

13. Alexova R, Haynes PA, Ferrari BC, Neilan BA (2011) Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Mol Cel Proteomics* 10(9):M110.003749–M003110.003749.

CAPÍTULO 12

Uso de técnicas moleculares para el estudio de la biodiversidad de las fracciones más pequeñas del fitoplancton del Mar Argentino

Macarena Perez-Cenci, Gonzalo F. Caló,
Dana Scheidegger, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
gsalerno@fiba.org.ar

RESUMEN

Actualmente estamos frente a un cambio climático global, atribuido directa o indirectamente a las actividades humanas, y una de sus consecuencias es el aumento de la temperatura a escala planetaria causada por el incremento de la concentración atmosférica de gases del efecto invernadero, como el dióxido de carbono. Aproximadamente una cuarta parte de este gas es atrapado por los mares y océanos, que cubren cerca del 71% de la superficie de la tierra, a través de la actividad de los organismos del fitoplancton marino, responsables de la mitad de la fotosíntesis del planeta. Dentro del fitoplancton, las fracciones más pequeñas (pico y nanofitoplancton) constituyen una comunidad diversa que domina la biomasa de las zonas centrales de los océanos y la productividad primaria de la biosfera. En los próximos años se estima que el cambio climático altere la composición de dichas comunidades, por

lo cual hay un creciente interés a nivel mundial en conocer exacta y rápidamente las distintas especies de relevancia que la componen y sus variaciones espaciales y temporales.

En el hemisferio norte, en los últimos años se han logrado importantes avances en la identificación de los organismos del pico-nanoplancton marino, así como en el conocimiento de su dinámica poblacional. Dado el extremadamente pequeño tamaño de estos organismos, la implementación de metodologías moleculares y otras técnicas modernas, ha sido clave para estos avances científicos. Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en poner a punto y aplicar estas metodologías para generar los primeros datos moleculares que aportan al conocimiento de la diversidad de picocianobacterias y de especies pico-nanofitoplanctónicas eucariotas presentes en el océano Atlántico Sudoccidental, y en particular en el Mar Argentino.

INTRODUCCIÓN

La actividad humana afecta el clima de nuestro planeta al generar emisiones de gases del efecto invernadero a la atmósfera, como el dióxido de carbono (CO_2), provocando un calentamiento de la superficie de la Tierra y una distorsión en el sistema climático global [1]. Aproximadamente una cuarta parte del CO_2 emitido por las actividades humanas es absorbido anualmente por los océanos [2]. Los organismos fotosintéticos integrantes del plancton marino (fitoplancton), tienen una función clave como bomba biológica (“biological pump”) ya que fijan el CO_2 a través de la fotosíntesis, capturando carbono y transfiriéndolo a las capas profundas del océano. Estos organismos son **esenciales** para la sostenibilidad de la cadena trófica y son reconocidos como responsables de la mitad del total de la producción primaria en los océanos y, junto con las algas, como generadores de la mitad de las moléculas de oxígeno de la atmósfera [3].

El picofitoplancton se define como el conjunto de células que pasan a través de un filtro de 3 μm , y el nanofitoplancton como aquellas que poseen un tamaño menor a 20 μm . El conocimiento de los organismos que dominan el fitoplancton es muy escaso debido a sus tamaños, a pesar de que son mucho más abundantes que los integrantes del microfitoplancton ($> 20 \mu\text{m}$). Los rasgos distintivos de la mayoría de las especies más pequeñas sólo pueden visualizarse mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido,

que además de demandar excesivo tiempo de procesamiento y una cantidad apreciable de material biológico, ofrece resultados limitados en cuanto a la diversidad ambiental global. Los estudios llevados a cabo en el océano Pacífico Norte y en el **mar** Mediterráneo en las últimas dos décadas indicaron que el picofitoplancton domina la biomasa fotosintética de las zonas centrales de los océanos (60–80%) y la productividad primaria de la biosfera [4]. Esta fracción del plancton está compuesta por: i) picocianobacterias, procariontes que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, representadas principalmente por los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, y ii) algas pico y nanoeucariotas de una amplia diversidad taxonómica, aún poco conocidas. A partir de estudios realizados en el hemisferio norte combinando técnicas tradicionales, como la microscopía de fluorescencia, con nuevas metodologías, como la citometría de flujo y las derivadas de la biología molecular, surge la posibilidad de descubrir la existencia de nuevos taxones [5]. Con estos métodos, se han descrito numerosas especies de eucariotes picoplanctónicos fotosintéticos, pertenecientes al menos a nueve clases de algas (Chlorophyceae, Eustigmatophyceae, Trebouxiophyceae, Prymnesiophyceae, Bolidophyceae, Eustigmatophyceae, Pinguicophyceae, Bacillariophyceae y Pelagophyceae). En particular, se han encontrado en el picofitoplancton eucariota representantes de las clases Prasinophyceae (división Chlorophyta), Pelagophyceae (división Heterokontophyta) y Prymnesiophyceae, que son componentes mayoritarios en diferentes sistemas marinos [5].

La posibilidad de identificar especies por metodologías de la biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la amplificación de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las subunidades pequeñas del RNA ribosomal (*rRNA 16S* para los procariontes y *rRNA 18S* para los eucariotas), significó un cambio sustancial en el estudio de la composición del pico y nanofitoplancton. Estas herramientas moleculares han permitido tanto la caracterización taxonómica como funcional y ha contribuido sustancialmente al entendimiento de la composición, interrelación, biodiversidad, distribución y abundancia a nivel global de los organismos más pequeños del fitoplancton [6]. Se ha reportado también que es posible realizar el análisis de filogenia molecular a partir de secuencias de genes cuyo estado evolutivo es suficientemente estable. Por ejemplo, para los eucariotas, se han usado los genes que codifican la subunidad pequeña del *rRNA* cloroplastídico (*rRNA 16S* plastídico), o la subunidad mayor de la RuBisCo (*rbcL*), y para los procariontes, el gen codificante de un factor de transcripción (NtcA) específico de cianobacterias [7, 8].

La gran mayoría de los estudios con metodologías de la biología molecular han sido realizados a partir de campañas oceánicas enmarcadas en proyectos globales de monitoreo de la diversidad del picofitoplancton en aguas marinas, como el PICODIV (<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/PICODIV>) y de otras campañas que recopilan una gran cantidad de información proveniente del océano Atlántico Norte, del océano Pacífico, del océano Índico, del Mar Rojo y del Mar Mediterráneo [9, 11].

Sin embargo, hay regiones oceánicas inexploradas todavía, como las aguas del Océano Atlántico Sudoccidental [12], y en particular del Mar Argentino, que comprende más de tres millones de km² a lo largo de la costa de nuestro país [13]. La plataforma argentina constituye la continuación subacuática del continente, extendiéndose en una suave planicie que desciende hasta 200 m de profundidad, para luego precipitarse hasta los 5.000 m bajo el mar. La confluencia de las corrientes de Malvinas y Brasil, junto con la abundante escorrentía terrestre del Río de la Plata, y las aguas poco profundas de la zona, se combinan para producir un sistema hidrográfico singular. La principal característica de este sistema es que la plataforma y el talud continental constituyen unas de las áreas con mayor producción primaria, con valores de abundancia de fitoplancton aproximadamente tres veces mayor a la media registrada en el resto de los océanos [14]. Esta región, sustenta una variedad de especies de bivalvos bentónicos, peces, aves, mamíferos, y una considerable riqueza ictícola, que directa o indirectamente dependen de la abundancia del fitoplancton. La región también es importante en el balance regional del CO₂ [15].

Dada la importancia de la función que desempeñan los organismos del fitoplancton en el océano y la muy limitada información sobre los componentes de la fracción más pequeña en el Mar Argentino, se decidió comenzar un proyecto sobre esta temática, en una propuesta pionera, con la participación de expertos en áreas complementarias (fisiología y ecología marina, y bioquímica y biología molecular de microorganismos fotosintéticos) pertenecientes al Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) y a la Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), a partir de un Convenio de Cooperación entre las dos Instituciones, firmado en mayo de 2001. En el presente capítulo se resumen los resultados obtenidos, usando metodologías moleculares, que dieron lugar a publicaciones y, hasta el presente, la concreción de dos tesis doctorales, en las que se estudiaron no sólo la biodiversidad de los componentes picofitoprocariontes y eucariotas del Mar Argentino, sino tam-

bién diferentes respuestas fisiológico-moleculares de organismos modelo (la cianobacteria *Synechococcus marinus* y la prasinofita *Ostreococcus tauri*) frente a variaciones de condiciones ambientales.

METODOLOGÍAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MARINA

La caracterización de la diversidad y las relaciones filogenéticas de los organismos procariontes y eucariotas pertenecientes a la fracción más pequeña del fitoplancton en aguas del talud patagónico y plataforma adyacente, se llevó a cabo mediante un enfoque metagenómico, en el que se usan técnicas moleculares. El proyecto se inició en colaboración con el INIDEP, cuyos investigadores, el Dr. Ricardo I. Silva y el Lic. Rubén Negri, estuvieron a cargo la colección de las muestras, determinación de parámetros ambientales y observaciones microscópicas. Los sitios de muestreo correspondieron a la campaña GEFII, Proyecto PNUD ARG 02/018 “Conservación de la Diversidad Biológica Marina y Prevención de la Contaminación en Patagonia” (Fig. 1).

Las muestras de agua fueron filtradas en forma diferencial para retener la fracción de organismos con un tamaño < 3 µm. Del material biológico de cada filtro, se extrajo el DNA ambiental del cual, posteriormente, se amplificaron fragmentos de los genes *rNAr 16S* y *18S* mediante la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos (cebadores) específicos para procariontes y eucariotas (tanto heterótrofos como autótrofos), respectivamente. En paralelo, se hicieron amplificaciones con oligonucleótidos específicos para amplificar genes presentes únicamente a la fracción fotosintética. Con los fragmentos producto de cada una de las amplificaciones por PCR, se generaron bibliotecas ambientales mantenidas en *Escherichia coli*. Como metodología complementaria para analizar la diversidad de picocianobacterias se utilizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). Esta técnica permitió analizar la diversidad entre las muestras ambientales utilizando como referencia cepas aisladas del ambiente. Se procedió a secuenciar los fragmentos de DNA, tanto de las bibliotecas generadas como del DGGE, y los resultados fueron analizados en cuanto a su similitud mediante la comparación con secuencias presentes en bases de datos de dominio público. Esto permitió asignar las secuencias identificadas a diferentes grupos taxonómicos. Si bien este tipo de enfoque experimental es muy laborioso y demanda mucho tiempo en el laboratorio, resulta

ser extremadamente importante para un acercamiento inicial a las condiciones del ambiente, brindando un conocimiento más amplio de los componentes de cada muestra.

APORTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El análisis de muestras de agua colectadas de la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA), situada frente a Mar del Plata demostró que la fracción procariota del picofitoplancton estuvo representada por cianobacterias del género *Synechococcus*, más precisamente del clado I. En las muestras correspondientes a las estaciones 20, 27 y 62 (Fig. 1) se identificaron secuencias de miembros del mismo clado. Sin embargo, un resultado muy interesante fue el hallazgo de secuencias de clado IV en las estaciones de la plataforma patagónica media (27 y 66) pero no en las estaciones de aguas oceánicas (20 y 62). La co-ocurrencia de *Synechococcus* de los clados I y IV ha sido bien documentada en otras regiones templadas mesotróficas (latitudes superiores 30 N / S). La abundancia de los dos clados es probable que varíe tanto espacial como temporalmente pero el hecho de la coexistencia sugiere que ambos clados están adaptados a aguas de baja temperatura y de alta concentración de nutrientes [16].

Para la realización del análisis de la fracción más pequeña del fitoplancton eucariota se hicieron bibliotecas genómicas ambientales, con dos estrategias experimentales diferentes.

En primer lugar se analizó cada una de las muestras utilizando cebadores generales con los cuales se determinó la presencia de los componentes fotosintéticos, como así también los heterotróficos, en las muestras estudiadas. Este análisis se realizó con el objeto de obtener una idea general de la estructura biológica de las muestras estudiadas. En este análisis, los microorganismos fotosintéticos pertenecientes a la fracción menor del plancton fotosintético fueron sensiblemente subestimados, determinándose la presencia de secuencias asociadas a haptofíceas, criptofíceas y pelagofíceas. En este estudio también se ha podido evidenciar un vasto número de linajes de estramenopilos marinos pertenecientes a la fracción pico-nano eucariota. Los denominados nuevos grupos de estramenopilos marinos incluyen hasta 12 linajes filogenéticos, aparte del grupo conocido como estramenopilos heterotróficos [9]. En todas las estaciones de muestreo analizadas se registraron secuencias asociadas a formas heterotróficas correspondientes a alveolados, cercozoa, apuzoa y katablephari-

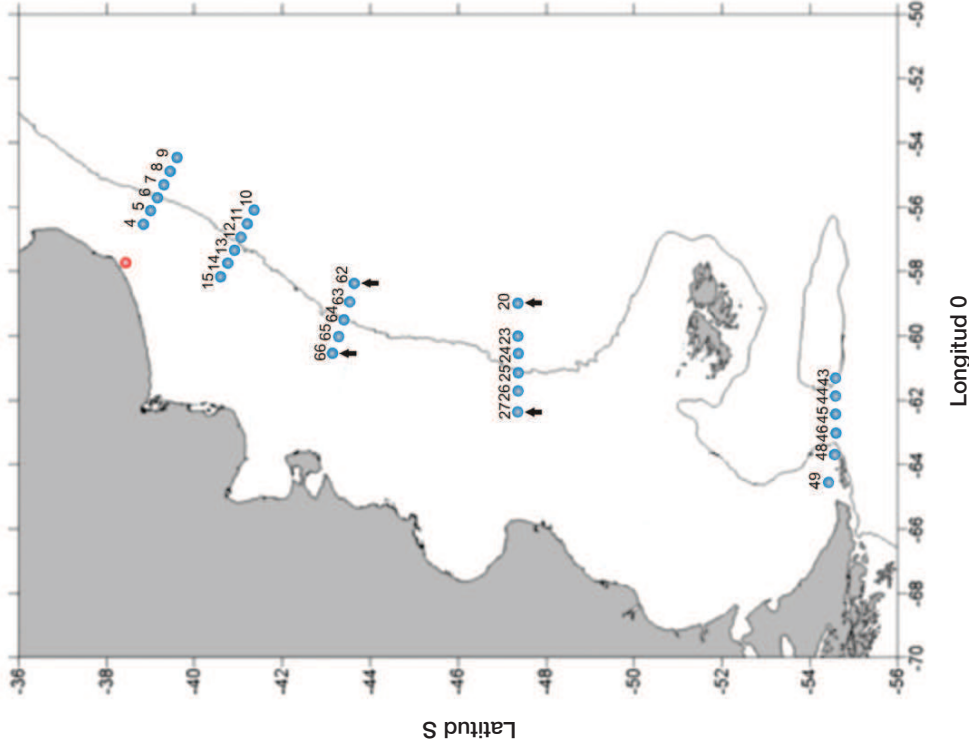


Figura 1. Sitios donde se realizaron las tomas de muestras en el Mar Argentino. El círculo rojo corresponde a la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA) las muestras fueron colectadas en una campaña del buque "Capitán Cánepa" (INIDEP). Los círculos celestes indican las posiciones de 29 estaciones donde se recogieron muestras en campañas del buque oceanográfico R/V APA "Puerto Deseado" (GEF II, PNUD ARG 02/018 Project). Las flechas señalan las muestras que han sido analizadas hasta el presente (estaciones 66 y 27, y estaciones 62 y 20).

dae. El análisis global de los resultados obtenidos en los diferentes puntos de muestreo, dio cuenta de una amplia diversidad, que concuerdan con estudios realizados en otros ambientes oceánicos [17].

En un segundo enfoque, se utilizaron cebadores específicos para determinar únicamente la fracción fotosintética, dado que era nuestra principal prioridad la identificación de los componentes autótrofos de las fracciones más pequeñas del plancton. Del análisis general de los componentes eucariotas más pequeños del plancton, se reveló la presencia de algunos de los principales grupos de pico-nanoeucariotas con una abundancia relativa y diversidad variable entre los diferentes puntos de muestreo. Se logró una mayor representación de la fracción autótrofica, lográndose asociar secuencias a numerosas especies de eucariotes pertenecientes a las fracciones del pico y nanofitoplancton que no habían podido ser detectadas en las primeras bibliotecas. Entre las más representativas se ha determinado la presencia de secuencias asociadas a los géneros *Prasinoderma*, *Nephroselmis*, *Micromonas*, *Pyramimonas* y *Bathycoccus*, siendo géneros ampliamente distribuidos a escala global y de una importancia relevante en la fijación del carbono en los océanos [6].

Por otra parte, los estudios fisiológico-moleculares en los organismos modelo del picofitoplancton (*Synechococcus* sp. PCC 7002 y *O. tauri*), cuyos genomas han sido completamente secuenciados, permitieron conocer la respuesta de la picocianobacteria a cambios en la salinidad en cuanto a la acumulación de sacarosa (soluto compatible), y a posibles mecanismos de respuesta de la prasinofita *O. tauri*, frente a variaciones de la concentración de nitrógeno en el medio.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La necesidad de identificar las especies de particular relevancia (“key species”) en los ecosistemas oceánicos es un tema de importancia mundial. En el Mar Argentino es sumamente importante conocer los tipos funcionales de la comunidad del picofitoplancton no sólo en una serie temporal sino también en sus variaciones espaciales, ya que como se enfatizó previamente el Mar Argentino es una de las áreas biológicas más ricas de los océanos del mundo. Esto generará información sobre dinámicas de las poblaciones y como las actividades de sus componentes son afectadas estacionalmente, información que será fundamental para la evaluación de fenómenos a gran escala como el impacto del cambio climático global.

Dado que se han analizado sólo una parte de las muestras recolectadas en las campañas del Proyecto GEFII, se hará énfasis en conseguir nuevas fuentes de financiamiento para poder completar el estudio de las muestras recolectadas en todas las estaciones pertenecientes a las dos campañas, que servirá de punto de referencia y de comparación con los datos de futuras campañas. Los cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica podrían proporcionar un alerta temprano para las perturbaciones generadas por el clima y otros factores en el Mar Argentino. Para contribuir a esta temática tan importante, apoyaremos la concreción de proyectos colaborativos con otros centros nacionales e internacionales y la realización de encuentros de intercambio multidisciplinarios, poniendo énfasis en promover la formación de recursos humanos en las disciplinas relacionadas.

REFERENCIAS

- Doney SC, Ruckelshaus M, Duffy JE, Barry JP, Chan F, English CA, Galindo HM, Grebmeier JM, Hollowed AB, Knowlton N, Polovina J, Rabalais NN, Sydeman WJ y Talley LD (2012) Climate change impacts on marine ecosystems. *Annu Rev Mar Sci* 4(1):11–37.
- Le Quééré C, Takahashi T, Buitenhuis ET, Rödenbeck C, Sutherland SC (2010) Impact of climate change and variability on the global oceanic sink of CO₂. *Global Biogeochem Cycles* 24(4):GB4007.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281(5374):237–240.
- Agawin NSR, Duarte CM, Agustí S (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnol Oceanogr* 45(3):591–600.
- Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaultot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409(6820): 607–610.
- Not F, Massana R, Latasa M (2005) Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnol Oceanogr* 50(5):1677–1686.
- Corredor J, Wawrik B, Paul J, Tran H, Kerkhof L, López J, Dieppa A, Cárdenas O (2004) Geochemical rate-RNA integration study: Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase gene transcription and photosynthetic capacity of planktonic photoautotrophs. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5459–5468.
- Penno S, Lindell D, Post AF (2006) Diversity of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* populations determined from DNA sequences of the N-regulatory gene *ntcA*. *Environ Microbiol* 8(7):1200–1211.
- Massana R, Balague V, Guillou G, Pedrós-Alió C (2004) Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 50(3):231–243.
- Viprey M, Guillou L, Ferréol M, Vaultot D (2008) Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environ Microbiol* 10(7):1804–1822.
- Huang S, Wilhelm SW, Harvey HR, Taylor K, Jiao N, Chen F (2012) Novel lineages of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in the global oceans. *ISME J* 6(2):285–297.
- Buitenhuis ET, Li WKW, Vaultot D, Lomas MW, Landry M, Partensky F, Karl DM, Ulloa O, Campbell L, Jacquet S, Lantoiné F, Chavez F, Macias D, Gosselin M, McManus GB (2012) Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth Syst Sci Data Discuss* 5:221–242.
- Piola AR (2008) Oceanografía física. In: Estado de Conservación del Mar Patagónico y áreas de influencia 1–21.
- Falabella V, Campagna C, Croxall J (Eds) (2009) Atlas del Mar Patagónico. Especies y Espacios. Buenos Aires, Wildlife Conservation Society y BirdLife International. <http://www.atlas-marpatagonico.org>.
- Bianchi AA, Pino DR, Perlender HGI, Osiroff AP, Segura V, Lutz V, Clara ML, Balestrini CF, Piola AR (2009) Annual balance and seasonal variability of sea-air CO₂ fluxes in the Patagonia Sea: Their relationship with fronts and chlorophyll distribution. *J Geophys Res* 114(C3):C03018.
- Pittera J, Humily F, Thorel M, Grulois D, Garczarek L, Six C (2014) Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *ISME J* 8(6):1221–1236.
- Díez B, Pedrós-Alió C, Massana R (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol* 67(7):2932–2941.