



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA

**DIVERSIDAD DEL PICOPLANCTON
EUCARIÓTICO MARINO MEDIANTE MÉTODOS
MOLECULARES**

Beatriz Díez Moreno

Tesis Doctoral
Universitat Autònoma de Barcelona
Facultad de Ciencias – Departamento de Genética y Microbiología

***Diversidad del picoplancton eucariótico marino
mediante métodos moleculares***

Memoria presentada por Beatriz Díez Moreno para optar al título de doctora en Biología en el Departamento de Genética y Microbiología – Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la tutoría del Dr. Jordi Mas y la dirección del Dr. Carlos Pedrós-Alió y el Dr. Ramon Massana i Molera del Departamento de Biología Marina y Oceanografía del Institut de Ciències del Mar, (CMIMA, CSIC) de Barcelona.

Beatriz Díez Moreno
Barcelona. Septiembre de 2001

El director de la tesis
Dr. Carlos Pedrós-Alió.
Profesor de investigación
Institut de Ciències del Mar
CMIMA, CSIC

El director de la tesis
Dr. Ramon Massana i Molera
Investigador contratado
Institut de Ciències del Mar
CMIMA, CSIC

El tutor de la tesis
Dr. Jordi Mas
Profesor Titular de la Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Barcelona

A Sandro

*«No digo que haya disfrutado mucho del trabajo que los dioses me impusieron.
Mi mayor placer estuvo en mis días de instrucción,
en aquellas horas entre las acuciantes demandas de los dioses.
Me pongo gustosa a su disposición, siempre.
Pero oh, era tan dulce aprender lo ancho que podía ser el universo,
medirme contra mis profesores, y equivocarme a veces,
sin demasiadas consecuencias...»*

Orson Scott Card
Hijos de la mente

ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Capítulo 1. Introducción general.....	7
Capítulo 2. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing.....	33
Capítulo 3. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques.....	53
Capítulo 4. Composition and distribution of eukaryotic picoplankton across hydrographic fronts in the Southern Ocean.....	75
Capítulo 5. Variability in abundance and composition of eukaryotic picoplankton in the Alborán Sea (SW Mediterranean).....	103
Discusión general.....	127
Conclusiones.....	133
Bibliografía.....	135
Anexo I	157
Anexo II	169

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada durante el disfrute de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Cultura, en el periodo 1997-2001.

Este trabajo fue en su mayor parte financiado por los proyectos europeos MIDAS (MAS3-CT97-00154) y PICODIV (EVK3-CT1999-00021). Las muestras procedentes del Atlántico Norte fueron tomadas durante la campaña oceanográfica ACSOE NAE financiado por el NERC (Reino Unido) y la CICYT mediante el proyecto MAR97-1885-E. Las muestras procedentes del Mar Mediterráneo fueron tomadas gracias a la financiación del proyecto europeo MATER (MAS3-CT96-0051); y las muestras procedentes del Océano Glaciar Antártico fueron colectadas durante las campañas oceanográficas E-DOVETAIL y DHARMA, gracias a los proyectos ANT96-0866 y ANT97-1155 financiados por la CICYT. El trabajo de análisis por T-RFLP fue financiado en parte por la beca NSF-DEB 8707224 en el Center for Microbial Ecology en la Michigan State University.

En primer lugar, quiero dejar constancia de mi gran agradecimiento a mis dos directores de tesis: el Dr. Carlos Pedrós-Alió y el Dr. Ramon Massana i Molera. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Por su entusiasmo y sus buenas ideas (siempre geniales).

Agradezco al Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC) por prestarme sus instalaciones e infraestructura. Gracias por dejarme conocerte y disfrutarte. A tu terraza y su ambientillo, gracias por no hacerme olvidar que fuera del lab. existía todo un mundo y no dejar que palidciera. Serás siempre un bonito recuerdo.

A Ramon quien me enseñó con paciencia y en tantas ocasiones plena dedicación, todo lo que necesité aprender y mucho más. Gracias por tus críticas siempre constructivas y por ser no sólo un director, sino un compañero y un excelente amigo. Porque sin tu ayuda me parece imposible haber conseguido llegar hasta aquí.

I am very grateful Dr. Terence L. Marsh and all people in the Romelab (Center of Microbial Ecology) for the facilities given in the lab. during my two stays in Michigan.

Gracias al Dr. Jordi Mas quien accedió a ser mi tutor en la Universidad Autónoma de Barcelona.

A la Dra. Pepa Antón por enseñarme tantas cosas y compartir conmigo su ciencia y su amistad.

A la Dra. Marta Estrada por sus comentarios que siempre fueron de gran ayuda.

A mis padres por haberme dado la oportunidad de tener la educación que deseaba, y dejarme buscar el camino para conseguir mi sueño. Gracias a mi padre por haberme inculcado el afán por la superación y el querer ser mejor cada día. A mi madre por hacerme existir y cuidar de mi durante tantos años, siempre deseándome lo mejor. Gracias por apoyarme desde la distancia y hacerme sentir que merecía la pena el esfuerzo.

A mis hermanos Jose Manuel y Sandra que aunque en muchas ocasiones nos llevamos como tales, siempre he sentido su cariño muy de cerca. Os quiero tanto...!!

A mi familia adoptiva, quienes me enseñaron y demostraron que el ser padres o hermanos no es solo cosa de genes. Vuestro cariño y apoyo sin límites me dio la fuerza para seguir adelante. Gracias a ti Salva y a ti Alejandro que me tratasteis como a vuestra propia hija. A Alberto y Javier que siempre seréis como mis propios hermanos. Lo más gratificante después de tener en mis manos por fin estas páginas ha sido el poder dedicárselas a Sandro.

A Oscar, Mónica, Javi y Asun, que vieron muy de cerca y compartieron conmigo toda una vida, formareis parte por siempre de muchos de los más especiales y bonitos recuerdos que siempre me acompañarán. Sois estupendos!

A Ana y Silvia por ser las amigas del corazón más grandes. Porque con amigas como vosotras, la ciencia y la vida son muchísimo mejores. Ni en mil vidas podría agradeceros todo el cariño que me habéis dado. Os quiero un montón!

A Eli per essere la mia particolare strega e per sopportarmi in tanti giorni grigi. Grazie per la tua compagnia e per il tuo amore. Ti voglio bene!

A Xelu, Michael, Susana y Eli, porque cuando llegué a Barcelona fuisteis un gran apoyo y compartimos momentos increíbles.

A Sonia, Teresa, Xelu, Michael y Pol por compartir sus vidas conmigo y por estar ahí cuando más lo necesite. Gracias por vuestro coraje al prestaros a aguantarme a mi y al Cachito durante todos aquellos meses.

A Ricardo por compartir aquellos ratos en la pradera, por escuchar y saber entender.

Mi más profundo agradecimiento a todos vosotros, estudiosos y colegas, que os habéis convertido en amigos míos durante el curso de esta tesis. Mis compañeros, Eli, Xelu, Michael, Susana, Albert, Enric, Evarist, Pep, Mikel, Renate, Montse, Magda, Jarone, Sergi, Emilio, Laura, Andrea, y Laure. Por vuestras risas, vuestro ánimo, vuestro cariño y vuestros buenos consejos y sugerencias científicas.

A Mikel Latasa, por su buen rollito, sus palomitas y su saber escuchar. Gracias por tus HPLC enseñanzas, sin ti el Capítulo 5 nunca habría existido.

A Pep Gasol por su ayuda con la citometría de flujo y sus sabios comentarios. Gracias mil por tu gran ayuda sobre todo al final...la portada nos quedo de lujo...!!

A Núria y Vanessa por ayudarme tanto, y dar vidilla a esos largos días en el lab. Gracias Barbie por tu buen humor, simpatía y buenas manos!.

A Lluïsa Cross por prestarme con tanta amabilidad su ayuda y experiencia a la hora de ponerme al día con los cultivos de algas. Resisten porque les encanta que alguien como tu las mime tanto! Gracias por tus continuos ánimos!

A Francesc Pagès y los dos Rafel, Coma y Simó, por compartir su espacio y su ciencia conmigo, y no quejarse al tener que recorrer los pasillos en mi busca cada vez que sonaba el teléfono.

A Núria Guixa por descubrirme la existencia del ICM y ofrecerme toda su ayuda antes y después de llegar hasta él.

A la Unidad de Secuenciación de la Universidad de Barcelona, por tantas horas de trabajo que les di y "lo bien que me trataron".

A Alex, Evilio, Cesc y Pep por su ayuda informática.

Al B.I.O. Hespérides y García del Cid por sus paseos por el mar. A toda la tripulación del "García" por ser tan buena gente.

A Toni y Raquel por su amistad y cariño.

A Judit por guiarme y ayudarme a recuperar el camino en la tesis de mi vida.

A 2001 ("Uno") por recordarme a diario que este momento llegaría. Por todas esas cosas rotas, manos arañadas y noches en vela. Por ser el mejor Cachito del mundo!

A Javi por ser como es y demostrarme que todavía me queda mucho por aprender de mi misma. Por hacerme vivir en la Antártida cada día mientras escribía el Capítulo 4. Por tu respirar sereno y tu saber esperar. Tu optimismo me es imprescindible!

Gracias, gracia, gracias... a todos los que mi mente olvida en este momento pero mi corazón recordará siempre!!.

"A los mares y océanos del mundo, por estar hechos del material del que están hechos los sueños...digo, las tesis y proveer la materia prima con la que se fabricó este sueño...quiero decir... esta tesis".

Gracias Sandro, por enseñarme que el amor mueve la vida y que gracias a él es posible conseguirlo todo. Mientras duermes, mi vida se llena de maravillosos recuerdos, y cada nuevo amanecer me cuenta que lo mejor de estar aquí, es saber que poseemos ese regalo. Gracias por llenar mi vida durante y para siempre.

Por lo perdido, lo llorado, y lo sufrido, pero a la vez por lo ganado y lo bueno venidero, es por lo que esto es sólo el principio de mi tesis.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mares y los océanos cubren cerca del 71% de la superficie de la tierra, y están reconocidos como el compartimiento de la biosfera más diverso y, paradójicamente, el menos conocido en términos de la composición específica de sus comunidades y de interacciones entre las diferentes poblaciones. Este desconocimiento es particularmente evidente si consideramos los organismos unicelulares planctónicos de pequeño tamaño (bacterias, fitoplancton y protozoos). De hecho, tanto los conocimientos sobre las especies unicelulares como el número de especies descritas en el medio marino son inversamente proporcionales al tamaño de los organismos y a su localización desde la costa hacia el mar abierto. Este desconocimiento se explica porque las técnicas generalmente empleadas son poco adecuadas para el estudio de organismos que miden sólo algunos micrómetros, porque el mar abierto es de difícil acceso y porque las condiciones que reinan en él son difíciles de reproducir en el laboratorio.

El esquema de la cadena trófica clásica en ecosistemas acuáticos planctónicos, esquematizado por Steele en 1974, consideraba un compartimento productor primario que sintetizaba la materia orgánica (fitoplancton), un compartimento de zooplancton que consumía el anterior, y éste a su vez era consumido por un tercer compartimento: los peces. El paso de fitoplancton (sobre todo diatomeas y dinoflagelados) a zooplancton (sobre todo copépodos) parecía universal y exclusivo. Pero el descubrimiento de otros organismos ha hecho que este simple esquema aumentara su complejidad. Aunque la existencia de microorganismos en los sistemas planctónicos era ya reconocida, no se les había atribuido ningún papel trófico de importancia cuantitativa. Las bacterias eran consideradas como los principales remineralizadores de la materia orgánica perdida en la ruta principal, pero sin participar de forma significativa en los flujos de materia y energía a través del ecosistema. Pronto se vió que la mayor parte de la respiración en el mar se debía a bacterias (Pomeroy 1974, Williams 1981) que la biomasa de las bacterias era comparable a la del fitoplancton y zooplancton (Pedrós-Alió and Brock 1982), y que una parte muy importante de la materia orgánica que sintetizaba el fitoplancton era procesada por el bacterioplancton (Pedrós-Alió and Brock 1982). Por otro lado, el bacterioplancton podía ser depredado por pequeños protozoos, especialmente flagelados heterotróficos, cuya existencia se había ignorado (Fenchel 1982; Sieburth and Davis 1982). A su vez, estos flagelados heterotróficos podían

ser depredados por otros protozoos o bien por el zooplancton de mayor tamaño. Así, en 1983 Azam y colaboradores propusieron la existencia de un bucle microbiano añadido al esquema clásico. En este bucle, una parte importante de la producción primaria fluye a través de bacterias, nanoflagelados y ciliados, hacia el zooplancton (Fig. 1). El descubrimiento de otras interacciones entre microorganismos ha ido haciendo más complejo este esquema, pasando a denominarse red trófica microbiana (Sherr and Sherr 1988).

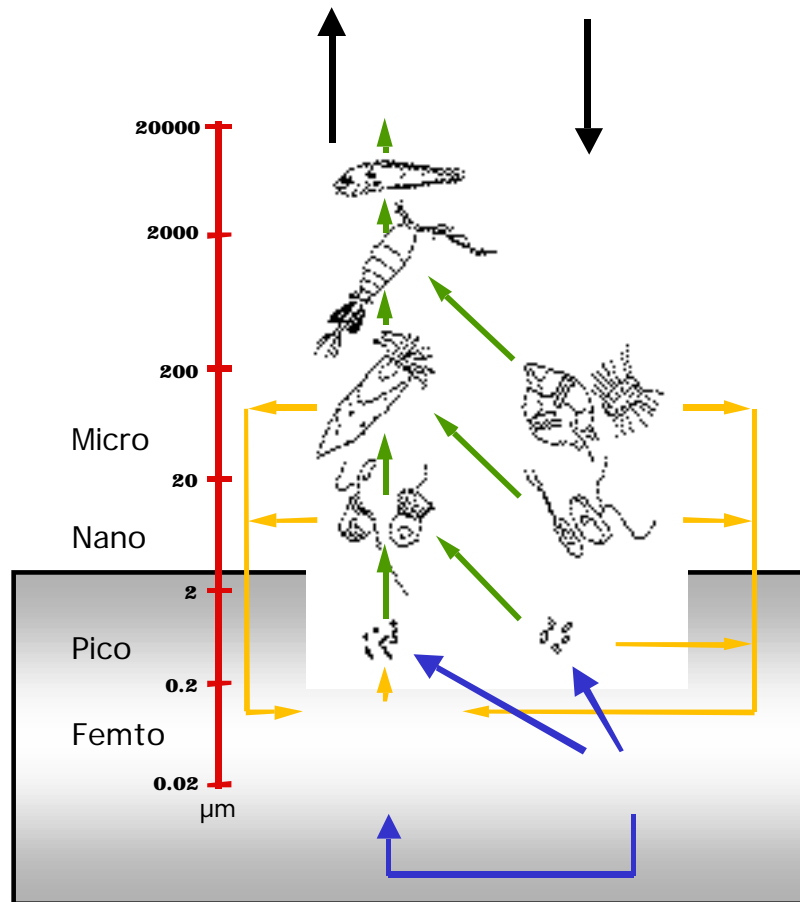


FIG. 1. Presentación esquemática de la red trófica marina incorporando el bucle microbiano a la cadena trófica planctónica clásica. A la izquierda se representan los organismos heterotróficos y la derecha los fototróficos. Los microorganismos están separados por clases de tamaño según Sieburth et al. (1978). A partir de Fenchel (1988).

El tamaño es una propiedad muy útil en la clasificación de los organismos que forman parte de las cadenas tróficas planctónicas. Sieburth et al. (1978) establecieron un sistema claro y lógico, con límites que corresponden a tres órdenes de magnitud en el tamaño de los microorganismos que forman parte del plancton marino: el picoplancton, de 0.2-2 μm ; el nanoplancton, de 2-20 μm ; y el microplancton, de 20-200 μm (Fig. 1). En zonas eutróficas ricas en nutrientes, tales como sistemas costeros o de afloramiento, el fitoplancton tiende a ser abundante y a estar constituido principalmente por células de 10 a 100 micras, fácilmente observables al microscopio. Sin embargo, la mayor parte del mar puede considerarse oligotrófico, incluyendo las regiones centrales de los océanos tropicales y ecuatoriales y mares oligotróficos como el Mediterráneo. En estos sistemas oligotróficos los nutrientes, en particular fósforo, nitrógeno y hierro, son escasos, la biomasa de fitoplancton tiende a ser baja y la producción fotosintética se debe fundamentalmente a organismos autotróficos de algunas micras de diámetro (Li et al. 1983; Herbland et al. 1985; Gieskes and Kraay 1986; Takahashi and Bienfang 1993). Asimismo, se ha puesto en evidencia que en sistemas oceánicos, la mayoría de flagelados heterotróficos tienen un diámetro inferior a 2-3 micras (Sherr et al. 1997; Caron et al. 1999). Por tanto, el término picoplancton (clase de tamaño comprendido entre 0.2 y 2 μm), inicialmente propuesto para englobar las bacterias heterotróficas planctónicas, incluye además a un grupo diverso de organismos eucarióticos.

En la Fig. 2 se pueden ver algunos de los diferentes tipos de organismos que forman el picoplancton, tanto procariontes como eucarióticos. Entre los procariontes (organismos desprovistos de núcleo) encontramos tanto heterotrófos (eubacterias y arqueas), como fototrófos (cianobacterias). Las bacterias heterotróficas planctónicas (con un tamaño entre 0.4 y 1 μm) se encuentran en concentraciones entre 10^5 y 10^6 células por ml en el océano (Sieburth 1978). Las cianobacterias marinas están representadas por dos géneros: *Synechococcus* y *Prochlorococcus*. *Synechococcus* (con un tamaño entre 0.8 y 1.5 μm) presentan abundancias entre 10^3 y 10^4 células por ml (Johnson and Sieburth 1979), y *Prochlorococcus* (alrededor de 0.6 μm), entre 10^4 y 10^5 células por ml (Chisholm et al. 1988). Los *Synechococcus* poseen zeaxantina como principal pigmento accesorio, además de la clorofila *a*. Las células del género *Prochlorococcus* poseen un contenido pigmentario singular, caracterizado por un nuevo tipo de clorofilas descritas como divinil-clorofilas *a* y *b*, mientras que la clorofila *a* parece ausente. Estos microorganismos son difíciles de ver mediante microscopía de epifluorescencia, lo que explica su tardío descubrimiento gracias a la aplicación de la citometría de flujo (Chisholm et al. 1988).

Los eucariontes del picoplancton, que incluye organismos tanto fototróficos como heterotróficos dotados de núcleo, aparecen con una abundancia entre 10^2 y 10^4 células por ml (Johnson and Sieburth 1982). Los picoeucariontes constituyen un grupo de gran diversidad, y poseen clorofila *a* en todos los representantes autotróficos, además de pigmentos accesorios tales como clorofilas *b*, *c1*, *c2*, *c3*, Mg-DVP y carotenoides (fucoxantina, peridina, zeaxantina, prasinoxantina, alloxantina, y otros). Aunque la importancia de este grupo de microorganismos se ha ido reconociendo progresivamente, todavía son los grandes desconocidos del plancton. Estos microorganismos han sido el objeto de estudio a lo largo de este trabajo de tesis doctoral.

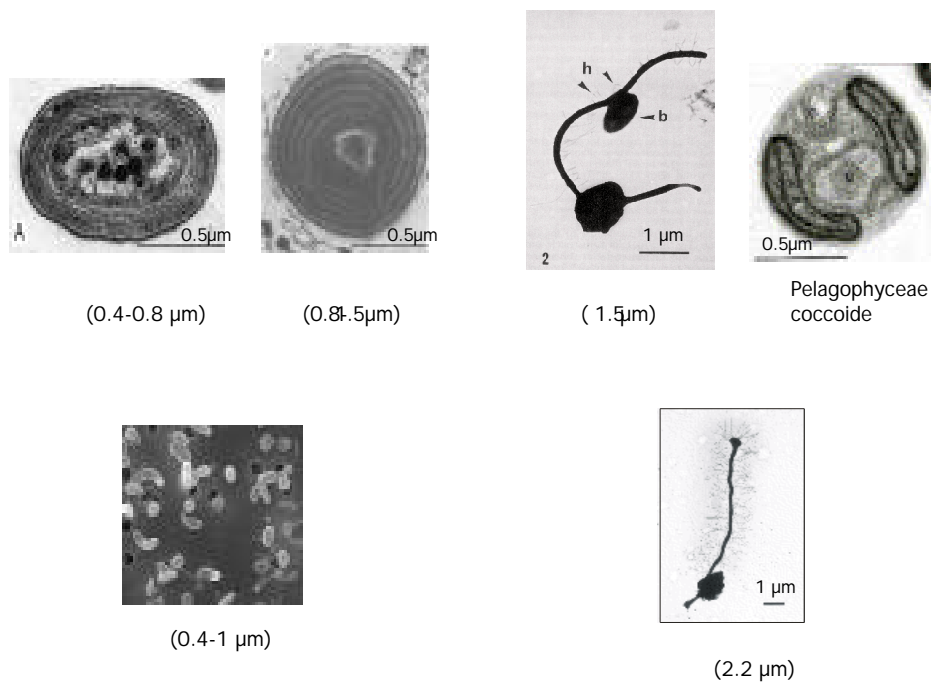


FIG. 2. Ejemplos de microorganismos del picoplancton. Las cianobacterias *Synechococcus* y *Prochlorococcus* son procariontes autotróficos. En la parte inferior izquierda de la Figura aparece un ejemplo de bacterias heterotróficas. *Bolidomonas pacifica* y una *pelagoficea* son ejemplos de picoeucariontes autotróficos, flagelado y cocoide respectivamente. *Picophagus flagellatus* es un ejemplo de picoeucarionte heterotrófico. Fotografías tomadas mediante microscopía electrónica. (PICODIV web page y Guillou et al. 1999a, b).

Ateniéndose a la definición estricta de picoplancton éste incluiría solamente aquellos organismos con tamaños comprendidos entre los 0.2 y 2.0 μm de diámetro (Sieburth et al. 1978). Sin embargo, en la práctica resulta complicado establecer los límites de tamaño, sobre todo el superior, debido a que la metodología de filtración no es perfecta y algunos organismos de tamaño menor que el nominal son retenidos y algunos de tamaño mayor atraviesan los prefiltros. El hecho de que el picoplancton incluya organismos eucarióticos ha hecho plantearse el aumento de este límite superior de tamaño. Algunos autores han utilizado el nombre de "ultraplancton" para designar a todos los organismos del plancton más pequeños de 5 o incluso 10 μm , los cuales tienen en común su difícil identificación mediante microscopía óptica (Wood and Davis 1956; Thronsen 1976; Murphy and Haugen 1985; Platt and Li 1986; Li and Wood 1988; Glover et al. 1988). En el presente trabajo se ha optado por una definición de picoplancton flexible, que englobará a todos los organismos (tanto autotróficos como heterotróficos) retenidos en un filtro de 0.2 μm y que atravesaron previamente filtros de 1.6 μm , 2 μm ó 5 μm de tamaño de poro (Hall and Vincent 1990; Li et al. 1992).

Problemática del estudio del picoplancton eucariótico

Los organismos del picoplancton, incluidos los piceucariontes, presentan, como ya hemos comentado, un problema de identificación debido a su pequeño tamaño. Así, mediante la microscopía óptica muchos de ellos aparecen como pequeñas esferas sin caracteres distintivos (Fig. 3). Los detalles morfológicos de algunas de estas pequeñas células sólo pueden discernirse bajo las mejores condiciones ópticas y a menudo se requiere la observación con microscopio electrónico (Fig. 2) para una identificación fiable (Andersen et al. 1996; Guillou et al. 1999a, b). Pero la microscopía electrónica requiere un gran esfuerzo de tiempo y considerables pérdidas de células durante la preparación de las muestras. De manera que existen verdaderas dificultades para identificar estas pequeñas especies y mucho más para discernir entre varias de ellas si se encuentran juntas en una misma muestra.

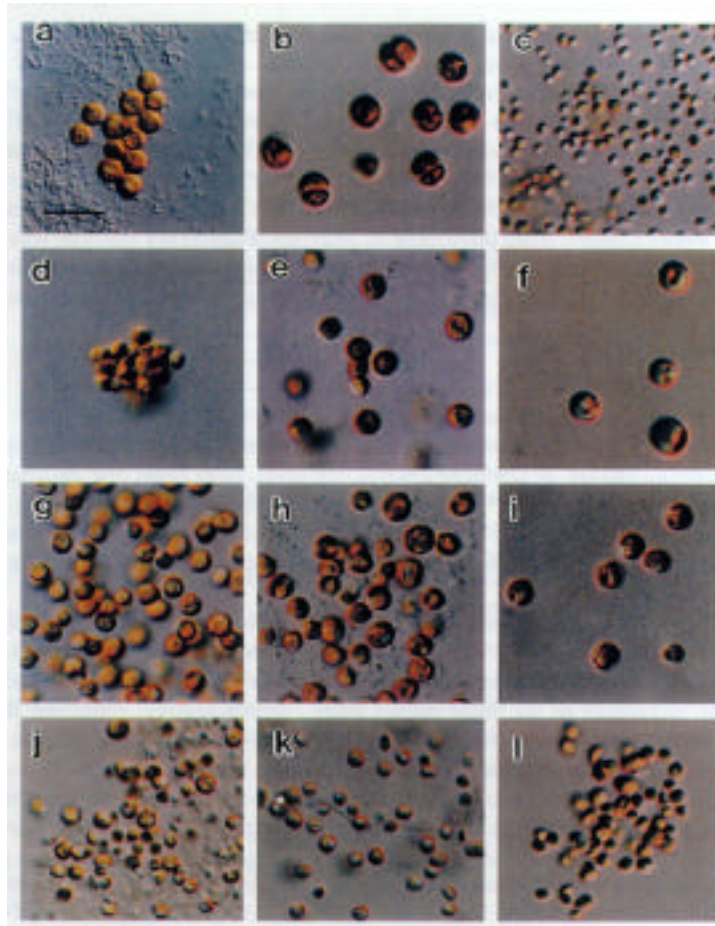


FIG. 3. Fotografías en el microscopio óptico de diferentes cultivos de picroalgas que muestran una remarcable similitud en forma y color de las células (Potter et al. 1997). Escala = 10 μ m. (a, b) primnesiofíceas; (c-e) algas verdes; (f) alga heteroconta no clasificada; (g-j) pelagofíceas; (k-l) eustigmatofíceas.

Un segundo problema es la dificultad para identificar gran parte de estos organismos mediante microscopía debido a la falta de una fijación adecuada de las muestras. Es por ello que las especies que poseen "partes duras" (por ejemplo cocolitos, espinas o esqueleto silíceo) están mejor documentadas (Cros et al. 2000). Los organismos desprovistos de capas duras, debido principalmente a su mala conservación, requieren un examen del material en vivo y un alto grado de familiaridad con las características de un gran número de clases y

órdenes, ya que representan una lista numerosa de especies en las muestras marinas (Thomsen 1986).

El tercer problema para llevar a cabo estudios del picoplancton marino es disponer de una metodología que permita la recolección de gran cantidad de su biomasa separadamente de la fracción de talla mayor. La recolección de las muestras es siempre un paso crucial para los análisis posteriores. La utilización del fraccionamiento por clases de tamaño mediante filtración se ha aplicado en numerosos estudios del picoplancton (Murphy and Haugen 1985; Herbland et al. 1985; Raimbault et al. 1988a, b; Neveux et al. 1989; Veldhuis and Kraay 1990; Giovannoni et al. 1990; Chisholm et al. 1992). Nosotros hemos utilizado un sistema de filtración con una bomba peristáltica (Fig. 4), que nos ha permitido recuperar la fracción picoplanctónica entre 0.2 - 1.6 μm , 0.2 - 2 μm y/o 0.2 - 5 μm dependiendo del lugar y tipo de estudio planeado. El uso de diferentes tipos y tamaños de filtros nos permitió, además, estudiar con más detalle la estructura de tamaños del picoplancton eucariótico. Pero la separación de células en fracciones de tamaño por filtración es inexacta. La eficiencia de filtración de una determinada población de microorganismos se ve influenciada por la presión de filtración, la biomasa de toda la comunidad, y la forma de las células y su flexibilidad. Es posible limitar el sesgo debido a la presión para evitar la desintegración de las células y el error debido a la concentración limitando el volumen filtrado. Pero los errores debidos a la forma y flexibilidad de las paredes de las células no pueden controlarse, y siempre algunas células de tamaño superior al esperado pasan a través de los prefiltros.

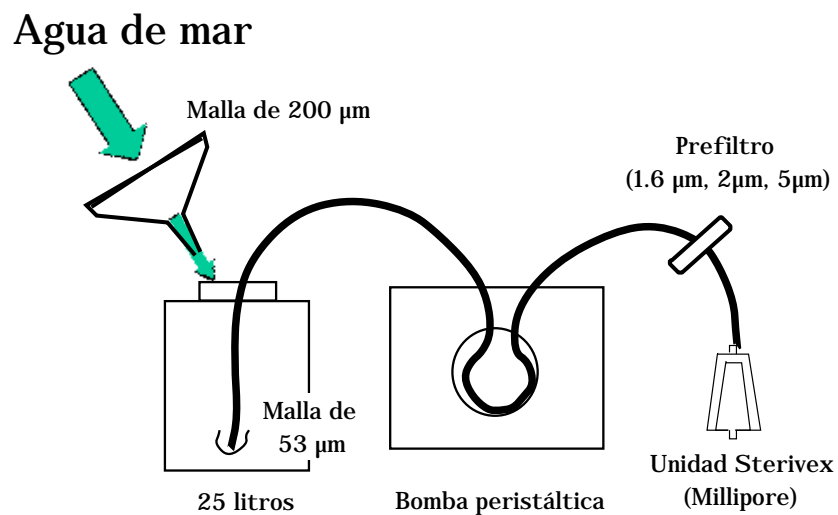


FIG. 4. Esquema de la recolección del picoplancton por fraccionamiento de tamaño.

Finalmente, el aislamiento en cultivo puro es sin duda el mejor camino para caracterizar las especies que forman una comunidad natural. Sin embargo, es conocido que muchas especies no se han podido hacer crecer en cultivo. Además, algunos organismos muy representados en enriquecimientos y que pueden crecer muy bien en cultivo, son muy poco abundantes en el medio natural (Lim et al. 1999; Guillou et al. 1999c). Por lo tanto, este método no puede informar acerca de qué poblaciones son dominantes en la comunidad.

El picoplancton eucariótico en el ambiente marino

Del diverso conjunto de organismos que forman el picoplancton, los eucariontes son los menos conocidos y no por ello los menos importantes. Butcher (1952) fue uno de los primeros en resaltar la importancia ecológica de las especies fitoplanctónicas de talla inferior a 10 μm , y describió la primera microalga de talla inferior a 2 μm , *Chromulina pusilla*. En 1960, Manton y Parke introdujeron la microscopía electrónica de transmisión y reclasificaron *Chromulina pusilla*, descrita como un alga marrón por Butcher, como un alga verde que pasó a llamarse *Micromonas pusilla*. Hoy en día se sabe que todos los ecosistemas marinos poseen organismos planctónicos de talla inferior a 5 μm . La importancia numérica y ecológica de estos pequeños eucariontes fue reconocida más claramente a partir de los estudios de Johnson y Sieburth (1982) gracias a la utilización de microscopía electrónica en muestras naturales de un estuario y del Océano Atlántico. La utilización de técnicas tales como la microscopía de epifluorescencia (Waterbury et al. 1979; Johnson and Sieburth 1979; Porter and Feig 1980; Li et al. 1983; Li and Wood 1988; Glover et al. 1988), el análisis de pigmentos por HPLC a partir de ciertos pigmentos accesorios que pueden considerarse como marcadores de algunos de los grupos del picoplancton (Gieskes and Kraay 1986; Hooks et al. 1988), y la microscopía electrónica (Johnson and Sieburth 1982; Takahashi and Hori 1984), han permitido estimar la importancia relativa del picoplancton eucariótico en medios oceánicos y han permitido a menudo su identificación.

Pero ha sido sobre todo la citometría de flujo la que ha permitido una más exhaustiva estimación de la abundancia y distribución del picoplancton autotrófico en el ambiente marino (Olson et al. 1985, 1988; Li and Wood 1988; Platt 1989; Yentsch and Horan 1989; Li et al. 1992; Li 1994; Simon et al. 1994). Esta técnica permite la cuantificación de cianobacterias

(*Prochlorococcus* y *Synechococcus*) y de piceucariotes, que pueden ser distinguidos por su diferente talla y fluorescencia (Fig. 5).

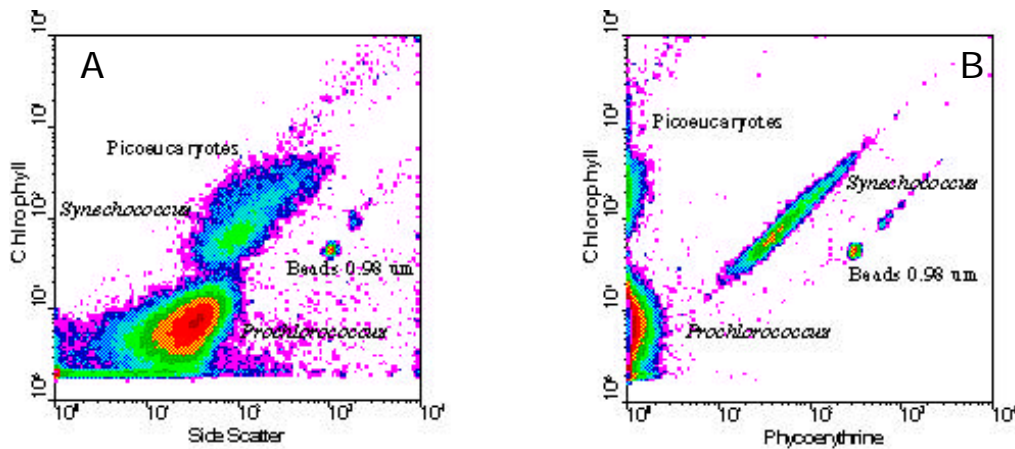


FIG. 5. Representación típica de una muestra oceánica procesada por citometría de flujo, en la que se distinguen tres grupos de organismos fototróficos del picoplancton: *Prochlorococcus*, *Synechococcus* y piceucariotes. (A) Número de organismos en función de su tamaño (side scatter) y su clorofila. (B) *Prochlorococcus*, *Synechococcus* y piceucariotes pueden ser distinguidos en función de la fluorescencia de sus pigmentos. Por ejemplo, *Synechococcus* se caracteriza por la doble fluorescencia de sus pigmentos: naranja por su ficoeritrina y rojo por su clorofila. (PICODIV web page).

Finalmente, el desarrollo de las técnicas moleculares a partir de los años 80 ha ofrecido una alternativa para abordar el estudio de la diversidad y distribución ecológica de grupos de microorganismos marinos. El objeto principal de esta tesis doctoral ha sido, precisamente, la evaluación de la composición en especies, abundancia, y distribución del picoplancton eucariótico con la ayuda de buena parte de estas técnicas moleculares.

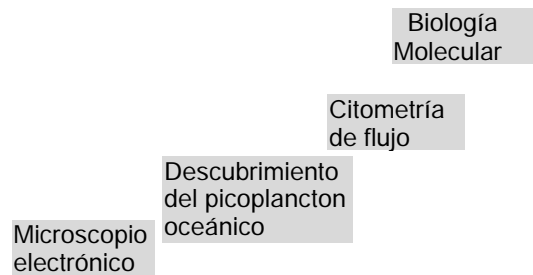
Diversidad del picoplancton eucariótico en cultivo

Los avances en distintas disciplinas, tales como la historia natural, la botánica, la zoología, la biología molecular o la microbiología, han contribuido a la descripción e identificación de especies del picoplancton eucariótico marino. El número de especies descritas está

aumentando exponencialmente en los últimos años, a menudo gracias a la aplicación de nuevas técnicas (Fig. 6).

Los picoeucariontes: un reservorio de especies nuevas

Número de especies
descritas



Análisis cronológico de la descripción de los picoeucariontes

*descripción de nuevas clases de algas

FIG. 6. Análisis cronológico de la descripción de los picoeucariontes. Se destaca con un asterisco la descripción de nuevas clases de algas.

La mayoría de las clases de algas unicelulares, distribuidas por todo el árbol filogenético de los eucariontes (Fig. 7), incluyen representantes picoeucarióticos: Heterokonta (Bolidophyceae, Pelagophyceae, Chrysophyceae, Eustigmatophyceae), Haptophyta (Prymnesiophyceae), Chlorophyta (Pedinophyceae, Prasinophyceae, Chlorophyceae/Trebouxiophyceae). En la Tabla 1 se presenta una lista de las especies actualmente descritas de picoeucariontes tanto auto- como heterotróficos actualizada a partir de Simon (1994).

TABLA 1. Relación de especies de picoeucariontes descritos hasta la fecha. Los asteriscos muestran los casos en que además de la especie se describió una nueva clase.

Clase	Especie	Talla (µm)	Referencia
Chlorophyceae/	<i>Chlorella nana</i>	1.8-2.6	Andreoli et al. 1978
Trebauphyceae	<i>Nannochloris eukaryotum</i>	1.8-2.6	Wilhelm et al. 1982
	<i>Nannochloris atomus</i>	1.5-4	Butcher 1952
	<i>Nannochloris maculata</i>	1.5-4	Butcher 1952
Prasinophyceae	<i>Micromonas pusilla</i>	1-1.5	Manton and Parke 1960
	<i>Mantoniella squamata</i>	3-5	Dasikachary 1972
	<i>Pseudoscourfeldia marina</i>	2-3	Manton 1975
	<i>Pycnococcus provasolii</i>	1-4	Guillard et al. 1991
	<i>Bathycoccus prasinos</i>	1.5-2.5	Eikrem and Throndsen 1990
	<i>Ostreococcus tauri</i>	0.8	Courties et al. 1994
	<i>Prasinoderma coloniale</i>	2.5-5.5	Hasegawa et al. 1996
	<i>Dolichomastix tenuilepis</i>	3-4.5	Throndsen and Zingone 1997
Pedinophyceae	<i>Resultor mikron*</i>	2-4	Moestrup 1991
	<i>Marsupiomonas pelliculata</i>	2.3-3	Jones et al. 1994
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis aculata</i>	1.5-4	Droop 1955
	<i>Nannochloropsis salina*</i>	1.5-4	Hibberd 1981
	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	2.5-5	Lubian 1982
	<i>Nannochloropsis granulata</i>	2-4	Karlson et al. 1996
	<i>Nannochloropsis limnetica</i>	2.5-4.5	Krienitz et al. 2000
Prymnesiophyceae	<i>Imantonia rotunda</i>	2.4	Reynolds 1974
	<i>Phaeocystis jahnii</i>	3.5-5	Zingone et al. 1999
	<i>Phaeocystis cordata</i>	3.2-3.8	Zingone et al. 1999
Pelagophyceae	<i>Pelagococcus subviridis</i>	2.5-5.5	Lewin et al. 1977
	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	2-4	Sieburth et al. 1988
	<i>Pelagomonas calceolata*</i>	1.3-3	Andersen et al. 1993
	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	2.5-5	De Yoe et al. 1997
Bolidophyceae	<i>Bolidomonas pacifica*</i>	1.5	Guillou et al. 1999a
	<i>Bolidomonas mediterranea</i>	1.5	Guillou et al. 1999a
Chrysophyceae	<i>Tetraparma pelagica</i>	2.2-4.7	Booth and Marchant 1987
	<i>Picophagus flagellatus</i>	2.2-3.2	Guillou et al. 1999b
Bicosoecids	<i>Siluania monomastiga</i>	1.5-3	Karpov et al. 1998
	<i>Symbiomonas scintillans</i>	1.5	Guillou et al. 1999b

En la última década se ha producido un considerable incremento en el descubrimiento de nuevas formas de vida en los océanos, incluyendo la descripción muy reciente de clases totalmente nuevas, basadas en cultivos de picoeucariontes. Entre los trabajos más recientes podemos destacar a Moestrup (1991), que describió la clase Pedinophyceae, Andersen et al. (1993) que describieron la clase Pelagophyceae y Guillou et al. (1999a) que describieron la clase Bolidophyceae (Tabla 1). Más sorprendente todavía, fue el descubrimiento del picoeucarionte más pequeño conocido, *Ostreococcus tauri* (0.8 μm de diámetro), dominante en la laguna costera de Thau (Courties et al. 1994).

La mayor parte de las especies del picoeucariontes descritos son autotróficos. Sin embargo, se pueden encontrar algunos ejemplos de especies de picoeucariontes heterotróficos sobre todo en el grupo de los estramenópilos. Los estramenópilos forman un grupo monofilético extremadamente diverso, que incluye algas unicelulares (heterocontas), organismos unicelulares previamente considerados hongos (oomicetes y labirintúlidos) y flagelados heterotróficos (bicosoécidos) (Fig. 7). Las relaciones filogenéticas obtenidas a partir de secuencias del rDNA 18S, sugieren que los estramenópilos eran inicialmente heterotróficos, y en cierto momento de la evolución algunos de ellos adquirieron cloroplastos a través de una endosimbiosis secundaria, dando lugar al grupo de las algas heterocontas (Leipe et al. 1996). Algunos grupos de estramenópilos, como los Bicosoécidos ya cuentan con algún representante picoplanctónico descrito, como es *Symbiomonas scintillans* (Guillou et al. 1999b). Dentro de los heterocontas autotróficos también existe algún representante picoplanctónico heterotrófico descrito como es *Picophagus flagellatus* perteneciente a la clase Chrysophyceae (Guillou et al. 1999b). En este caso, la pérdida de los cloroplastos dio lugar a este organismo heterotrófico.

Finalmente, se han descubierto secuencias pertenecientes a dinoflagelados, diatomeas, coanoflagelados, estramenópilos o cercomonadales que están ampliamente distribuidas en el ambiente marino. Es muy probable que organismos pertenecientes a estos grupos, todavía por descubrir y describir, puedan tener talla picoplanctónica (Díez et al. 2001a; Moon-van der Staay et al. 2001, López-García et al. 2001).

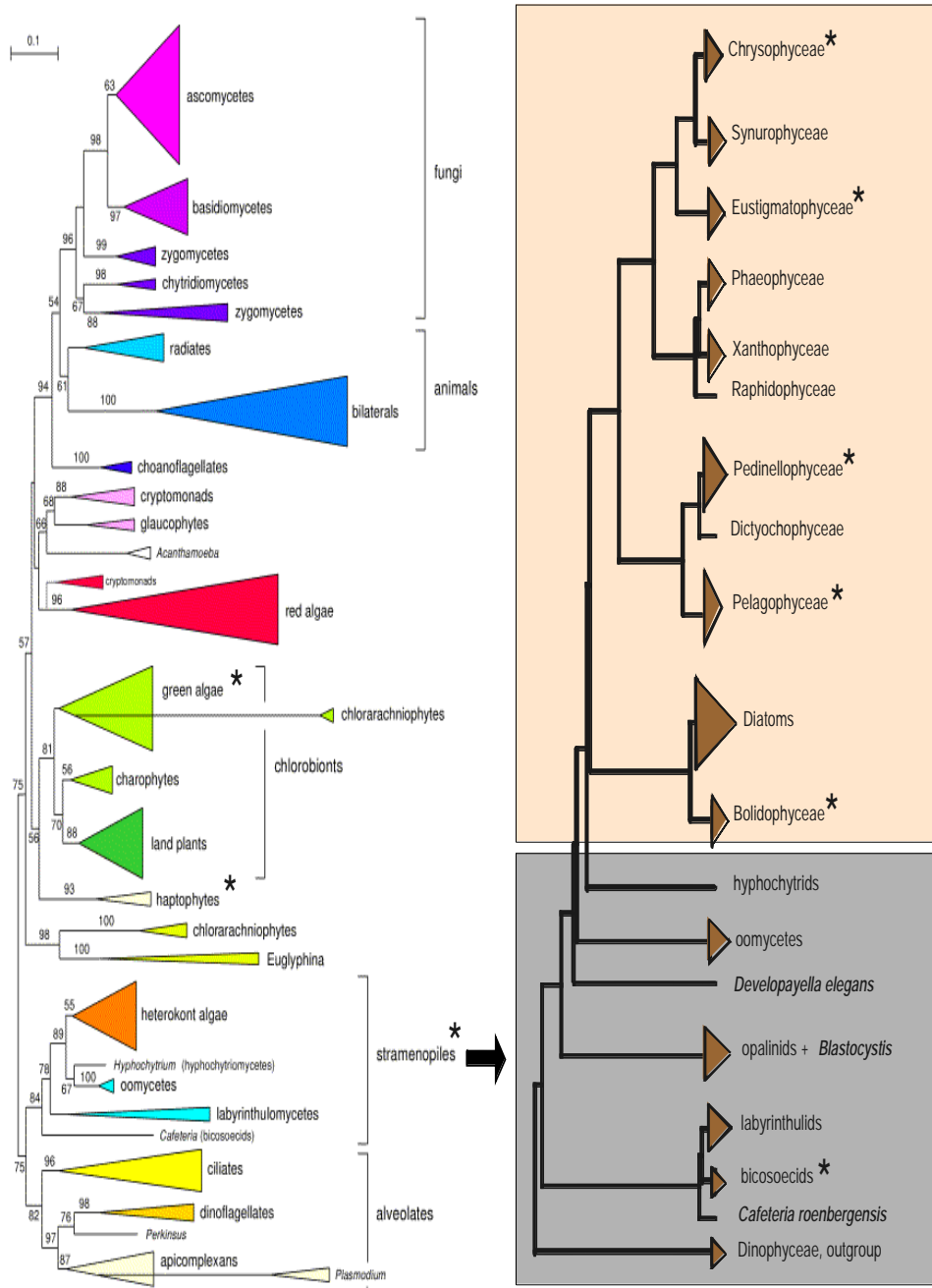


FIG. 7. Árbol filogenético de todos los organismos eucarióticos construido a partir del gen rRNA 18S. El grupo de los estramenópilos está detallado, con los grupos heterotróficos marcados en gris y los fototróficos en rosa. Los grupos marcados con un asterisco incluyen representantes conocidos de piceucariotes, con referencia a la Tabla 1 de este capítulo .

Una nueva clasificación de los seres vivos a partir de criterios moleculares

Antes del comienzo del desarrollo de los métodos moleculares, los seres vivos se agrupaban en 5 reinos: animales, plantas, hongos, protistas ("protozoos") y moneras ("bacterias") (Whittaker 1969). Woese y Fox en 1977 fueron los pioneros en el estudio de la evolución filogenética mediante la comparación de los genes RNA ribosómicos, y fue en 1990 cuando Woese y colaboradores presentaron un modelo filogenético que revolucionó todos los esquemas taxonómicos clásicos (Fig. 8). Según este esquema, todos los seres vivos se clasificaban en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*.

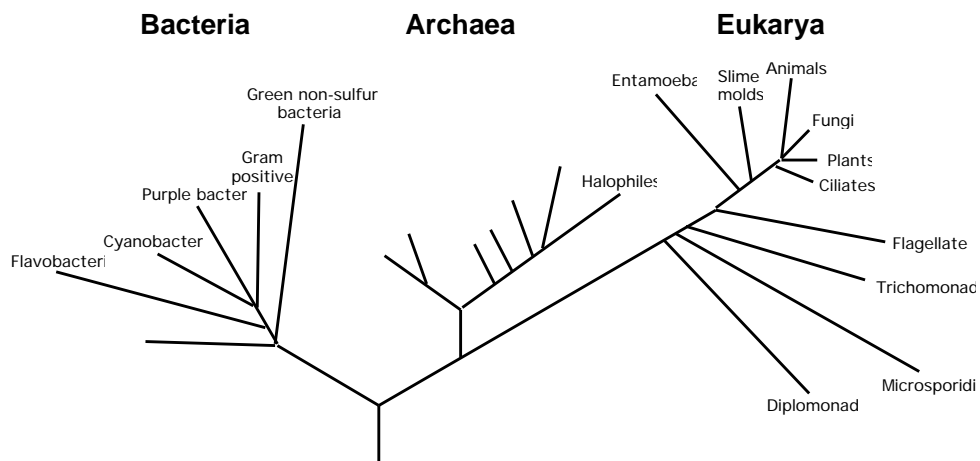


FIG. 8. Clasificación de los seres vivos en tres dominios según el modelo filogenético basado en secuencias del gen rRNA descrito por Woese et al. (1990).

El uso del rRNA ribosómico como cronómetro molecular ha permitido el análisis de las relaciones evolutivas entre los organismos a través del estudio comparativo de las secuencias de este gen. Así, cambios en la secuencia del rDNA pueden reflejar las historias evolutivas de los diferentes organismos. Los RNA ribosómicos han sido los cronómetros moleculares más utilizados (Woese 1987; Stackebrandt and Goodfellow 1991) ya que están

presentes en todas las células vivas, e incluyen ciertas zonas muy conservadas en todos los organismos, y otras más variables con las que diferenciar distancias filogenéticas menores (Maidak et al. 1994; Van de Peer et al. 1997). En concreto, los ribosomas de eucariontes sedimentan como partículas de tamaño 80S. Los genes que codifican las proteínas y los rRNA (5.8S, 18S y 28S) están ubicados en uno o varios operones (hay que decir que los eucariontes poseen un cuarto rRNA, el 5S cuyo gen no está incluido en un operón). Entre los tres rRNA incluidos en operones, el 18S, que se encuentra en la subunidad pequeña del ribosoma (SSU rRNA), es el más utilizado en estudios filogenéticos porque tiene un tamaño y una variabilidad suficiente como para permitir una buena distinción entre los diferentes taxones (ver zonas variables en Fig. 9). La secuenciación sistemática de este gen ha permitido grandes avances en la taxonomía de los eucariontes unicelulares. En 1993, Andersen y colaboradores fueron los primeros en describir una nueva clase de algas basándose en un estudio de la ultraestructura celular junto al análisis del rDNA 18S. Este gen es actualmente utilizado como marcador taxonómico, no solamente para ubicar un organismo en una clase (Silberman et al. 1996) o redefinir diferentes filos (Battacharya et al. 1992), sino también para un reconocimiento específico por hibridización *in situ* o el estudio de la diversidad de la comunidad natural, mediante la secuenciación sistemática de este gen. Así, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación sistemática de los RNA ribosómicos (rRNA) de muchos organismos, han creado bases de datos que incluyen miembros de prácticamente todos los grupos conocidos. En Junio del 2001, el RDP ("Ribosomal Database Project"; <http://rdp.cml.msu.edu/html/>) alcanzaba las 15.104 secuencias de bacterias, 1.173 de arqueas y 5.186 de eucariontes. El disponer de una base de datos proporciona una herramienta de identificación poderosa que suministra un valor de similitud de cualquier secuencia ambiental, con respecto a los organismos previamente incluidos en la base de datos. La PCR amplifica el gen elegido hasta un nivel en el que resulta viable su secuenciación, o su caracterización por cualquier otra técnica (RFLP, DGGE, T-RFLP, etc). La posibilidad de combinar estas técnicas está permitiendo conocer la abundancia, composición y distribución de diferentes poblaciones de organismos en su hábitat natural.

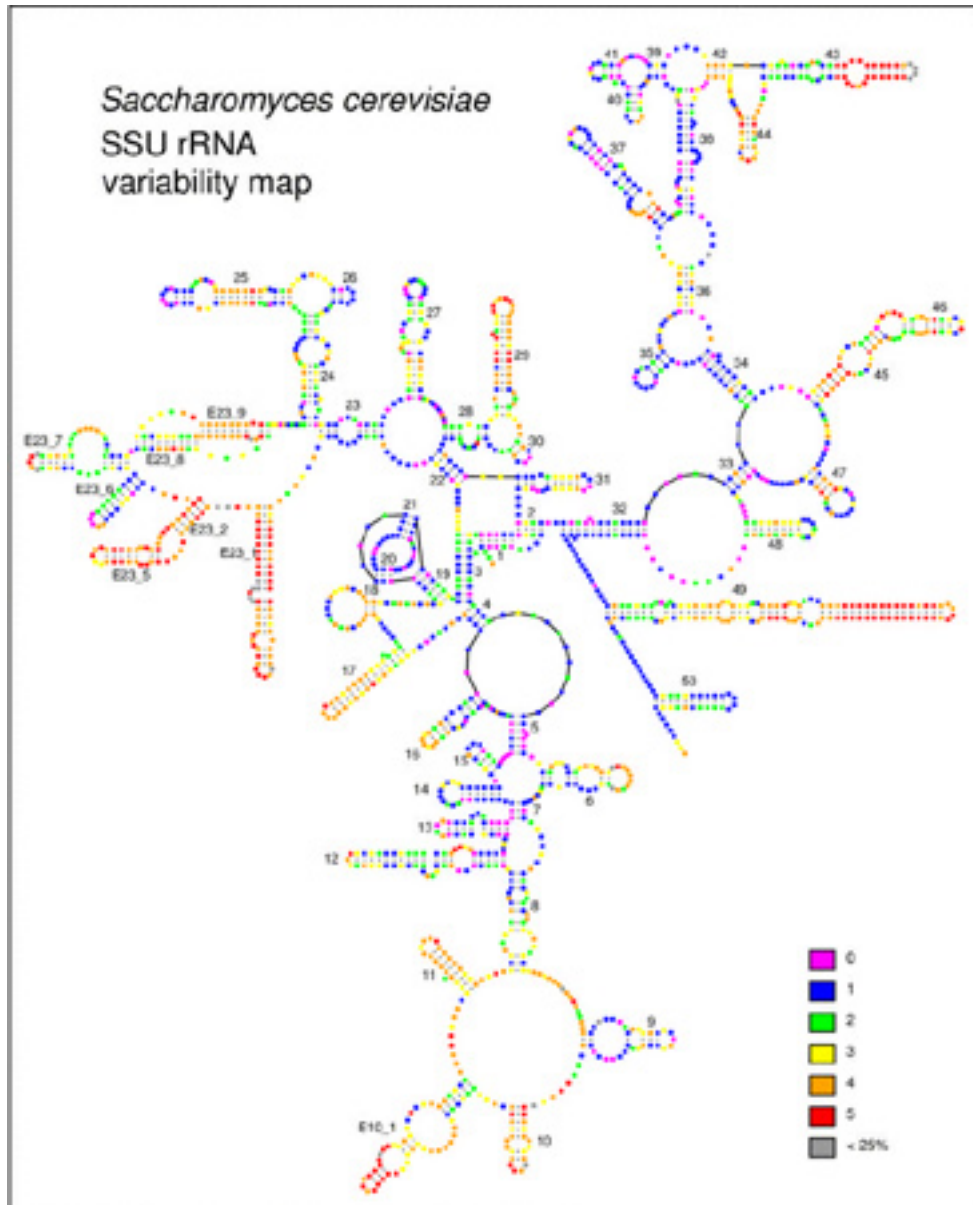


FIG. 9. Modelo de la estructura secundaria del rRNA 18S de *Saccharomyces cerevisiae* que incorpora la variabilidad de la molécula considerando todas las secuencias de eucariontes. Los nucleótidos se representan en 5 clases de variabilidad, desde muy conservados (azul) hasta muy variables (rojo) como viene indicado en la leyenda. Las posiciones idénticas en todos los organismos están indicadas en color púrpura. En gris se marcan las posiciones que poseen deleciones en más de un 25% de los organismos o en las cuales el alineamiento no es fiable y que no se han tenido en cuenta. Este mapa de variabilidad fue publicado por Van de Peer et al. (1997).

Adaptación de técnicas moleculares al estudio de la diversidad en ambientes marinos

Las técnicas moleculares han sido desarrolladas por numerosos equipos de científicos que han buscado la forma de identificar los microorganismos que componen las comunidades naturales (Amann et al. 1995; Partensky et al. 1997; Pace 1997). Los primeros estudios, realizados con procariontes, pusieron en evidencia un gran número de secuencias nuevas que jamás antes habían sido referenciadas en los bancos de datos (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990; DeLong 1992; Fuhrman et al. 1992). Posteriores estudios realizados en ambientes geográficamente alejados han permitido identificar muchas secuencias filogenéticamente próximas a aquellas ya observadas en estudios anteriores (Fuhrman et al. 1993; DeLong et al. 1994; Rappé et al. 1997; Suzuki et al. 1997; Acinas et al. 1999; Massana et al. 2000). Algunas de estas secuencias forman parte de linajes con organismos disponibles en cultivos puros, pero también se han recuperado otras secuencias menos representadas y/o conocidas, algunas de ellas pertenecientes a linajes que no tienen todavía ningún representante cultivado, como son el grupo SAR11 dentro de la subdivisión - Proteobacteria o el grupo I y grupo II de arqueas marinas. Estas nuevas secuencias han pasado a formar parte de los bancos de datos y quedan disponibles para futuros estudios. Todos estos resultados confirman que en el medio natural existe una gran diversidad de especies aún no cultivadas.

Por otro lado, algunos trabajos recientes han demostrado que con aproximaciones novedosas todavía es posible aislar nuevas especies en cultivos puros, lo que puede indicar que todavía quedan muchas especies cultivables por descubrir (Suzuki et al. 1997; Pinhassi et al. 1997). La posibilidad de que una especie pueda crecer en cultivo depende de nuestra capacidad para recrear en el laboratorio sus condiciones óptimas de crecimiento. En consecuencia, es de esperar que la elaboración de nuevos medios y condiciones de cultivo permitan el aislamiento de nuevas especies no aisladas por los métodos clásicos (Schut et al. 1993; González and Moran 1997; Button et al. 1998). Aunque los métodos moleculares permiten el análisis de la diversidad de las comunidades naturales y la detección de especies no cultivables, el aislamiento en cultivo puro resulta todavía imprescindible para poder describir y caracterizar estas nuevas especies. Es por tanto necesario poner esfuerzo en los métodos de aislamiento con el fin de comprender la fisiología y la ecología de los microorganismos marinos.

Los métodos moleculares que permiten el análisis de la diversidad taxonómica de las comunidades naturales (Fig. 10) pueden agruparse en dos categorías diferentes. Los métodos "destructivos", como su nombre indica, están basados en la destrucción de las células con el fin de extraer los ácidos nucleicos. Estos métodos, tales como análisis filogenéticos mediante clonación y secuenciación de genes rRNA (Pace et al. 1986; Giovannoni et al. 1990; DeLong 1992), hibridación cuantitativa del rRNA mediante "Dot-Blot" (Stahl et al. 1988), hibridación DNA/DNA (Lee and Fuhrman 1991), medidas de reasociación del DNA (Torsvik et al. 1990) y técnicas de "fingerprinting" como "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE) (Muyzer et al. 1994; Van Hannen et al. 1998), y "Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism" (T-RFLP) (Liu et al. 1997; Clement et al. 1998; Marsh 1999; Moeseneder et al. 1999), permiten obtener una visión general y semi-cuantitativa de la diversidad genética de una comunidad natural.

Los métodos "no destructivos", por su parte, permiten la cuantificación de la proporción de células pertenecientes a ciertos taxones en una comunidad sin necesidad de una extracción previa de sus ácidos nucleicos. Esta aproximación está basada en la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) con posterior observación de los microorganismos positivos mediante microscopía (Giovannoni et al. 1988; DeLong et al. 1989; Lim et al. 1993; Fuhrman and Ouverney 1998) o mediante citometría de flujo (Simon 1995; Lange et al. 1996). El principal inconveniente de los métodos no destructivos es que sólo permiten detectar y cuantificar aquellos organismos que ya sabemos previamente que están presentes en la comunidad. Si queremos averiguar cuáles son los organismos que habitan en un medio, resulta imprescindible recurrir a los métodos destructivos. Ambos tipos de métodos aportan resultados complementarios y con frecuencia se usan en combinación para analizar la estructura y la dinámica de las comunidades naturales (Fig. 10). En esta tesis doctoral se han utilizado diferentes métodos moleculares, todos ellos pertenecientes al grupo de los "destructivos" que serán comentados detalladamente a continuación.

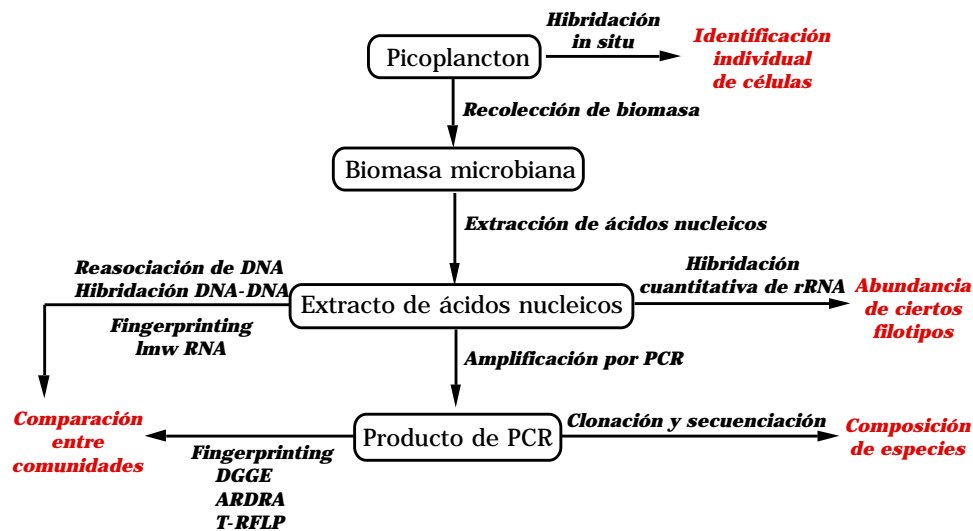


FIG. 10. Relación de algunas de las técnicas moleculares disponibles para el estudio de la diversidad genética del picoplancton.

Clonación y secuenciación de rDNA de muestras naturales

El principal método aplicado al análisis de la diversidad taxonómica de las comunidades naturales está basado en la clonación y secuenciación de los genes del RNA ribosómico extraídos directamente del medio. Pace et al. (1986) y Olsen et al. (1986) fueron los primeros en aplicar las técnicas moleculares en estudios de diversidad de comunidades microbianas naturales. En un principio, estas técnicas se basaban en la extracción y digestión del DNA total, clonación de dichos fragmentos en el bacteriófago ("shotgun cloning"), "screening" mediante hibridación con sondas específicas del rRNA 16S para detectar la presencia de los clones que contengan dichos genes y secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas Schmidt et al. (1991) fueron los primeros en aplicar esta técnica a una muestra de picoplancton marino (concretamente en bacterias), obteniendo numerosas secuencias con muy baja homología con las secuencias de microorganismos cultivados. El inconveniente del "shotgun cloning" es que es muy laborioso debido a que los genes ribosómicos sólo se encuentran en una pequeña fracción del total de clones de la biblioteca, pero proporciona una buena estimación real de la diversidad de una comunidad de microorganismos con un mínimo de pasos que pudieran sesgar la detección y abundancia relativa de los genes de los diferentes organismos.

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simplificó el proceso de selección de los diferentes filotipos, permitiendo la amplificación de los genes rRNA directamente del DNA obtenido de una comunidad. Dichos genes se pueden clonar con facilidad, resultando en una biblioteca cuyos clones tienen todos el gen de interés. La composición de la biblioteca de clones dependerá de la especificidad de los cebadores y de la eficiencia con la cual los genes rRNA sean amplificados y clonados. Para poder obtener toda la información sobre todos los filotipos presentes en la comunidad sería necesario secuenciar todos los clones. Pero este proceso puede simplificarse mediante el "screening" de los clones de la biblioteca, de manera que los clones idénticos (o muy parecidos) pueden agruparse en OTUs (Operational Taxonomic Unit). Quizás la técnica de "screening" más utilizada es el análisis de restricción por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Britschgi and Giovannoni 1991; DeLong et al. 1993). La diferencia en la secuencia de los distintos clones es detectada mediante el uso de enzimas de restricción (endonucleasas) que reconocen y cortan en secuencias específicas de 4-8 pares de bases. Los productos de la digestión con una o varias enzimas de restricción son separados mediante electroforesis en geles de agarosa. Los patrones de fragmentos pueden ser comparados directamente y los clones con un mismo patrón de RFLP (es decir, mismo tamaño de fragmentos de DNA) son agrupados y considerados como miembros del mismo OTU (véase **Cap. 2**).

Una vez agrupados los clones en OTUs, un clon representativo de cada OTU es secuenciado, a partir del plásmido o vector que contiene el inserto de DNA o bien a partir del producto de PCR obtenido a partir de dichos plásmidos. Las secuencias obtenidas son comparadas con otras obtenidas en trabajos anteriores y depositadas en una base de datos. Las bases de datos más conocidas son el GenBank, en The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que contiene todas las secuencias de DNA disponibles de cualquier gen y cualquier organismo, y el Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>), que contiene exclusivamente secuencias alineadas del gen SSU rRNA (Maidak et al. 2000). Las nuevas secuencias se colocan dentro de un árbol filogenético en función de su afiliación con las secuencias de referencia. Con esta aproximación es posible explorar de una manera bastante robusta las relaciones filogenéticas de las poblaciones presentes en el medio natural.

La creación de bases de datos de secuencias de rDNA está creciendo rápidamente en todos los niveles taxonómicos y grupos de organismos, lo que es de gran ayuda para posteriores estudios filogenéticos. Por otro lado, el análisis de estas secuencias es cada día más sencillo gracias a algoritmos informáticos que nos permiten alinearlas con facilidad. Así, están ya a

nuestra disposición páginas web para alinear secuencias, obtener relaciones filogenéticas y programas para editar datos y crear árboles filogenéticos.

Análisis global de la comunidad (DGGE y T-RFLP)

El estudio de la dinámica de las comunidades naturales requiere el análisis de un elevado número de muestras. Para obtener una visión global de la diversidad genética de las comunidades naturales a lo largo del tiempo o a las escalas espaciales habitualmente estudiadas en oceanografía, existen métodos alternativos que no requieren los pasos de clonación y secuenciación. Estas técnicas se denominan en general de "fingerprinting", y como se muestra en la Fig. 10 existe una gran variedad de ellas. En todas ellas la primera etapa se basa en la extracción de los ácidos nucleicos y la mayoría tienen en común también que requieren la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero las etapas siguientes permiten la discriminación de los filotipos presentes en la muestra analizada por sistemas distintos. Esta discriminación se efectúa a partir de los patrones de migración electroforética realizada en geles de poliacrilamida. Cada una de estas técnicas está basada en una de las propiedades inherentes a los genes amplificados, tales como el tamaño (Length Heterogeneity-PCR, LH-PCR, Suzuki et al. 1998; Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA), la variabilidad de secuencia en los sitios de restricción (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP, Liu et al. 1997), o la secuencia de bases A-T y G-C en el interior de la molécula (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE, Muyzer et al. 1993; Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE, Muyzer and Smalla 1998). Las técnicas de "fingerprinting" proporcionan, pues, en un patrón de bandas que caracteriza la composición de la comunidad y permite una comparación rápida entre ellas.

La DGGE y la T-RFLP fueron las técnicas elegidas para llevar a cabo el análisis global de la comunidad de picoplancton eucariótico en este trabajo. La DGGE permite la separación de fragmentos de DNA de idéntica longitud pero que tienen diferente secuencia. Esta técnica ha sido utilizada en el estudio de la distribución de las poblaciones bacterianas en el mar (Moeseneder et al. 1999; Murray et al. 1996; Riemann et al. 1999; Schauer et al. 2000). La primera aplicación de la DGGE para detectar genes rRNA 18S de eucariontes fue el estudio de un hongo patógeno utilizando cebadores específicos para hongos (Kowalchuk et al. 1997). Algunos estudios recientes han utilizado la DGGE aplicada al estudio de toda la comunidad de eucariontes para analizar los cambios temporales de la diversidad dentro de un bioreactor (Marsh et al. 1998), comparar la comunidad de diferentes lagos (Van Hannen et

al. 1998), o describir el desarrollo de las poblaciones de eucariontes en un mesocosmos (Van Hannen et al. 1999). Pero hasta el momento, ningún estudio había aplicado la DGGE para investigar la comunidad picoeucariótica marina (Caps. 4 y 5).

Por otro lado, la T-RFLP separa los diferentes filotipos basándose en la existencia y posición de determinados sitios de restricción. Al igual que la DGGE, la T-RFLP ha sido extensamente aplicada a los procariontes (Moyer et al. 1996; Liu et al. 1997; Clement et al. 1998) y en particular al estudio del bacterioplancton marino (Moeseneder et al. 1999) y también de los eucariontes (Marsh et al. 1998), pero nunca se había aplicado al estudio del picoplancton eucariótico marino (Cap. 4). Hay que resaltar que en varios de estos estudios se aplicaban ambas técnicas conjuntamente (Marsh et al. 1998; Moeseneder et al. 1999; Cap. 4).

Una ventaja de la DGGE es que resulta posible recuperar un determinado fragmento a partir del gel, reamplificarlo y secuenciarlo directamente (Ferris et al. 1996; Muyzer et al. 1997; Casamayor et al. 2000), pudiendo así aislar e identificar cada una de las bandas que componen el perfil electroforético de la comunidad compleja de partida (Caps. 3, 4 y 5).

Limitaciones intrínsecas de las técnicas moleculares utilizadas

Los métodos moleculares tienen también sus limitaciones. La primera etapa de extracción de los ácidos nucleicos, que consiste en romper las envolturas celulares y obtener exclusivamente el DNA, tiene una eficiencia diferente en función de la resistencia de estas envolturas y por tanto del tratamiento utilizado para lisar las células. La amplificación por PCR, que es uno de los pasos clave de los métodos destructivos, es un proceso con sesgos bien descritos. La selectividad de los cebadores en el proceso de PCR sobre ciertos genes rRNA es un hecho bien conocido (Von Wintzingerode et al. 1997). También el número de copias de los genes rRNA presentes en el genoma puede variar entre especies (Klappenbach 2000) de manera que especies que posean un mayor número de copias serán favorecidas en la amplificación por PCR. Finalmente, los operones rRNA organizados en tándem se amplifican preferentemente frente a los que se encuentran localizados dispersos en el genoma (Farrelly et al. 1995). Todos estos sesgos pueden generar una amplificación preferencial de los genes de determinados organismos. Si la detección e identificación de nuevas especies ha sido relativamente accesible por métodos moleculares, la representatividad o abundancia relativa de cada una de estas especies en la comunidad natural sufre aún de numerosas limitaciones.

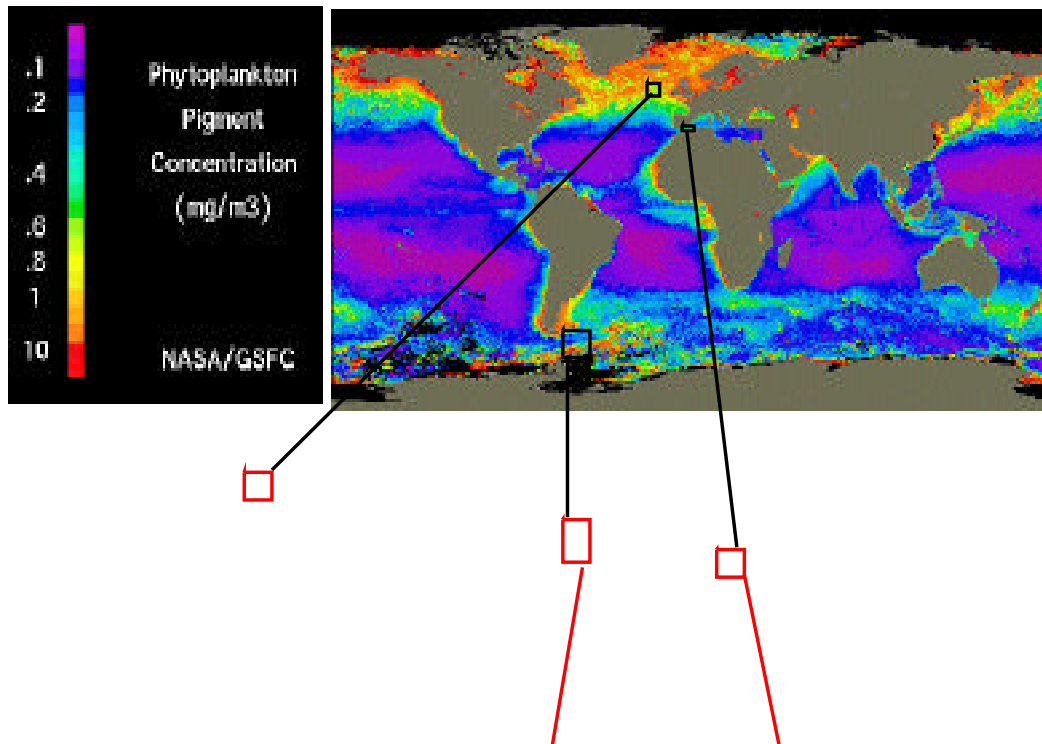
La formación de quimeras es otro proceso bien descrito (Liesack et al. 1991; Wang and Wang 1997) que puede dar lugar a errores en la identificación de organismos a partir de su secuencia. Existen distintos métodos y programas informáticos para detectar la formación de quimeras (Kopczynski et al. 1994; Komatsoulis and Waltherman 1997), aunque estas son difíciles de detectar cuando las secuencias que forman la quimera presentan más de un 85% de similitud entre ellas.

Resultados recientes en el campo de los picoeucariontes

Tras el desarrollo y puesta a punto de nuevas técnicas moleculares durante la última década, se han llevado a cabo con éxito estudios de los microorganismos en el medio natural. El clonado de genes de rRNA a partir de muestras naturales ha llevado al mayor entendimiento de la diversidad del picoplancton procariontico marino y ha revelado que este grupo de organismos esta dominado por linajes nuevos tanto de bacterias (Giovannoni et al. 1990) como de arqueas (DeLong 1992; Fuhrman et al. 1992). Estudios similares sobre el picoplancton eucariótico marino todavía son muy escasos. Tres artículos muy recientes han descrito la diversidad de este grupo mediante el clonado y secuenciado del gen rRNA en una muestra de superficie del Océano Pacífico Ecuatorial (Moon-van der Staay et al. 2001), de varias muestras de profundidad del Océano Glacial Antártico (López-García et al. 2001) y en cinco muestras de superficie del Mediterráneo, el Atlántico Norte y el Océano Glacial Antártico (Díez et al. 2001a, Cap. 2). Dichos estudios muestran que la diversidad filogenética del picoplancton eucariótico es muy elevada y que nuevos linajes aparecen presentes, tal como ocurría con los procariontes. Finalmente, las técnicas de "fingerprinting", como la DGGE y la T-RFLP, también han sido utilizadas para una rápida comparación de la composición de diferentes grupos del plancton eucariótico (Van Hannen et al. 1998; Díez et al. 2001b, Cap. 3).

Ambientes marinos estudiados

En el presente estudio se han muestreado una gran variedad de sistemas, desde mar abierto a zonas costeras, obteniendo muestras que incorporan tanto la variabilidad espacial como la variabilidad temporal de las comunidades del picoplancton eucariótico marino. En la Tabla 2 se recogen las campañas oceanográficas en las que se tomaron muestras (véase también la Fig. 11). Las estaciones y su situación específica serán detalladas a lo largo de los capítulos de este trabajo.



Atlántico Norte

Océano Glacial Antártico

Mar de Alborán

FIG. 11. Reconstrucción del contenido en clorofila en los mares y océanos del mundo a partir de imágenes de satélite. La concentración de la clorofila está representada por un rango de colores, con una concentración creciente desde el violeta hacia el rojo. Las zonas oceánicas en violeta son oligotróficas (océanos tropicales y subtropicales, y la mayor parte del Mar Mediterráneo). Se indican los lugares de muestreo estudiados en el presente trabajo. (NASA/GSFC, <http://seawifs.gsfc.nasa.gov/SEAWIFS.html>).

TABLA 2. Campañas oceanográficas en las que se obtuvieron muestras.

Campaña oceanográfica	Sistema	Situación	Fecha muestreo	Nº muestras analizadas
MATER-97	Mediterráneo	Mar de Alborán	Noviembre 1997	2
MATER-98	Mediterráneo	Mar de Alborán	Mayo 1998	22
MATER-99	Mediterráneo	Mar de Alborán	Septiembre 1999	9
E-DOVETAIL	Antártida	Confluencia Weddell-Scotia	Enero 1998	18
DHARMA	Antártida	Paso de Drake	Diciembre 1998	41
ACSOE NAE	Atlántico Norte	Remolino	Junio 1998	2

Plan de trabajo

El estudio de la diversidad del picoplancton eucariótico marino ha sido llevado a cabo mediante métodos moleculares, a partir de DNA extraído del medio natural. Las técnicas utilizadas en este trabajo serán detalladas en los Capítulos 2, 3, 4 y 5. En cada uno de estos capítulos se planteaban los siguientes objetivos:

Capítulo 2. Obtener información acerca de la diversidad genética de las comunidades que forman el picoplancton eucariótico en diferentes ambientes marinos.

Capítulo 3. Poner a punto la metodología de DGGE aplicada a microorganismos eucarióticos procedentes de cultivos y de muestras naturales marinas.

Capítulo 4. Determinar la variación en distribución y composición del picoplancton eucariótico a lo largo un gradiente latitudinal en la Antártida mediante las técnicas de "fingerprinting" de DGGE y T-RFLP.

Capítulo 5. Estudiar la variabilidad espacial y temporal del picoplancton eucariótico en el Mar de Alborán durante tres campañas diferentes y mediante tres métodos diferentes, DGGE, HPLC y citometría de flujo.