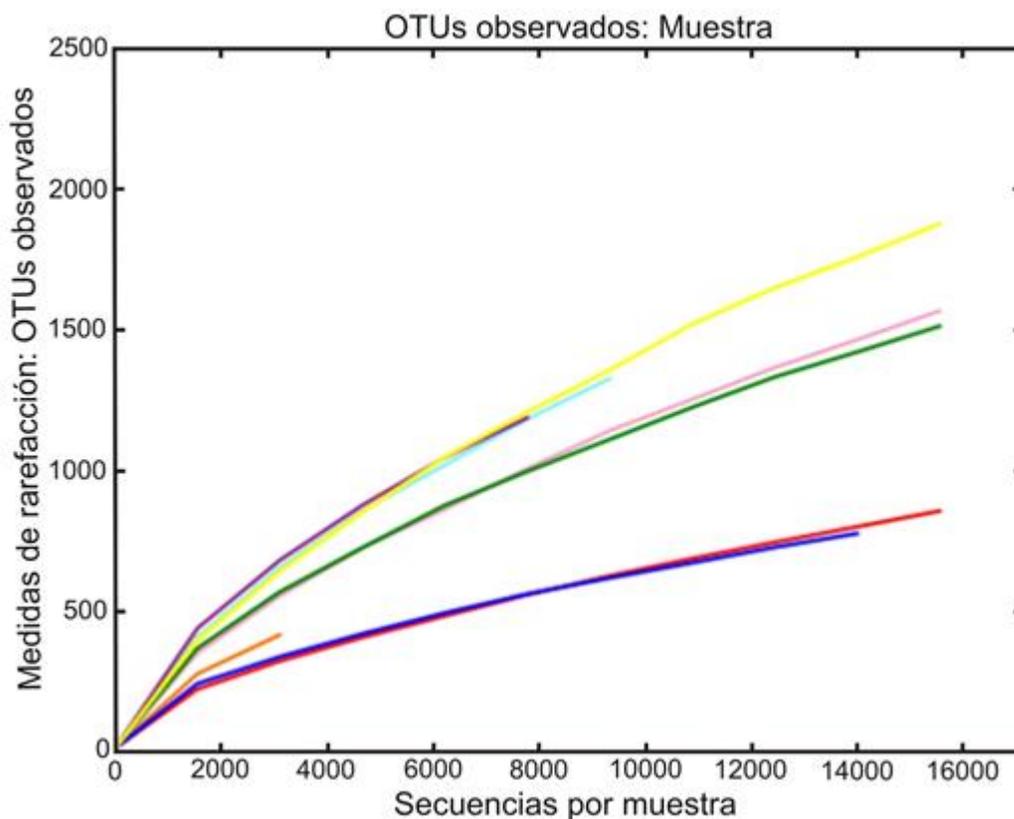
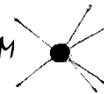


Figura 18. Curva de rarefacción de esponjas *T. mismalolli* y agua. En el eje X se muestra el esfuerzo de muestreo efectuado (número de secuencias por muestra). El eje Y representa el número de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) observadas. **Líneas:** roja, esponja adulto con larva; azul marino, esponja adulto sin larva; naranja, esponja larva obtenida de adulto; verde, esponja larva planctónica; morado, agua a 1.5m de profundidad; amarillo, agua superficial; verde azulado claro, agua adyacente a coral 1; rosa, agua adyacente a coral 2.

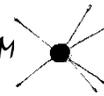


VII.5.6 Análisis de los archivos xls generado por QIIME

Se hizo un análisis de los archivos xls generados por QIIME. A partir de ellos, se generó la gráfica de los phyla bacterianos contenidos tanto en las muestras de esponja, así como las de agua del presente trabajo. Además, a partir del mismo análisis, se tomó en cuenta las clases, órdenes, familias, géneros y especie (las que se lograron obtener) más representativas de los phyla en cuestión con la finalidad de lograr una mejor profundidad a la hora de determinar y comparar las posibles funciones de estos microorganismos tanto en las esponjas como en el medio donde habitan estas.

VII.5.7 Análisis estadístico

Para conocer si existen diferencias significativas en la comunidad bacteriana (phyla y abundancia de estos) entre las muestras de larvas de *T. mismalolli* en sus diferentes estadios, esponjas adultos de la misma especie, así como del medio circundante donde están tanto las larvas como los adultos, se utilizó el programa STAMP 2.1.3 (Statistical Analysis of Metagenomic Profile), el cual realizó la prueba de normalidad y de homogeneidad de varianza a la tabla de OTUs (unidades taxonómicas operacionales que resultó del análisis bioinformático por medio de QIIME a partir de los archivos FASTQ proporcionados a partir de la secuenciación) de acuerdo a su clasificación taxonómica con un nivel de significancia del 95% de confianza.



VII.6 RESULTADOS

El resultado de la secuenciación de ADN bacteriano contenido en larvas de *Thoosa mismalolli* en distintos estadios de desarrollo (obtenida de organismos adultos y de arrastres de plancton), adultos de la misma especie y muestras del medio circundante donde están las larvas y los adultos recolectadas, mostró la presencia de 48 phyla (2 de ellos no clasificados). De ellos, para describir la comunidad bacteriana entre las muestras, se consideraron los phyla que por lo menos tuvieran el 1% de las secuencias en alguna de las muestras, los cuales sumaron 14 phyla del total (48 phyla) y representaron más del 99% de la abundancia bacteriana (**Fig. 19**).

En general, los phyla bacterianos más abundantes en las muestras de acuerdo a las secuencias fueron Proteobacteria (19.3-74.7%), Chloroflexi (0.3-58.9%) y Cianobacteria (0.04-28.4%) (**Fig. 19**). **(El nombre de los phyla que contribuyeron con menos del 1% de las secuencias de las muestras están representados en el anexo 6)**

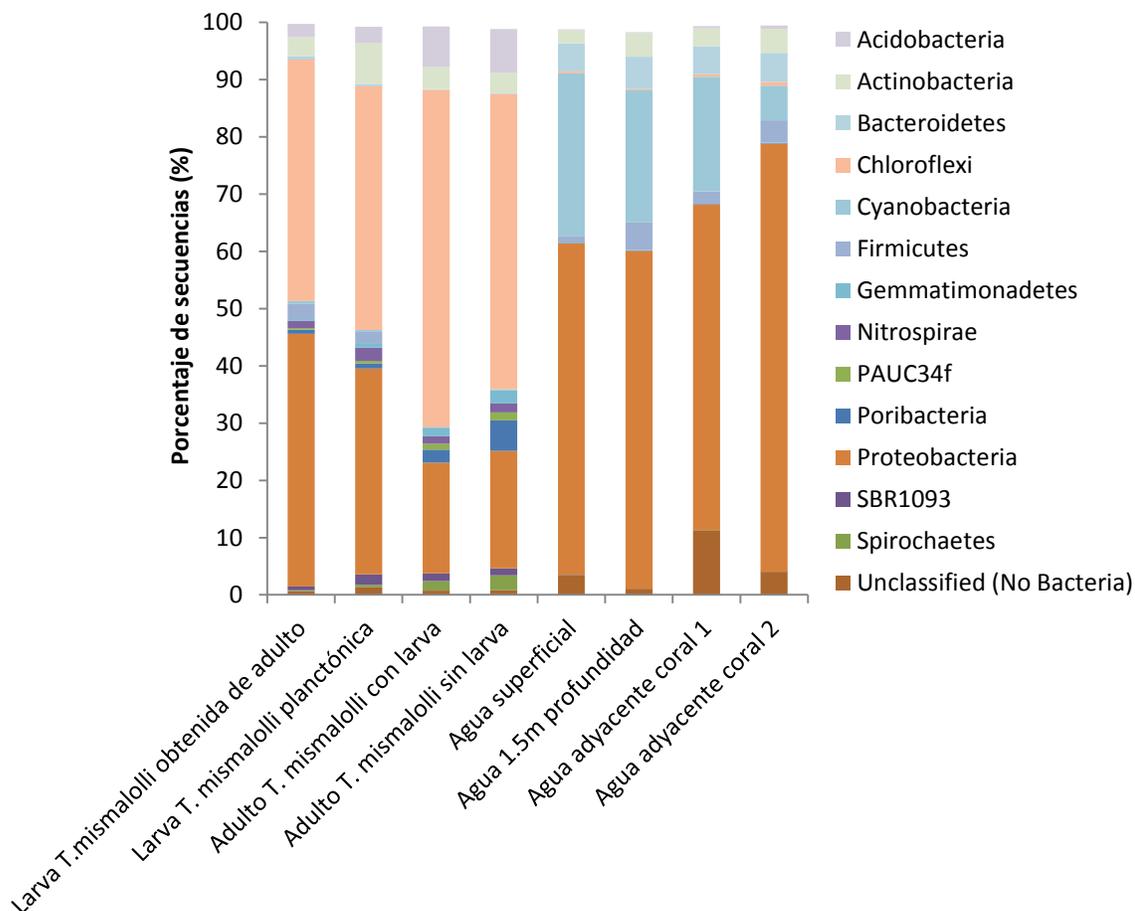


Figura 19. Abundancia relativa (99% de las secuencias) de phyla bacterianos dentro de las larvas de *Thoosa mismalolli* en distintos estadios de desarrollo (*T. mismalolli* obtenida de adulto y planctónica), adultos de la misma especie (*T. mismalolli* con y sin larva) y muestras del medio circundante donde están las larvas y adultos (agua superficial, 1.5m profundidad, adyacente coral 1 y 2).

VII.6.1 Muestras de esponja

En las muestras de esponja *Thoosa mismalolli* (larva obtenida de adulto, larva planctónica, adulto que contenía larvas en desarrollo, adulto sin larvas) los phyla predominantes fueron Chloroflexi (42.1-58.9%), Proteobacteria (19.3-36.0%), Acidobacteria (2.3-7.6%) y Actinobacteria (3.3-7.1%). Del 99% de las secuencias resultantes de la larva obtenida de adulto, los phyla Proteobacteria (44.1%), Chloroflexi (42.1%), Actinobacteria (3.3%), Firmicutes (2.6%), Acidobacteria (2.3%) y Nitrospirae (1.3%) representaron el 95.7% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los ocho phyla restantes constituyeron entre 0.2 y 0.7% de las secuencias (**Fig. 19**).



De las secuencias de la larva planctónica de *T. mismalolli*, los phyla Chloroflexi (42.5%), Proteobacteria (36%), Actinobacteria (7.1%), Acidobacteria (2.9%), Nitrospirae (2.3%), Firmicutes (1.9%), SBR1093 (1.8%) y organismos no clasificados (no bacterianos) (1.3%) mostraron el 95.9% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los seis phyla restantes constituyeron entre 0.3 y 0.9% de las secuencias (**Fig. 19**).

De las secuencias de *T. mismalolli* adulto, del cual se obtuvo la larva, los phyla Chloroflexi (58.9%), Proteobacteria (19.3%), Acidobacteria (7.1%), Actinobacteria (3.8%), Poribacteria (2.3%), Spirochaetes (1.6%), Gemmatimonadetes (1.5%), SBR1093 (1.3%), Nitrospirae (1.3%) y PAUC34f (1.0%) sumaron el 98.3% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los cuatro phyla restantes constituyeron entre 0.07 y 0.8% de las secuencias (**Fig. 19**).

De las secuencias del adulto de *T. mismalolli* que no contenía larvas en su interior, los phyla Chloroflexi (51.6%), Proteobacteria (20.5%), Acidobacteria (7.6%), Poribacteria (5.3%), Actinobacteria (3.6%), Spirochaetes (2.6%), Gemmatimonadetes (2.3%), Nitrospirae (1.5%), PAUC34f (1.4%) y SBR1093 (1.2%) significaron el 97.7% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los cuatro phyla restantes constituyeron entre 0.08 y 0.8% de las secuencias (**Fig. 19**).

VII.6.2 Muestras de agua

En las muestras del medio circundante donde se encontraron las larvas y adultos de la esponja *T. mismalolli* (agua superficial, agua a 1.5 m de profundidad, agua adyacente a coral) los phyla más abundantes fueron Proteobacteria (56.8-74.7%), Cianobacteria (6.1-28.4%) y Bacteroidetes (4.9-5.7%). Del 99% de las secuencias resultantes del agua de mar superficial donde se encontraron larvas planctónicas, los phyla Proteobacteria (57.9%), Cyanobacteria (28.4%), Bacteroidetes (4.9%), organismos no clasificados (no bacterianos) (3.5%), Actinobacteria (2.2%) y Firmicutes (1.2%) sumaron el 98.1% (**Fig. 19**), mientras que cada uno de los ocho phyla restantes constituyeron entre 0.0 y 0.3% de las secuencias (**Fig. 19**).

De las secuencias correspondientes a las muestra de agua a 1.5 m de profundidad donde también se recolectaron estas larvas, los phyla Proteobacteria (59%), Cianobacteria (23%), Bacteroidetes (5.7%), Firmicutes (4.8%), Actinobacteria (4%) y organismos no clasificados



(no bacterianos) (1%) completaron el 97.7% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los ocho phyla restantes constituyeron entre 0.0 y 0.3% de las secuencias (**Fig. 19**).

De las secuencias correspondientes al agua adyacente a coral 1 donde se encuentran estas esponjas excavadoras, los phyla Proteobacteria (56.8%), Cianobacteria (20%), organismos no clasificados (no bacterianos) (11.3%), Bacteroidetes (4.9%), Actinobacteria (3.1%) Firmicutes (2.1%) acumularon el 98.3% (**Fig. 19**). Mientras que cada uno de los ocho phyla restantes constituyeron entre 0.0 y 0.4% de las secuencias (**Fig. 19**).

De las secuencias del agua adyacente a coral 2, los phyla Proteobacteria (74.7%), Cianobacteria (6.1%), Bacteroidetes (5%), Actinobacteria (4.2%), organismos no clasificados (no bacterianos) (4%) y Firmicutes (3.9%) reunieron el 98% (**Fig. 19**), mientras que cada uno de los ocho phyla restantes constituyeron entre 0.0 y 0.6% de las secuencias (**Fig. 19**).

VII.6.3 Análisis estadístico

Se utilizó el software STAMP 2.1.3 (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) para comparar y ver la cercanía que existe en la comunidad bacteriana (phyla y abundancia de estos) entre las distintas muestras. Para ello, de las opciones que presenta este programa, se optó por un análisis de componentes principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés), ya que este tipo de análisis toma un extenso conjunto de variables correlacionadas y las transforma en un conjunto reducido de nuevas variables para explicar, de este modo, la variación que existe entre los datos.

A partir de este análisis se pudo observar que las muestras del presente trabajo están agrupadas en 4 conjuntos. El primero (cuadrante 1), está conformado de las muestras de agua superficial, agua a 1.5 m de profundidad y agua adyacente al coral 1. El segundo (cuadrante 2), está compuesto de las esponjas adultos *T. mismalolli* (con y sin larva). El tercero (cuadrante 3), lo conforma las larvas de la misma especie (obtenida de adulto y del plancton). Mientras que el cuarto (cuadrante 4), sólo está compuesto por el agua adyacente al coral 2 (**Fig. 20**).

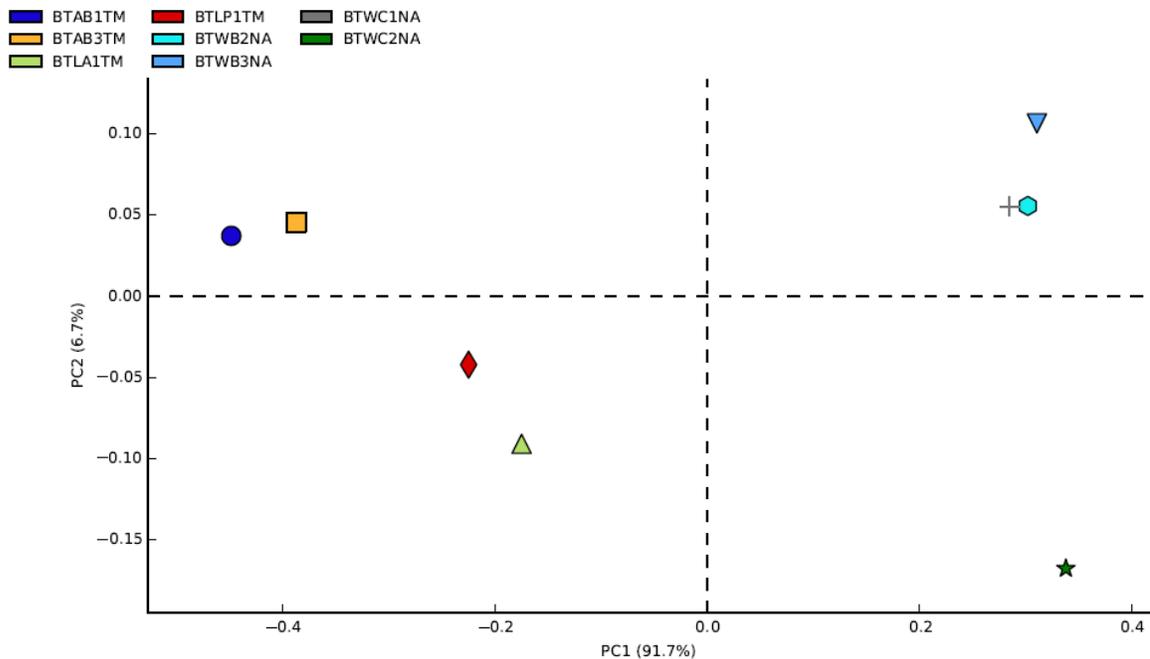
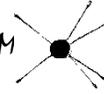


Figura 20. Distribución de la comunidad microbiana en las muestras de agua y esponjas en el análisis de componentes principales (ACP) de acuerdo a la presencia de phyla y su abundancia dentro de la muestra. **Marcas:** círculo azul rey, esponja adulto con larva; cuadro naranja, esponja adulto sin larva; rombo rojo, esponja larva planctónica; triángulo boca arriba verde claro, esponja larva obtenida de adulto; cruz gris, agua adyacente al coral 1; hexágono verde azulado, agua a 1.5m de profundidad; triángulo boca abajo azul cielo, agua superficial; estrella verde oscuro, agua adyacente al coral 2.



VII.7 DISCUSIÓN

VII.7.1 Bacterias asociadas

Recientemente, los estudios de biología molecular referentes a bacteria han tenido mayor relevancia a comparación de otros métodos (microscopía y cultivo), ya que estos permiten detectar e identificar más del 99% de la diversidad bacteriana contenida en distintas muestras (biológicas y no biológicas).

La identificación de bacterias por medio de biología molecular en esponjas se ha realizado en diferentes especies. Por ejemplo, en la esponja *Rhopaloeides odorabile* se describió que hay distintos grupos de bacterias, siendo las más abundantes Gamma-Proteobacteria (41%) y Actinobacteria (30%) (Webster *et al.* 2001).

En la esponja calcárea *Leucetta prolifera* los phyla más abundantes fueron Proteobacteria (61.5%), Bacteroidetes (17.5%), Cianobacteria (16.7%) y Actinobacteria (1.5%) (Fromont *et al.* 2015).

Dupont *et al.* 2013 caracterizaron la comunidad microbiana de la esponja carnívora *Asbestopluma hipogea* (familia Cladorhizidae) y compararon la diversidad de bacterias asociadas a esta especie con el agua circundante donde se encontró. Encontraron que más del 95% de las lecturas tanto de las muestras de esponja como la muestra de agua fueron representadas por los phyla Proteobacteria (82% y 81%) y Bacteroidetes (16% y 14%). También compartieron los phyla Acidobacteria, Actinobacteria, Cianobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae y Planctomicetes. En la esponja no aparecieron los phyla Clamydiate, Defferibacteres, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Nitrospirae, Thermodesulfobacteria, Verrumicrobia y el candidate division TM6. Mientras que en el agua no se encontraron los phyla Fibrobacteres, Spirochaetes, Synergistetes y candidate divisions TM7 y OP3.

En el presente estudio, en la esponja excavadora *Thoosa mismalolli* (adultos y larvas) y en el medio circundante (agua) donde se encontraron estas esponjas se encontró un total de 48 phyla, siendo los más abundantes Proteobacteria (19.3-74.7%), Chloroflexi (0.3-58.9%) y Cianobacteria (0.04-28.4%), los cuales representaron más del 99% de la abundancia de todas las bacterias. En las esponjas, los phyla más dominantes fueron Chloroflexi (42.1-58.9%), Proteobacteria (19.3-36.0%), Acidobacteria (2.3-7.6%) y Actinobacteria (3.3-



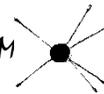
7.1%). Mientras que en el agua circundante los phyla Proteobacteria (56.8-74.7%), Cianobacteria (6.1-28.4%) y Bacteroidetes (4.9-5.7%) fueron más representativos.

Al analizar los resultados arrojados por el análisis de componentes principales (ACP) de las muestras tanto de agua como de las esponjas adultos y larvas, es evidente que debido a la cercanía y lejanía presentada entre las distintas muestras en la gráfica (**Fig. 20**), existen semejanzas y diferencias en los phyla bacterianos entre las muestras, así como en la abundancia de estos.

El componente uno ubicado en la zona izquierda de la gráfica, separa las muestras de esponja (adultos y larvas) de las muestras de agua, las cuales se encuentran en la zona derecha (componente dos) de dicha gráfica (**Fig. 20**). Esta distancia entre las muestras de esponja y de agua se debe a que algunos phyla tienen mayor predominancia en un tipo de muestra con respecto al otro. Los phyla Choloroflexi, Acidobacteria Nitrospirae, Poribacteria, SBR1093 y Spirochaetes predominan en la esponja. Mientras que Cianobacteria, Proteobacteria y Bacteroidetes prevalecen en el agua.

Referente al componente dos, tres de las 4 muestras de agua fueron cercanas (agua superficial, a 1.5m de profundidad y adyacente a coral 1), de las cuales dos (1.5m y adyacente a coral 1) tuvieron la mayor proximidad en todo el análisis gráfico. En cambio, la cuarta muestra de agua (agua adyacente a coral 2) mostró ser la más lejana entre el análisis de las muestras. La proximidad entre las tres primeras muestras de agua se debió a la similitud de los phyla encontrados y abundancia que presentaron estos (Proteobacteria y Cianobacteria principalmente). La mayor cercanía entre las dos muestras fue, porque además de la similitud de Proteobacteria y Cianobacteria, la abundancia de los phyla Actinobacteria, Cianobacteria y Firmicutes también fue muy similar. En cambio, la notable lejanía de la cuarta muestra de agua fue a causa de que la abundancia de los phyla Cianobacteria y Proteobacteria fue significativamente menor y mayor, respectivamente, con relación a las otras muestras de agua.

En cuanto a las muestras de esponja que pertenecen al componente uno de la gráfica, las muestras de esponja adulto con y sin larva tienen más cercanía en comparación con las muestras de larva obtenida de adulto y planctónica. La cercanía entre las muestras de esponja adulto se debe a que los phyla contenidos en tales muestras son los mismos y, además, prácticamente se encuentran en la misma abundancia, salvo Chloroflexi donde su



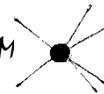
abundancia es mayor en el adulto con larva. En las muestras de larvas de esponja, aunque los phyla y abundancia de estos también son muy similares, la lejanía es causa de que la abundancia del phylum Proteobacteria es mayor en la larva obtenida del adulto y, asimismo, la abundancia de Actinobacteria es mayor en la larva planctónica.

VII.7.2 Transmisión vertical y horizontal de bacterias

Una forma de comprobar si existe una posible asociación simbiótica entre las bacterias con su organismo hospedero, es determinando si hay transmisión vertical, es decir, si hay transferencia de bacterias de padres al embrión. La transmisión vertical ha sido indicada en diversos estudios de esponjas. Enticknap *et al.* (2006) sugirieron que existe una transmisión vertical de bacterias simbiotes entre el adulto y la larva de la esponja *Mycale laxissima*, ya que en ambas muestras estaban presentes los grupos Alphaproteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Cianobacteria, Actinomycetes (Actinobacteria) y Flexibacter.

El presente trabajo es el primero en describir y comparar la comunidad bacteriana en *Thoosa mismalolli* adultos y larvas en desarrollo y libres del plancton, así como en el medio donde se encuentran estas. Esto último permitió determinar de mejor manera que la transmisión vertical de bacterias es posible, ya que algunos phyla presentes en los adultos y larvas no se encontraron en las muestras ambientales donde se obtuvieron los organismos. En esta especie, fue evidente que algunos phylum como Chloroflexi se transmiten vía vertical de esponjas adulto a sus larvas, y deben continuar en estas incluso después de su asentamiento y completar su ciclo de vida. Por lo tanto, es posible que este phylum cumpla alguna función simbiótica en estas esponjas. Sin embargo, hay otros como Proteobacteria que están tanto en las esponjas adulto y larvas, así como en las muestras de agua donde se obtuvieron estos organismos, por lo que se sugiere, que la esponja *Thoosa mismalolli* a través de su sistema acuífero, adquiere por filtración a las bacterias del medio acuático donde se encuentra, es decir, hay una transmisión horizontal de bacterias. Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, es posible que haya una interacción predador-presa entre la esponja y este phylum bacteriano.

Esta interacción predador-presa se puede comprobar si se analizan el porcentaje de las secuencias de Proteobacteria que hay en los adultos y las larvas. En los adultos fue menor posiblemente a causa de que estaban siendo digeridas. Pero entre las larvas también hubo



diferencias (fue mayor en larva dentro del adulto que en la planctónica). Esto se puede deber a que la larva en desarrollo dentro del adulto, no necesita gastar energía porque el organismo parental le provee de ella. En cambio, en la larva planctónica, es posible que una parte de la energía que requiere para sobrevivir en este medio, la utilice digiriendo estas bacterias.

El actual entendimiento de las interacciones de las esponjas con los microorganismos está representado en un modelo de interacción esponja-bacteria (Hentschel *et al.* 2003 **Fig. 21**). Como el agua de mar es bombeada a través del sistema acuífero de la esponja, la mayoría de microorganismos se filtran y son absorbidos vía coanocitos dentro del mesohilo (mostrado como círculos en la figura). Mientras que algunas bacterias son inmediatamente digeridas por los arqueocitos, otras pueden persistir por largo tiempo. Además de esta clara resistencia, la bacteria puede tomar ventaja de este nicho. Otra fracción bacteriana (mostrada como triángulos en la figura 21) que no está en la columna de agua, puede ser pasada a la siguiente generación vía larva y gémula (transmisión vertical). Entonces, en este modelo la comunidad microbiana de la esponja estará compuesta de una mezcla de bacterias que son adquiridas de la columna de agua y las que han sido transmitidas a través de la vía estadios reproductivos (Hentschel *et al.* 2003).

Este modelo se aplica correctamente a las esponjas del presente trabajo, ya que el phylum Proteobacteria se presentó tanto en las esponjas adulto y larvas en desarrollo y planctónicas, así como en las muestras de agua donde se obtuvieron estos organismos. Además, la similitud en algunos phyla bacterianos presentes en los organismos adultos (*Chroloflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *SBR1093*) y larvas, mismos que estuvieron ausentes o en muy baja proporción en las muestras (agua) donde se encontraron las esponjas, es una clara indicación de que estas bacterias son heredadas (transmisión vertical) de los adultos a las larvas en desarrollo y permanecen en la larva durante su fase planctónica y, muy probablemente, después de asentarse.

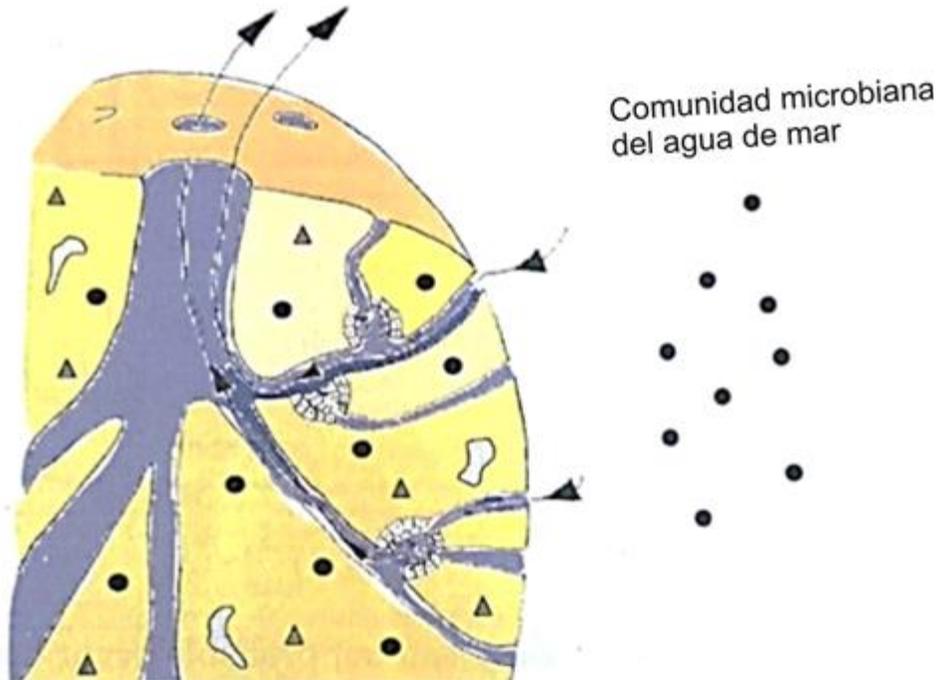
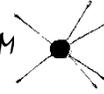


Figura 21. Modelo de interacción esponja-bacteria. Los círculos representan las bacterias que entran al mesohilo desde el agua de mar, donde algunas permanecen a través del tiempo. Los triángulos representan las bacterias que han sido transmitidas vía los estadios reproductivos y están ausentes en el agua de mar. (Tomado de Hentschel *et al.* 2003)

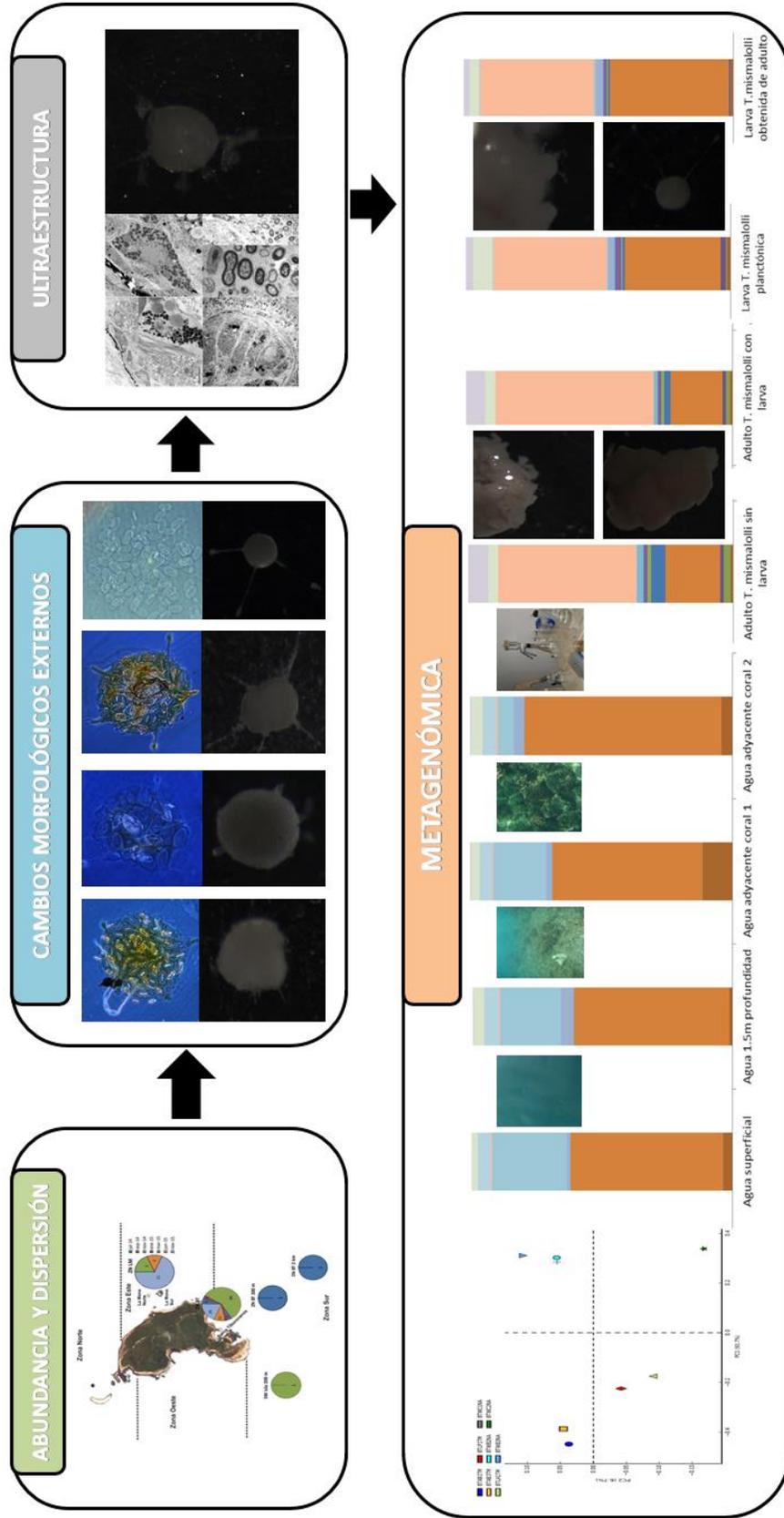


Figura 22. Esquema de la información generada en el presente trabajo.

VIII. CONCLUSIONES

Capítulo 1. Abundancia y dispersión larvaria

Abundancia

La mayor producción de larvas se detectó en los meses de noviembre de 2014 y 2015, lo que no coincide con lo esperado, ya que en estudios previos estas se presentaron comúnmente en los meses de verano. Se sugiere que esto se pudo deber al incremento inusual de la temperatura en verano (>31.5 °C) debido, primero al evento *The Blob* o La Mancha Cálida y posteriormente El Niño (julio 2015 a enero 2016) que retrasaron la producción o indujeron la regresión de los gametos.

Dispersión

El hecho de recolectar al menos una larva a 2 km de las zonas de reproducción, indica que la esta tiene una gran capacidad de dispersión.

El haberse encontrado esta larva a 2 km del área de estudio donde están los arrecifes, indica una supuesta gran capacidad de dispersión porque la larva es muy pequeña y no tiene capacidad de nado, solo de flotación por sus estilos que le proveen de esta facultad.

Capítulo 2. Cambios morfológicos y descripción ultraestructural

Cambios morfológicos externos

Las primeras estructuras silíceas que se forman en la larva son los discos monoaxónicos de la capa externa del cuerpo. Cuando la mayoría de los discos están formados, da comienzo la formación de los estilos en el centro del cuerpo, los cuales cambian su organización a lo largo del desarrollo.

Descripción ultraestructural

La larva en incubación dentro del adulto presenta partículas de glicógeno, gotas de lípidos y bacterias (libres y en proceso de degradación) que son utilizadas como fuente de energía durante su desarrollo ontogénico.

Aunque no se pudo estudiar las larvas libres a nivel ultraestructura, se sugiere que las partículas de glicógeno, gotas de lípidos y bacterias actúan de soporte energético durante la fase de vida planctónica.

Capítulo 3. Descripción metagenómica

Bacterias asociadas

Existen semejanzas y diferencias en los phyla bacterianos contenidos en las esponjas y hábitat donde se recolectaron estos organismos.

Los phyla Chloroflexi, Proteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria dominaron en larvas y esponjas adulto de *T. mismalolli* y los phyla Proteobacteria, Cianobacteria y Bacteroidetes prevalecieron en el agua donde se encuentran tales esponjas.

Transmisión vertical y horizontal de bacterias

Se comprobó la existencia de transmisión vertical de bacterias desde adultos hacia las larvas. El caso concreto del phylum Chloroflexi, es indicativo de que hay una asociación tipo simbiosis entre la esponja y la bacteria.

Se comprobó la existencia de transmisión horizontal de bacterias en *T. mismalolli*. Esto implica la existencia de una relación predador-presa entre las esponjas y las bacterias (esponjas fagocitan a las bacterias que atraen del medio), misma que se demostró al observar vacuolas digiriendo a estos microorganismos (fagocitosis) en la larva de esponja de *Thoosa mismalolli*.

El modelo de interacción esponja-bacteria de Hentschel *et al.* (2003) se aplicó perfectamente en el presente trabajo, ya que se encontraron bacterias (Chloroflexi, Acidobacteria, Nitrospirae, SBR1093) únicamente en las esponjas adultos y larvas (transmisión vertical). Asimismo, se encontraron otras (Proteobacteria) en las esponjas adultos y larvas, al igual que en las muestras de agua donde habitan estas (transmisión horizontal).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Wahab M. A., De Nys R., Webster N., Whalan S. (2014) Phenology of sexual reproduction in the common coral reef sponge, *Carteriospongia foliascens*. *Coral Reefs*, **33**, 381-394.
- Amann R. L., Ludwig W., Schleifer K. H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59** (1), 143-169.
- Amano S., Hori I. (2001) Metamorphosis of coeloblastula performed by multipotential larval flagellated cells in the calcareous sponge *Leucosolenia laxa*. *Biological Bulletin*, **200**, 20-32.
- Amillano-Cisneros J. M. (2014) Descripción morfológica, distribución y abundancia espacio-temporal de larvas planctónicas de esponjas excavadoras del género *Thoosa* en la comunidad coralina de la isla Isabel, Nayarit. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa, México: 40 pp.
- Asa S., Yeemin T., Chaitanawisuti N., Kritsanapuntu A. (2000) Sexual reproduction of a marine sponge, *Petrosia* sp. from coral communities in the Gulf of Thailand. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*, **1**, 23-27.
- Bautista-Guerrero E. (2010) Biología reproductiva de esponjas excavadoras de corales hermatípicos del género *Pocillopora*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Mazatlán, Sinaloa, México: 121 pp.
- Bautista-Guerrero E., Carballo J. L., Maldonado M. (2010) Reproductive cycle of the coral-excavating sponge *Thoosa mismalolli* (Clionaidae) from Mexican Pacific coral reef. *Invertebrate Biology*, **129**, 285-296.
- Belmonte G., Miglietta A., Rubino F., Boero F. (1997) Morphological convergence of resting stages of planktonic organisms: a review. *Hydrobiologia*, **355**, 159-165.
- Bergquist P. R., Sinclair M. E. (1968) The morphology and behaviour of larvae of some intertidal sponges. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **2**, 426-437.

- Bergquist P. R., Sinclair M. E. (1973) Seasonal variation in settlement and spiculation of sponge larvae. *Marine Biology*, **20**, 35-44.
- Bond N. A., Cronin M. F., Freeland H., Mantua N. (2015) Causes and impacts of the 2014 warm anomaly in the NE Pacific. *Geophysical Research Letters*, **42**, 3414-3420.
- Borchiellini C., Alivon E., Vacelet J. (2004) The systematic position of *Alectona* (Porifera, Demospongiae): a Tetractinellid sponge. *Bolletín Museum Institut Biologie Universitéit Genova*, **68**, 209-217.
- Boury-Esnault N. (1977) A cell type in sponges involved in the metabolism of glycogen: the grey cells. *Cell and Tissue Research*, **175**, 523-539.
- Boury-Esnault N., Doumenc D. (1979) Glycogen storage and transfer in primitive invertebrates: Demospongia and Actiniaria. In C. Levi N. Boury-Esnault (Ed.), *Biologie des Spongiaires* (pp. 181-192). Colloques Internationaux du CNRS, Paris.
- Boury-Esnault N., Rützler K. (1997) Thesaurus of sponge morphology. Smithsonian Contributions Zoolpgy. Washington, D. C. 55 pp.
- Briggs J. C. (1974) Marine zoogeography. McGraw-Hill, New York. 461 pp.
- Carballo J. L., Cruz-Barraza J. A., Gómez P. (2004) Taxonomy and description of clionaid sponges (Hadromerida, Clionaidae) from the Pacific Ocean of Mexico. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **141**, 353-397.
- Carballo J. L., Cruz-Barraza J. A., Nava H., Bautista-Guerrero E. (2008) Esponjas perforadoras de sustratos calcáreos. Importancia en los ecosistemas arrecifales del Pacífico este. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. 183 pp.
- Chen K., Pachter L. (2005) Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *Plos Computational Biology*, **1** (2), 0106-0112.
- Climate Prediction Center, National Centers for Environmental Prediction, NOAA (2016) ENSO: Recent Evolution, Current Status and Predictions. www.cpc.ncep.noaa.gov
- CONABIO (2005) Caracterización y regionalización de los procesos oceanográficos de los mares mexicanos. http://www.conabio.gob.mx/gap/index.php/Procesos_oceanogr%C3%A1ficos
- Dupont S., Corre E., Li Y., Vacelet J., Bourguet-Kondracki M. L. (2013) First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. *Microbiology Ecology*, **86**, 520-531.

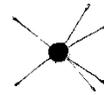
- Enticknap J. J., Michelle K. M., Peraud O., Hill R. T. (2006) Characterization of a culturable Alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (5), 3724–3732.
- Ereskovsky A. V. (2010) *The Comparative Embryology of Sponges*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 323 pp.
- Friedrich A. B., Fisher I., Proksch P., Hacker J., Hentschel U. (2001) Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiology Ecology*, **38**, 105-113.
- Friedrich A. B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., Hentschel U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernícola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*, **134**, 461-470.
- Fromont J., Huggett M. J., Lengger S. K., Grice K., Schönberg C. H. L. (2015) Characterization of *Leucetta prolifera*, a calcarean cyanosponge from south-western Australia, and its symbionts. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1–12.
- Garrone R. (1974) Ultrastructure d'une "gemmule armée" planctonique d'Eponge Clionidae. Inclusions fibrillaires et genese du collgene. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, **63** (2), 163-182.
- Gómez P. (2002) *Esponjas marinas del Golfo de México y el Caribe*. AGT Editor, S. A. México. 134 pp.
- Harii S., Nadaoka K., Yamamoto M., Iwao K. (2007) Temporal changes in settlement, lipid content and lipid composition of larvae of the spawning hermatypic coral *Acropora tenuis*. *Marine Ecology Progress Series*, **346**, 89-96.
- Hentschel U., Fieseler L., Wehrl M., Gernert C., Steinert M., Hacker M., Horn M. (2003) Microbial diversity of maine sponges. In W. E. G. Müller (Ed.), *Sponges (Porifera): Progress in Molecular and Subcellular Biology* (pp. 35-57). Heidelberg, Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Hooper N. A., Van Soest R. W. M. (2002) *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, **1**, 281-290.

- Hugenholtz P., Tyson G. W., Blackall L. L. (2001) Design and evaluation of 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. In B. A. Lieberman (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Steroid Receptor Methods Protocols and Assays* (pp. 29-41). Humana Press Inc. Totowa.
- Imhoff J. F., Stöhr R. (2003) Sponge-Associated Bacteria: General Overview and Special Aspects of Bacteria Associated with *Halichondria panicea*. In W. E. G. Müller (Ed.), *Sponges (Porifera): Progress in Molecular and Subcellular Biology* (pp. 35-57). Heidelberg, Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Jiménez-Taracido L. (2009) Caracterización biológica de biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad quorum sensing de las especies implicadas en el proceso. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente, Universidad de Cádiz. Cádiz, poner estado, España: 182 pp.
- Karawaiew W. (1896) Über ein radiolar aus Villafranca. *Zoologischer Anzeiger*, **19**, 501. (Citado por Vacelet 1999).
- Maldonado M. (2006) The ecology of the sponge larvae. *Canadian Journal Zoology*, **84**, 175–194.
- Maldonado, M., Bergquist, P.R. (2002) Phylum Porifera. In *Atlas of marine invertebrate larvae*. Edited by C.M. Young, M.A. Sewell, M.E. Rice. Academic Press, San Diego. 21–50 pp.
- Mardis E.R. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, **24** (3), 133–141.
- Mariani S., Uriz M. J., Turon X. (2005) The dynamics of sponge larvae assemblages from northwestern Mediterranean nearshore bottoms. *Journal of Plankton Research*, **27**(3), 249–262.
- Mariani S., Uriz M. J., Turon X., Alcoverro T. (2006) Dispersal strategies in sponge larvae: integrating the life history of larvae and the hydrologic component. *Oecologia*, **149**, 174–184.
- Milstein M. (2014) Unusual North Pacific warmth jostles marine food chain. https://www.nwfsc.noaa.gov/news/features/food_chain/

- NOAA (2015) Annual summary of ocean ecosystem indicators for 2015 and pre-season outlook for 2016. <https://www.nwfsc.noaa.gov/research/divisions/fe/estuarine/oeip/b-latest-updates.cfm>
- Ocean Currents Surface https://earth.nullschool.net/#2015/11/14/0000Z/ocean/surface/currents/overlay=sea_surface_temp/orthographic=-106.95,22.41,3000/loc=-106.451,21.632
- Parks D. (2014) STAMP User's Guide v2. *Statistical Analysis of Metagenomic (and other) Profiles*. 28 p.
- Perry C. T. (1998) Macroborers within coral framework at Discovery Bay, north Jamaica: Species distribution and abundance, and effects on coral preservation. *Coral Reef*, **17** (3), 277-287.
- Rappé M. S., Giovannoni S. J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, **57**, 369-394.
- Ríos-Jara E., Galván-Villa C. M., Solís-Marín F. A. (2008) Equinodermos del Parque Nacional Isla Isabel, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **79**, 131-141.
- Rivera I. N. G., Lipp E. K., Gil A., Choopun N., Huq A., Colwell R. R. (2003) Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholera* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, **5** (7), 599-606.
- Rützler K., Ferraris J. D., Larson R. J. (1980) A New Plankton Sampler for Coral Reefs. *Marine Ecology*, **1**, 65-71.
- Rützler K., Van Soest R. W. M., Alvarez B. (2003) *Svenzea zeai*, a Caribbean reef sponge with a giant larva, and *Scopalina ruetzleri*: a comparative fine-structural approach to classification (Demospongiae, Halichondrida, Dictyonellidae). *Invertebrate Biology*, **122** (3), 203-222.
- Santavy D. L., Colwell R. R. (1990) Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean Sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Marine Ecology Progress Series*, **67**, 73-82.

- Santavy D. L., Willenz P., Colwell R. R. (1990) Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean Sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (6), 1750-1762.
- Sarà A., Cerrano C., Sarà M. (2002) Viviparous development in the Antarctic sponge *Stylocordyla borealis* Loven, 1868. *Polar Biology*, **25**, 425-431.
- Sciscioli M., Ferri D., Liquori G. E., Lepore E., Santarelli G. (2000) Lectin histochemistry and ultrastructure of microgranular cells in *Cinachyra tarentina* (Porifera, Demospongiae). *Acta Histochemica*, **102**, 219-230.
- Shanks A. L., Grantham B. A., Carr M H. (2003) Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. *Ecological Applications*, **13** (1), 159- 169.
- Simpson T. L. (1984) The cell biology of sponges. Springer Verlag New York Incorporation. EUA. 662 pp.
- Spencer T., Viles H. (2002) Bioconstruction, bioerosion and disturbance on tropical coasts: coral reefs and rocky limestone shores. *Geomorphology*, **48**, 23-50.
- The Blob (Pacific Ocean) [https://en.wikipedia.org/wiki/The_Blob_\(Pacific_Ocean\)](https://en.wikipedia.org/wiki/The_Blob_(Pacific_Ocean))
- Trégouboff G. (1942) Contribution á la connaissance des larves planctoniques d'Eponges. *Archives de zoologie expérimentale et générale*, **82**, 367-399.
- Uriz M. J., Turon X., Mariani S. (2008) Ultrastructure and dispersal potential of sponge larvae: tufted versus evenly ciliated parenchymellae. *Marine Ecology*, **29**, 280-297.
- Vacelet J. (1999) Planktonic armoured propagules of the excavating sponge *Alectona* (Porifera: Demospongiae) are larvae: evidence from *Alectona wallichii* and *A. mesatlantica* sp. nov. *Memoirs of the Queensland Museum*, **44**, 627-642.
- Vacelet J., Donadey C. (1977) Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **40**, 301-314.
- Webster N. S., Hill R. T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Marine Biology*, **138**, 843-851.
- Webster N. S., Wilson K. J., Blackall L. L., Hill R. T. (2001) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (1), 434-444.

- Wilkinson C. R. (1978b) Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology*, **49**, 169–176.
- Wilkinson C. R. (1978c) Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* Associations in Coral Reef Sponges. *Marine Biology*, **49**, 177–185.
- Winston J. E. (2012) Dispersal in marine organisms without a pelagic larval phase. *Integrative and Comparative Biology*, **54**, 1–11.
- Zea S. (1993) Recruitment of Demosponges (Porifera, Demospongiae) in Rocky and Coral Reef habitats of Santa Marta, Colombian Caribbean. *Marine Ecology*, **14** (1), 1–21.
- Zimmer R. K., Butman C. A. (2000) Chemical signaling process in the marine environment. *Biological Bulletin*, **198**, 168-187.

**ANEXOS****Anexo 1. Larvas de *Thoosa* recolectadas en las zonas núcleo Bahía Tiburoneros y Las Monas y al suroeste de la isla Isabel, Nayarit en el periodo de jul-2014 a nov-2015.**

Larvas de *Thoosa* recolectadas en zona núcleo Bahía Tiburoneros y en estaciones al sur de esta zona (periodo de jul-2014 a nov-2015).

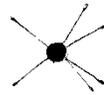
	jul-14	sep-14	nov-14	ene-15	mar-15	jun-15	nov-15
ZN (BT)	8	4	80	7	1	13	26
200 m	1	0	0	0			0
2 km	1	0	0	0			0
4 km	0	0	0	0			0
8 km	0	0	0	0			0

Larvas de *Thoosa* recolectadas en zona núcleo Las Monas y en estaciones al este de esta zona (periodo de jul-2014 a mar-2015).

	jul-14	sep-14	nov-14	ene-15	mar-15	jun-15	nov-15
ZN (LM)			3	0	0	2	11
200 m		0	0	0	0		0
2 km		0	0	0	0		0
4 km			0	0	0		0
8 km			0	0	0		0

Larvas de *Thoosa* recolectadas en estaciones al suroeste de la isla (periodo de jul-2014 a mar-2015).

NW isla	jul-14	sep-14	nov-14	ene-15	mar-15	jun-15	nov-15
200 m			1	0			
2 km			0	0			
4 km			0	0			
8 km			0	0			

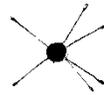


Anexo 2. Extracción de ADN.

Protocolo de extracción de ADN utilizando Kit (DNeasy Blood and Tissue Kit 50 Cat. No. 69504).

1. Colocar la muestra en tubo eppendorf nuevo y libre de etanol.
2. Agregar el tubo con la muestra 180 μ L de Buffer ATL. Agregar 20 μ L de proteinasa K, mezclar por vortex e incubar a 56 °C por 20 minutos (con vortex c/5 min.) hasta que la muestra esté completamente lisada. Vortex 5 segundos directamente antes de proceder al siguiente paso.
3. Agregar 200 μ L de Buffer AL. Mezclar con vortex. Incubar las muestras a 56 °C por 10 minutos.
4. Agregar 200 μ L de etanol (96-100 %). Mezclar en vortex.
5. Pipetear la mezcla dentro de una minicolumna spin DNeasy y colocarla en tubo de colecta. Centrifugar a 8,000 rpm por un minuto. Descartar el lavado.
6. Agregar a la columna spin 500 μ L de Buffer AW1. Centrifugar por un minuto a 8,000 rpm. Descartar el lavado.
7. Agregar a la columna spin 500 μ L de Buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 14,000 rpm.
8. Transferir la columna spin a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 o 2 ml.
9. Extraer el ADN adicionando 15 μ L de Buffer AE en el centro de la membrana de la columna spin. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente del laboratorio (15-25 °C). Centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm.
10. Repetir el paso 9 por segunda vez para incrementar la cantidad de ADN.

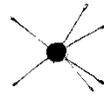
Una vez extraído el ADN de las muestras, se estima su cantidad (espectrofotómetro) y calidad (gel agarosa) para ver si está listo para ser amplificado con PCR, pero antes de ello, se corre un gel de electroforesis para cerciorarse que hay ADN.



Extracción de ADN utilizando método casero (precipitación de cloruro de sodio saturado).

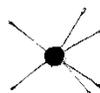
1. Retirar por completo el etanol de la muestra (quedando el pellet con las bacterias).
2. Incubar en 400 μ l de solución buffer de lisis (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) con 20 μ l de proteinasa K (sol. stock 20 mg ml⁻¹) a 65 °C durante 20 min. Agitar vigorosamente e incubar por 10 min. más.
3. Añadir 200 μ l de NaCl saturado (~6M) y nuevamente agitar vigorosamente.
4. Incubar en hielo por 10 min.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo con 1 ml de etanol absoluto e invertir varias veces para precipitar el ADN.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
8. Lavar con 400 μ l de etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm por 5 min.
9. Re suspender con 25 μ l de TE.

Una vez la muestra re suspendida con TE, está lista para amplificarla con PCR.



Anexo 3. BARCODES utilizados para secuenciación bacteriana en esponjas *T. mismalolli* y agua donde se encuentran estos organismos.

Nombre muestra	Código muestra	BARCODE Forward	BARCODE Reverse
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> obtenida de adulto	BTLA1TM	24	53
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> planctónica	BTLP1TM	8	53
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> con larva	BTAB1TM	21	53
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> sin larva	BTAB3TM	18	53
Agua superficial	BTWB3NA	76	53
Agua a 1.5m de profundidad	BTWB2NA	67	53
Agua adyacente a coral 1	BTWC1NA	17	53
Agua adyacente a coral 2	BTWC2NA	94	53



Anexo 4. Purificación de productos de PCR cortados del gel.

Los productos de las amplificaciones y reamplificaciones de todas las muestras utilizadas con distintos BARCODES (**Anexo 3**) fueron purificados con un kit de purificación (KIT Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-up System 50 preps s A9281) siguiendo los siguientes pasos:

- 1- Pesar un tubo eppendorf de 1.5 ml antes de cortar el gel.
- 2- Cortar el fragmento del gel con una navaja de bisturí estéril, ponerlo en el tubo y pesar nuevamente.
- 3- Añadir Membrana Binding Solution 10 μ l de solución por cada 10 μ g de agarosa.
- 4- Incubar entre 50 y 65 °C 10 min. Vortex cada dos o tres minutos o hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.

Nota: Geles de agarosa > 1% pueden requerir más tiempo de incubación. Es muy importante que la agarosa se disuelva completamente.

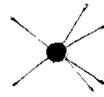
- 5- Colocar una columna en un tubo colector por cada muestra.
- 6- Transferir el DNA a la columna e incubar 1 min.

Nota: En la columna solo caben 350 μ l de solución. Si se tiene un volumen mayor será necesario pasar el DNA en varias centrifugadas.

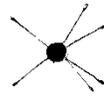
- 7- Centrifugar a 12,000 rpm 1 min. y descartar el lavado.
- 8- Lavar con 700 μ l de Membrane Wash Solution (revisar que se le añadió etanol).
- 9- Centrifugar 1 min. y descartar lavado.
- 10- Lavar con 500 μ l de Membrane Wash Solution.
- 11- Centrifugar 5 min. y descartar lavado.
- 12- Volver a poner la columna en el tubo colector y centrifugar 1 min. más.
- 13- Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml limpio.
- 14- Añadir 12.5 μ l de agua libre de nucleasas e incubar 1 min.
- 15- Centrifugar 1 min.
- 16- Añadir nuevamente 12.5 μ l de agua libre de nucleasas e incubar 1 min.
- 17- Centrifugar 1 min para obtener un sumo total de 25 μ l en el tubo.
- 18- Almacenar a -20 °C.



ANEXOS



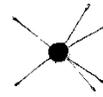
De las muestras almacenadas listas para mandarlas a secuenciar, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 2% para cerciorarse de que la cantidad de ADN purificado para secuenciar fue la indicada.



Anexo 5. Procedimientos para realizar la secuenciación.

- Cuantificación de librerías.

- 1- Se cuantificó 10 μL de cada librería (muestra) utilizando el Fluorómetro Qubit[®] 2.0 (Invitrogen Life Technologies). En este trabajo se elaboró una librería de fusión. Esta consiste en utilizar muestras, de las cuales cada una se amplifica con primers (en este caso BARCODES) diferentes, mismos que están dirigidos a una pequeña región del genoma.
- 2- Se determinó la concentración de la librería amplificada. Para lograr esto:
 - a) Se hizo una dilución 1:200 del reactivo Qubit[®] dsDNA High Sensitivity Assay (Life Technologies) usando el tampón Qubit[®] dsDNA HS.
 - b) Se hizo una combinación de los 10 μL de cada librería con 190 μL de colorante, se mezcló e incubó durante dos minutos.
 - c) Se preparó cada estándar Qubit[®].
 - d) Se midió la concentración en el Fluorómetro Qubit[®] 2.0.
 - e) Se calculó la concentración de cada librería no diluida y se multiplicó por 10.
- 3- Se determinó la dilución de la librería que diera aproximadamente una concentración de 3ng/mL.
- 4- Previo a la preparación del templado, se diluyó una alícuota de cada librería a una concentración de ~3ng/mL. Diluidas las librerías, estas se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para el pool de las librerías se requiere a una concentración de 20 pM (3ng/mL). Por lo tanto, de cada una de las librerías (muestras) se tomaron 3 μL obteniendo un volumen final de 24 μL .



- **Cuantificación de librerías obtenidas.**

El protocolo para la cuantificación de las librerías se realizó por medio del Qubit®. (Life Technologies). Las concentraciones variaron entre las muestras de esponja y agua.

Cuantificación de las librerías de las muestras de esponjas y agua.

Nombre muestra	Código muestra	Qubit (ng/mL)
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> obtenida de adulto	BTLA1TM	5020
Esponja larva <i>T. mismalolli</i> planctónica	BTLP1TM	2380
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> con larva	BTAB1TM	53000
Esponja adulto <i>T. mismalolli</i> sin larva	BTAB3TM	5100
Agua superficial	BTWB3NA	3280
Agua a 1.5m de profundidad	BTWB2NA	18200
Agua adyacente a coral 1	BTWC1NA	12900
Agua adyacente a coral 2	BTWC2NA	2280

- **Preparación del Templado.**

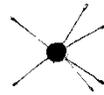
Para preparar el templado se utilizó el kit Ion Touch 200 Suplies/Solutions.

- **Unión de los fragmentos a secuenciar (templado) sobre la superficie la Esfera de Partículas Iónicas (Ion Sphere Particles, ISP's).** Las ISP's son esferas que tienen adheridos fragmentos del ADN bacteriano.

- **Manejo de las ISP's.**

Las ISP se amplificaron, cuantificaron, enriquecieron y cuantificaron nuevamente.

- 1- Se amplificaron las IPS's del templado y se recuperaron las ISP's vivas (asociadas con la librería) con el Kit One Touch 200 reagents.
- 2- Se cuantificaron las ISP's totales (10-30%) con el Qubit y utilizando el kit Ion Sphere Quality Control.
- 3- Se enriquecieron las ISP's utilizando el kit One Touch 200 reagents y se separaron las esferas positivas de las totales a través del sistema automatizado Ion One Touch ES.
- 4- Se cuantificaron las ISP's vivas (>50%) con el Qubit y el kit Ion Sphere Quality Control.



- **Lavado y preparación del secuenciador.**

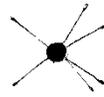
Para la se secuenciación, previamente se requirió lavar el Ion Torrent.

- 1- Comenzó el lavado con cloro.
- 2- Se lavó con agua destilada recién filtrada (no almacenada).
- 3- Se ajustó el pH de las soluciones de secuenciación W2 y W1 tomando de referencia la solución W3 hasta llegar a un pH de 7.7.
- 4- Se realizó la primera inicialización utilizando el kit Ion GM 200 Sequencing/Supplies Solution.

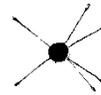
- **Cargado del Chip e ISP's.**

Para el cargado, se utilizó el protocolo establecido para el chip 316 proporcionado por la empresa Life Technologies.

- 1- Vortexear las ISPs control por 2seg y agregar 5 μ L a 50 μ L de ISP's con el templado. Agregar 100 μ L de tampón de alineamiento y mezclar por pipeteo en hielo.
- 2- Centrifugar a 15500g por 4 min. y retirar el volumen, dejando 3 μ L de sequencing primer. Después homogenizar y llevar al termociclador.
- 3- Realizar el chequeo del chip (chipcheck) como lo indica el equipo y se comenzar con el lavado del chip.
 - a) El chip se lavó con 100 μ L de isopropanol. El chip se inclinó 45° con el puerto de entrada hacia abajo y se aspiró todo lo que salía del puerto de salida.
 - b) Enseguida el chip se lavó con 100 μ L de tampón de alineamiento. Se inclinó de la misma forma y se aspiró todo lo que salía del puerto de salida. Este lavado se repitió una vez más.
 - c) Se adicionó 1 μ L de polimerasa de secuenciación a las ISP's vivas, se mezcló por pipeteo y se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
 - d) Se inclinó el chip de nuevo (45°), se aspiró todo lo que saliera por el puerto de entrada directamente del orificio y se centrifugó boca abajo por 10 segundos.
- 4- Se cargó el chip 316. Esto es la parte crítica para la eficiencia de la secuenciación, ya que se requiere que cada puerto de carga del chip contenga 1 ISP's y por tanto, se cargó 7 μ L en el chip agregando lentamente con pipeta.



- 5- Se retiró todo lo que salió por el otro puerto de salida del chip.
- 6- Transferir el chip en el MiniFuge (centrifuga personalizada para el chip de Ion Torrent PGM) y centrifugar por 40 segundos.
- 7- Cuando terminó la carga completa del chip, se seleccionó el plan de secuenciación e inmediatamente se realizó la secuenciación.



Anexo 6. Phyla que contribuyeron con menos del 1% de las secuencias de adultos y larvas de *Thoosa mismalolli* y en el medio circundante donde habita esta esponja.

Phylum	Larva <i>T. mismalolli</i> obtenida de adulto	Larva <i>T. mismalolli</i> planctónica	Adulto <i>T. mismalolli</i> con larva	Adulto <i>T. mismalolli</i> sin larva	Agua superficial	Agua 1.5m profundidad	Agua adyacente coral 1	Agua adyacente coral 2
AC1	0.0000	0.0175	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0054
AD3	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AncK6	0.1040	0.3437	0.3712	0.4221	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Armatimonadetes	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0469	0.0201	0.0322
BRC1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0235	0.0201	0.0054
Caldithrix	0.0000	0.0233	0.0000	0.0000	0.0000	0.0117	0.0403	0.0268
Chlamydiae	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0000	0.0101	0.0215
Chlorobi	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0201	0.0215
Elusimicrobia	0.0000	0.0117	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Fibrobacteres	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0340	0.0469	0.0000	0.0000
Fusobacteria	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.5043	0.4691	0.0805	0.0268
GN02	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0227	0.0704	0.0101	0.0697
GN04	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0215
Lentisphaerae	0.0000	0.0117	0.0000	0.0000	0.0680	0.0821	0.0403	0.0054
MVP-21	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0215
NKB19	0.0520	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
OD1	0.0000	0.0000	0.0000	0.1938	0.0057	0.0235	0.0201	0.0054
OP1	0.0260	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
OP11	0.0520	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
OP3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0000	0.0000	0.0000
OP8	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0101	0.0161
Planctomycetes	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1530	0.3401	0.0906	0.1180
SAR406	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2040	0.3636	0.0503	0.0107
SR1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0000	0.0000	0.0000
Synergistetes	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0117	0.0000	0.0054
Tenericutes	0.0000	0.0058	0.0359	0.0000	0.0170	0.0000	0.0201	0.0054
Thermi	0.0260	0.1515	0.1197	0.1799	0.0737	0.0235	0.0805	0.0376
TM7	0.0260	0.0117	0.0838	0.2076	0.0113	0.0586	0.0101	0.0268
Unclassified	0.0000	0.0524	0.0060	0.0069	0.0057	0.0117	0.0201	0.0054
Verrucomicrobia	0.0000	0.0990	0.1197	0.1592	0.0907	0.1407	0.0805	0.0268
WPS-2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	0.0000	0.0000	0.0000
WS2	0.0000	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0107
WS3	0.0260	0.0175	0.0000	0.0000	0.0227	0.0000	0.0604	0.0697
ZB3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0069	0.0057	0.0469	0.0101	0.0000

