



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE DINOFLAGELADOS TÓXICOS
Y NOCIVOS EN LAS COSTAS DE MÉXICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

ANGÉLICA HERRERA SEPÚLVEDA

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 10 del Mes de febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Desarrollo y evaluación de métodos moleculares para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las costas de México"

Presentada por el alumno:

Angélica Herrera Sepúlveda

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

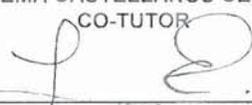
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DRA. NORMA Y. HERNÁNDEZ SAAVEDRA
DIRECTOR DE TESIS


DRA. THEMA CASTELLANOS CERVANTES
CO-TUTOR


DR. GOPAL MURUGAN
CO-TUTOR


DRA. LOURDES MORQUECHO ESCAMILLA
CO-TUTOR


DRA. LINDA K. MEDLIN
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERRIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Director de tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dra. Linda Medlin

Dr. Gopal Murugan

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

Dra. Lourdes Morquecho Escamilla

CIBNOR

Observatoire Océanologique de Banyuls
Sur/Mer, Université Pierre et Marie Curie

CIBNOR

CIBNOR

CIBNOR

Comité revisor de tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dra. Linda Medlin

Dr. Gopal Murugan

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

Dra. Lourdes Morquecho Escamilla

CIBNOR

Observatoire Océanologique de Banyuls
Sur/Mer, Université Pierre et Marie Curie

CIBNOR

CIBNOR

CIBNOR

Jurado de Examen

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dr. Gopal Murugan

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

Dra. Lourdes Morquecho Escamilla

Dr. David U. Hernández Becerril

CIBNOR

CIBNOR

CIBNOR

CIBNOR

UNAM

Suplente

Dr. Felipe de Jesus Ascencio Valle

CIBNOR

Resumen

En las costas mexicanas, no existe un programa formalmente establecido de monitoreo de eventos de Floraciones Algales Nocivas (FAN). El objetivo de este estudio fue el desarrollar métodos moleculares basados en marcadores ribosomales para la rápida identificación de especies FAN con la finalidad de mejorar las actividades de monitoreo en las costas de México.

Para el análisis de comunidades, se probaron las técnicas CE-SSCP y HRM. En el caso de CE-SSCP, el fragmento 28S LSU D7 presentó la mejor resolución para separar nueve especies de dinoflagelados. Sin embargo, para discriminar especies del género *Prorocentrum* se observó una baja resolución a nivel de especie con HRM, encontrándose el agrupamiento de las especies del género únicamente con en base a los hábitos que comparten, es decir: especies bentónicas y planctónicas. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los métodos CE-SSCP y HRM pueden ser utilizados como una primera aproximación para conocer la composición de dinoflagelados en muestras ambientales, no obstante, se recomienda realizar pruebas de especificidad adicionales.

Para la identificación específica de especies del género *Prorocentrum*, se utilizaron dos aproximaciones: métodos de hibridación en los formatos de microarreglo y células completas (WC-FISH) y PCR. Desafortunadamente, después de una detallada estandarización de estas metodologías, no se obtuvo la suficiente resolución para discriminar entre especies del género *Prorocentrum* cercanamente relacionadas.

Finalmente, se evaluaron los límites de las especies mediante la integración de análisis morfológico y molecular para las especies *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum*. Las sutiles diferencias morfológicas encontradas, nos permiten concluir que *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum* son conespecíficas. Los datos moleculares no separan a estos organismos como dos morfoespecies, por lo tanto pueden ser consideradas como el complejo de especies *Prorocentrum hoffmannianum*, los cuales se encuentran filogenéticamente separados en clados en base a su origen geográfico.

Palabras clave: FAN, métodos moleculares, ARNr, CE-SSCP, HRM, WC-FISH, Prorocentrales bentónicos.

Abstract

In Mexican waters, there is no formal and well-established monitoring program for Harmful Algal Bloom (HAB) events. The aim of this study was to develop molecular methods based on ribosomal markers for the rapid identification of HAB species to improve monitoring activities along Mexican coasts.

The molecular methods tested were CE-SSCP and HRM for the community composition analysis. For CE-SSCP the LSU D7 region provided the best resolution to separate and identify nine species of harmful dinoflagellates. However the HRM analysis using the LSU D7 fragment had low resolution to discriminate between species of the genus *Prorocentrum*, so it was only possible to identify two groups; grouping is mainly the joint habitats they share (benthic and planktonic *Prorocentrum* species). The results obtained in our work suggest that CE-SSCP and HRM could be a promising approach to obtain a rapid overview of the dinoflagellate composition in environmental samples. However, further specificity tests should be carried.

For the specific identification of *Prorocentrum* species, two methodologies were tested: hybridization methods testing WC-FISH and microarray formats, and PCR. Unfortunately after a careful standardization, it was not possible to discriminate between closely related *Prorocentrum* species using hybridization and PCR methods.

Finally, we evaluated species boundaries of the species *P. belizeanum* and *P. hoffmannianum*. Based on the morphological data lead us to conclude that *P. belizeanum* and *P. hoffmannianum* might be conspecific. The molecular sequence data do not separate them as two morphospecies and thus they can be considered as the *Prorocentrum hoffmannianum* species complex, which is separated into phylogenetic clades by their geographic origin.

Keywords: HAB, molecular methods, rRNA genes.

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mis padres, por el apoyo incondicional que me dieron en esta larga travesía, por enseñarme que en la vida se tiene que luchar para alcanzar los objetivos. Un gracias no es suficiente para decirles lo valioso que es tenerlos como padres y amigos.

A mi esposo, por recordarme que hay un mundo afuera del laboratorio, por ayudarme a seguir adelante y creer en mí aun cuando la meta parecía inalcanzable.

Este ha sido uno de los más grandes retos a los que me he enfrentado, estoy segura que sin ustedes no lo hubiese logrado. Este triunfo es de todos.

AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR como institución receptora de los estudios de Posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (083339) con la cual financió el desarrollo de esta investigación así como por el apoyo para la realización de estancias en el extranjero mediante la modalidad de beca mixta.

A mi comité tutorial Dra. Thelma Castellanos, Dr. Gopal Murugan, Dra. Lourdes Morquecho, Dra. Linda Medlin así como a mis tutores externos Dra. Nyree West, Dr. Jixin Chen, Dra. Lucie Maranda y Dr. David U. Hernández Becerril, por su adecuada orientación para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Norma Y. Hernández S., por aceptar tenerme como miembro de su equipo de investigación durante tantos años, brindándome la orientación necesaria para cumplir los objetivos planteados y sacar lo mejor de mí. Es un honor trabajar bajo la dirección de una persona que tiene un gusto por lo que hace. Muchas gracias por no solo ser mi tutora si no también mi amiga y confidente.

A Arturo P. Sierra Beltrán, Delia I. Rojas Posada, Marte Virgen Félix, Ariel A. Cruz Villacorta, Manuel Moreno Legorreta, Diana L. Dorantes Salas, Martha C. Reyes Becerril, Angel E. Carrillo García, Amada Reyes Salinas, Julian A. Garzón Favela; por el apoyo otorgado de acuerdo a sus especialidades y por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Personal de posgrado (Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Lic. Claudia E. Olachea León, Tania V. Nuñez Valdez), computo (Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga) y biblioteca (Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García, Elizabeth G. Sánchez Vázquez y María E. Ojeda Castro); por las disposición, amabilidad y apoyo que me otorgaron para llevar a cabo los trámites pertinentes.

A mis familiares y amigos, por estar conmigo en los momentos difíciles y por disfrutar los buenos ratos, gracias ☺!!!.

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aproximaciones metodológicas para el estudio de especies FAN	3
1.1.1 Análisis de comunidades o estudios de diversidad (fingerprinting)	4
1.1.1.1 <i>Polimorfismo Conformacional acoplado a Electroforesis Capilar (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism CE-SSCP)</i>	4
1.1.1.2 <i>Disociación de alta resolución (High Resolution Melt – HRM)</i>	5
1.1.2. Identificación especie específica	6
1.1.2.1 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction (PCR))</i>	6
1.1.2.2 <i>Análisis de secuencia de ADN</i>	6
1.1.2.3 <i>Sondas moleculares</i>	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Género <i>Prorocentrum</i>	13
2.2.1 Características generales del género <i>Prorocentrum</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 OBJETIVO GENERAL	18
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Cultivo y mantenimiento de organismos	20
6.2 Extracción de DNA genómico	20
6.2.1 Cosecha de células	20
6.2.2 Extracción de ADN genómico	20
6.3 Amplificación fragmentos discretos mediante PCR	21
6.3.1 Análisis de secuencia de ADN	22
6.4 Métodos de análisis y caracterización genética	22
6.4.1 Análisis de comunidades mediante CE-SSCP	22
6.4.1.1 <i>Diseño de cebadores</i>	22
6.4.1.2 <i>Amplificación de fragmentos específicos mediante PCR</i>	23
6.4.1.3 <i>CE-SSCP</i>	23
6.4.1.4 <i>Análisis de datos</i>	23
6.4.2 Análisis de comunidades mediante HRM	24
6.4.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación	25
6.4.3.1 <i>Diseño de sondas de hibridación</i>	25
6.4.3.2 <i>Hibridación en microarreglo</i>	25

6.4.3.3 <i>Hibridación de células completas (Whole Cell Fluorescent in situ Hybridization WC-FISH) en filtros de policarbonato</i>	26
6.4.4 Detección especie-específica mediante PCR	28
6.5 Análisis morfológicos y moleculares	28
6.5.1 Análisis de microscopía	28
6.5.1.1 <i>Microscopia de luz (ML)</i>	28
6.5.1.2 <i>Microscopia electrónica de barrido (MEB)</i>	29
6.5.2. Análisis moleculares: Distancia genética y filogenia	30
7.0 RESULTADOS	35
7.1 Amplificación de fragmentos específicos mediante PCR	35
7.2 Análisis de comunidades	37
7.2.1 Análisis individual de cultivos de dinoflagelados, mediante CE-SSCP (Herrera <i>et al.</i> 2013)	37
7.2.2 Análisis de comunidades mediante perfil de HRM	40
7.2.3 Identificación de especies pertenecientes al género <i>Prorocentrum</i> , mediante HRM	43
7.2.3.1 Análisis de secuencias	43
7.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación	46
7.3.1 Diseño de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género <i>Prorocentrum</i> .	46
7.3.2 Pruebas de especificidad de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género <i>Prorocentrum</i> en formato de microarreglo.	47
7.3.3 Pruebas de especificidad de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género <i>Prorocentrum</i> , formato de WC-FISH en filtros de policarbonato.	47
7.4 Diseño y estandarización de cebadores para la para la identificación especie específica de dinoflagelados del género <i>Prorocentrum</i> , mediante PCR	57
7.5 Análisis morfológicos y moleculares (Herrera <i>et al.</i> 2014 in progress)	58
7.5.1 Descripción morfológica de las especies <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i>	58
7.5.1.1 <i>Prorocentrum belizeanum</i>	58
7.5.1.2 <i>Prorocentrum hoffmannianum</i>	59
7.5.2 Estimación de distancia genética	67
7.5.3 Análisis filogenéticos	72
8.0 DISCUSION	77
8.1 CE-SSCP	77
8.2 HRM	79
8.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación	81
8.4 Análisis morfológicos y moleculares	85
8.4.1 Análisis morfológicos	85
8.4.2 Análisis moleculares	88

8.4.2.1 <i>Distancia genética</i>	88
8.4.2.2 <i>Análisis filogenéticos</i>	90
9.0 CONCLUSION	93
9.1 Conclusión y recomendaciones para análisis de comunidades	93
9.2 Conclusión y recomendaciones para identificación especie específica	93
9.3 Analisis morfológicos y moleculares para las especies <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> y <i>Prorocentrum belizeanum</i>	94
10.0 LITERATURA CITADA	95
11.0 ANEXOS	108
Anexo 1. Cebadores utilizados en este estudio para las distintas aproximaciones metodológicas (AFD, CE-SSCP, HRM e IES).	108
Anexo 2. Programas de PCR utilizados para: AFD, CE-SSCP, HRM e IES	109
Anexo 3. Secuencias de Prorocentrales bentónicos utilizados en análisis filogenéticos.	111
Anexo 4. Análisis morfológico de <i>Prorocentrum maculosum</i>	113
Anexo 5. Glosario taxonómico	116
Anexo 6. Glosario términos utilizados en biología molecular	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Mapa de localización de Estados de la República Mexicana afectados por eventos FAN.	9
Figura 2. Impacto de evento FAN en Punta Abreojos (2007), ocasionado por el dinoflagelado <i>Akashiwo sanguinea</i> .	11
Figura 3. Dibujo esquemático de una célula hipotética de <i>Prorocentrum</i> .	14
Figura 4. Modelo de un fragmento de ADN ribosomal.	34
Figura 5. Perfil de separación del fragmento 18S SSU V4 (359 pb) mediante CE-SSCP.	37
Figura 6. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D2 (389 pb) mediante CE-SSCP.	38
Figura 7. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D7 (200 pb) mediante CE-SSCP.	39
Figura 8. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D7 (200 pb) mediante CE-SSCP, probando diferentes cepas/aislamientos de la misma especie.	40
Figura 9. Perfil de disociación HRM del fragmento 18S SSU V4.	41
Figura 10. Perfil de disociación HRM del fragmento 28S LSU D2.	41
Figura 11. Perfil de HRM para los fragmentos: A) 28S LSU D5, B) 28S LSU D7, C) ITS 1 y D) ITS 2.	44
Figura 12. Imágenes del lector de microarreglo hibridando a 45 °C, utilizando ARN de la especie <i>Prorocentrum lima</i> (558C).	50
Figura 13. Imágenes del lector de microarreglo hibridando a 45 °C, utilizando ARN de <i>Prorocentrum micans</i> (97B).	51
Figura 14. Control de auto fluorescencia (sin sonda) de las células de <i>Prorocentrum maculosum</i> , visualizada con filtros “long pass”; células fijadas con solución etanol-salina.	52
Figura 15. Control de auto fluorescencia (sin sonda) de <i>Prorocentrum maculosum</i> , visualizada con filtros “long pass”.	53
Figura 16. Gradiente de temperatura para la sonda PmacuSSU.	54
Figura 17. Señal de FITC obtenida mediante pre-tratamientos físicos, químicos y enzimáticos a las células de <i>Prorocentrum maculosum</i> , utilizados para mejorar la señal de hibridación de la sonda PmacuSSU.	55
Figura 18. Señal de FITC obtenida en pruebas de hibridación cruzada para la sonda PmacuSSU.	56
Figura 19. Amplificación de fragmento del 18S SSU V1 (250 pb) mediante PCR punto final.	57
Figura 20. Micrografías de MEB de la valva derecha de <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> .	61
Figura 21. Micrografías de MEB de la valva izquierda de <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> .	62
Figura 22. Variación en el rango de la relación largo: ancho (L/A) de los	63

cultivos de <i>P. hoffmanianum</i> y <i>P. belizeanum</i> .	
Figura 23. Micrografías de MEB del collar de <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>P. hoffmannianum</i> .	64
Figura 24. Micrografías de MEB de la banda intercalar de <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> .	65
Figura 25. Patrón de placas del área periflagelar de Prorocentroides.	65
Figura 26. MEB micrografías de área periflagelar para las especies <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> .	66
Figura 27. Imágenes de microscopia de luz para las especies <i>Prorocentrum belizeanum</i> y <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> .	67
Figura 28. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de secuencias parciales del LSU rDNA (575pb).	74
Figura 29. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de la secuencia completa del ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (545pb).	75
Figura 29. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de la secuencia completa del ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (1121pb).	76

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla I. Listado de especies y condiciones de cultivo.	32
Tabla II. Registro de secuencias de ADN obtenidas durante este estudio	35
Tabla III. Temperaturas de disociación obtenidas para los fragmentos 18S SSU V4, 28S LSU D2, 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS1 e ITS2.	42
Tabla IV. Análisis de composición de secuencias nucleotídicas para los fragmentos 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS1 e ITS2.	45
Tabla V. Sondas de hibridación diseñadas para el grupo de Prorocentrales	49
Tabla VI. Valores porcentuales de distancia genética (ρ distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia parcial del LSU rDNA (575pb) de las especies <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> – <i>Prorocentrum belizeanum</i> .	69
Tabla VII. Valores porcentuales de distancia genética (ρ distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia completa del ITS-5.8S rDNA-ITS2 (545pb) de las especies <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> – <i>Prorocentrum belizeanum</i> .	70
Tabla VIII. Valores porcentuales de distancia genética (ρ distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia completa del ITS-5.8S rDNA-ITS2 y parcial LSU (1121 pb) de las especies <i>Prorocentrum hoffmannianum</i> – <i>Prorocentrum belizeanum</i> .	71

1. INTRODUCCIÓN

La relevancia del estudio de los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) deriva del aumento registrado en el número y frecuencia de dichos eventos en las diferentes zonas costeras del océano mundial. Hallegraeff (2004) presenta cuatro posibles explicaciones para este aparente incremento de eventos FAN: i) El incremento que la comunidad científica les ha presentado a esta problemática como respuesta a la problemática que se asocia a estos eventos en diversos sectores como: acuicultura, pesca, turismo y salud; ii) El incremento en la utilización de zonas costeras para acuicultura; iii) La estimulación de florecimientos algales por el incremento de la eutrofización en zonas costeras, generados a partir de residuos domésticos, agrícolas e industriales; y/o condiciones climatológicas inusuales; y iv) transporte de quistes de dinoflagelados mediante agua de lastre o asociados a la traslocación de moluscos bivalvos de una zona a otra, favoreciendo el desarrollo de especies invasoras.

En este contexto, se han enfocado esfuerzos para el establecimiento de sistemas de monitoreo ambiental y biológico en diferentes países, tanto para estudiar las relaciones entre variabilidad ambiental-presencia-peligrosidad de eventos, como para desarrollar capacidad predicativa que permita la toma oportuna de medidas preventivas y correctivas (Herrera, 2008).

A lo largo de la línea costera, los programas de monitoreo incluyen en su mayoría dos aspectos principales: 1) la observación biológica, mediante la cual se lleva a cabo la identificación y cuantificación de especies de algas potencialmente tóxicas, así como el monitoreo del contenido de toxinas en moluscos, y 2) la medición de parámetros físico-químicos, temperatura del agua, salinidad, nutrientes, clorofila, estratificación del agua, corrientes, entre otros; todo esto con el propósito de adquirir capacidad predictiva de los eventos FAN (Andersen *et al.* 2004). Sin embargo, el establecimiento real de los programas de monitoreo presenta una fuerte problemática, relacionada con la

insuficiencia de equipo y personal capacitado, lo que puede conllevar a un inadecuado monitoreo de los parámetros ambientales y biológicos.

Empleando el método tradicional (colecta, fijación, sedimentación y análisis por microscopía óptica, y en su caso, electrónica), no es fácil ni expedito identificar especies formadoras de FAN en muestras del medio natural, ya que se requiere de taxónomos expertos. Esto, conlleva un elevado consumo de tiempo y, desafortunadamente, no presenta suficiente resolución para la identificación de todos los organismos formadores de FAN a nivel especie (Miller y Scholin, 1998).

La baja resolución de este método se debe a que muchas características taxonómicas de los organismos solamente pueden ser reveladas mediante microscopía electrónica, como el tamaño y la forma de la célula, el arreglo de las placas y los complejos de poros apicales. Aunado a esto, existe una gran similitud morfológica entre especies tóxicas y no tóxicas, especies crípticas y complejos de especies (Hallegraeff, 1993). Tal es el caso de la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* que se presenta en dos variedades, una tóxica y otra no tóxica: ambas no pueden distinguirse entre sí mediante microscopía de luz (Smith *et al.* 1990). La misma situación sucede con las variedades tóxicas y no tóxicas del dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (John *et al.* 2003), y con las especies morfológicamente similares de *A. tamarense* y *Alexandrium catenella* (Yentsch *et al.* 1978; Yeung *et al.* 1996).

En caso de eventos FAN, el tiempo de identificación de las especies presentes en una muestra es un factor crítico para minimizar el impacto potencial en la salud pública. Por ello, como una alternativa para reducir el tiempo de análisis, y para generar información complementaria al trabajo taxonómico convencional, en los últimos 10 años se han aplicado diferentes estrategias metodológicas para realizar los programas de monitoreo, en las que se utilizan herramientas moleculares para el análisis de comunidades planctónicas a diferentes escalas (picoplancton, nanoplancton, microfitoplancton), así como la identificación a nivel de especies. Hernández-Saavedra y Herrera-Sepúlveda (en

preparación), presentan una revisión detallada de los progresos en la tecnología dirigidos a la identificación de especies FAN así como los principios teóricos de tales metodologías.

La selección del marcador genético más apropiado depende de la aplicación específica, el nivel de polimorfismo esperado, la disponibilidad de facilidades técnicas, el “know-how”, las restricciones de tiempo y las limitaciones de presupuesto (Spooner *et al.* 2005). Por ejemplo, para estudiar la relación entre organismos de especies estrechamente relacionadas, el uso de ADNr nuclear [v. *gr.* SSU (Small subunit), LSU (large subunit) y/o 5.8S] puede ser problemático, mientras que genes mitocondriales como citocromo b (*cytb*), citocromo oxidasa I y II (*cox1*, *cox2*), NADH-deshidrogenasas 1 y/o 2 (*nd1*, *nd2*), así como espaciadores del ADNr nuclear como espaciadores intergénicos (IGS) o espaciadores de transcritos internos (ITS) presentan pocos problemas. En cambio, para niveles profundos de divergencia los genes que codifican las proteínas están saturados a nivel de aminoácidos, por lo que las regiones conservadas del ADNr son muy útiles (Hwang y Kim, 1999).

A continuación se presenta la situación actual del desarrollo de los métodos moleculares empleados como herramientas para el monitoreo de fitoplancton potencialmente peligroso en ambientes marinos.

1.2 Aproximaciones metodológicas para el estudio de especies FAN

Las metodologías existentes para llevar a cabo la identificación de especies FAN, se pueden clasificar en dos grupos:

- 1) Análisis de comunidades, que incluye estimación de la diversidad y composición de las comunidades;

- 2) Identificación de especie, la cual permite obtener una aproximación semi-cuantitativa de la abundancia de grupos y/o especies particulares.

Para el análisis de comunidades se hará énfasis en las metodologías: i) CE-SSCP (*Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism*) o polimorfismo conformacional de cadena sencilla acoplado a electroforesis capilar, y ii) HRM (*High Resolution Melt*) o análisis de disociación de alta resolución.

Por otra parte, para la identificación especie-específica el enfoque es sobre técnicas que involucran amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* o PCR) y sondas de hibridación, cuyo principio fundamental es la identificación de secuencias específicas (blanco) de un- grupo o especie de interés.

1.1.1 Análisis de comunidades o estudios de diversidad (fingerprinting).

1.1.1.1 Polimorfismo Conformacional acoplado a Electroforesis Capilar (*Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism CE-SSCP*). Al aplicar la técnica SSCP se puede detectar polimorfismo en pequeños fragmentos de ADN, producidos mediante la digestión de ADN genómico y/o amplificación de segmentos específicos por PCR. El método consiste en la separación electroforética de cadenas sencillas de los ácidos nucleicos, basado en la diferencia de bases en su secuencia, cuyo efecto es una diferencia en estructura secundaria detectable en su movilidad en el gel; la resolución de este método es tan alta que el cambio en una sola base en la secuencia puede afectar la estructura secundaria y por lo tanto la movilidad del fragmento en el gel (Orita, 1989). Recientemente, el método SSCP se ha adaptado a un sistema de electroforesis capilar resultando la técnica CE-SSCP, el cual acoplado a un sistema de detección fluorescente ha sido utilizado para separar y localizar las diferentes conformaciones.

El uso de CE-SSCP presenta varias ventajas: 1) no es necesario aislar la cadena sencilla de ADN, 2) se evita el uso de reactivos peligrosos, 3) es una metodología con alta sensibilidad y resolución, 4) es compatible con experimentos realizados en forma secuencial y, 5) el uso de CE-SSCP y análisis de resultados mediante métodos computacionales, resuelve el problema de la comparación gel a gel, lo cual permite obtener una alta reproducibilidad y comparación de los patrones de un número infinito de muestras, ya que se utiliza un estándar de tamaño interno con una marca fluorescente diferente, el cual se agrega a cada una de las muestras a analizar (Lee *et al.* 1996; Zumstein *et al.* 2000; Zinger *et al.* 2007). El formato CE-SSCP ha sido utilizado para estudiar la composición microbiana en muestras ambientales, particularmente a la fracción de bacterioplancton (Ghiglione *et al.* 2005 y 2007; Rodríguez *et al.* 2009;) y la diversidad microbiana en suelo (King *et al.* 2005; Zinger *et al.* 2007), entre otros.

1.1.1.2 Disociación de alta resolución (High Resolution Melt – HRM). Esta técnica permite evaluar la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos con base a su perfil de disociación. La amplificación por PCR de un fragmento específico se realiza en presencia de un colorante fluorescente (SyberGreen, EvaGreen, por mencionar algunos), y subsecuentemente los productos son sujetos al análisis de disociación. El comportamiento de disociación dependerá directamente de la composición y tamaño del fragmento analizado, por lo que el cambio en una sola base podrá detectarse en base a su perfil de disociación. Kubista (2008) propone usar esta técnica en búsqueda de polimorfismo de un solo nucleótido (*single-nucleotide polymorphism* o SNP), mapeo de ADN, búsqueda de mutaciones, análisis de microsatelites, identificación de especies/taxonomía, entre otras. Con referencia a su uso en taxonomía de organismos fitoplanctónicos, esta técnica se ha empleado para identificar y diferenciar algunas especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* en muestras ambientales en las costas de Cataluña (Andree *et al.* 2010). Alkandari *et al.* (2010) empleó esta metodología para determinar si *Karenia mikimotoi* distribuida en Europa es una especie introducida del Océano Pacífico, en tanto que

Granados-Cifuentes y Rodríguez-Lanetty (2010) utilizaron esta metodología para el rápido y preciso genotipado de poblaciones monotípicas de *Symbiodinium*.

1.1.2 Identificación especie-específica

1.1.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction (PCR)). Es una técnica básica que permite amplificar selectivamente regiones específicas del ADN. Este método consiste en replicación del material genético *in vitro*, obteniendo al final múltiples copias del fragmento deseado (blanco). La amplificación por PCR es fundamental para la identificación y caracterización de microorganismos, principalmente aquellos cuya identificación morfológica y/o posibilidad de cultivo son complicadas; esta técnica se utiliza ampliamente en varias áreas del conocimiento por su fácil aplicación y bajo costo (Penna y Galluzi, 2008).

En las últimas décadas, las técnicas basadas en PCR han sido exitosamente empleadas para llevar a cabo la caracterización de varias especies nocivas del fitoplancton marino (Savin *et al.* 2004; Patil *et al.* 2005; Bolch y Salas, 2007; Penna *et al.* 2007). La identificación se realiza utilizando diferentes marcadores moleculares, siendo empleados por excelencia los genes ribosomales (ADNr). La técnica de PCR cualitativo es altamente sensible y específica (además de bajo costo), lo que la hace una de las alternativas más factibles de desarrollo e implementación en países con limitados recursos económicos y de espacio, ya que el equipo necesario es el que comúnmente se encuentra en un laboratorio de biología molecular.

1.1.2.2 Análisis de secuencia de ADN. Desde el punto de vista molecular, el límite de una especie se define con base en la divergencia molecular o la acumulación de mutaciones en regiones específicas del genoma (conservadas o no conservadas) entre individuos o grupo de individuos (Palumbi, 1992; 1994). El uso de la taxonomía molecular, basado principalmente en la identificación mediante las secuencias genéticas, ha aumentado considerablemente debido a los avances tecnológicos que permiten que cada vez sea más fácil obtener las secuencias de nucleótidos, que son excelentes herramientas para resolver

problemas taxonómicos complejos (Janson y Hayes, 2006). En el caso de los dinoflagelados, actualmente hay alrededor de 1069484 secuencias de nucleótidos (parciales o completas) depositadas en el GenBank (Febrero de 2014); no obstante, aún existen especies que no han sido estudiadas dada la dificultad que implica su cultivo.

1.1.2.3 Sondas moleculares. Son fragmentos de ADN producidos sintéticamente, que se unen selectivamente (hibridan) a secuencias específicas complementarias del ADN o ARN de un organismo en particular (especie) o un grupo de especies (Anderson, 1995). Estos fragmentos de ADN pueden marcarse por medios radioactivos, fluorescentes, químicos y/o colorimétricos. Las sondas de ADN por lo general tienen una longitud de 18 a 25 pb, es necesario probar su especificidad para evitar falsos positivos (Diercks *et al.* 2008). Para fines de esta investigación, el ensayo de hibridación fluorescente *in situ* de células completas (whole-cell fluorescent *in situ* hybridization o WC-FISH) es la metodología propuesta para llevar a cabo la identificación especie-específica. En este formato se utilizan células completas inmovilizadas en un portaobjeto (procesamiento de muestras a través de filtración) o en suspensión. La sonda de ADN penetra en la célula y se une selectivamente a la secuencia blanco; se elimina el exceso de sonda mediante lavados y el complejo formado por la hibridación específica se detecta mediante microscopía de fluorescencia. En este formato se han usado sondas dirigidas a fragmentos específicos de la subunidad grande del ácido ribonucleico ribosomal (LSU-rRNA) para identificar y enumerar especies de los géneros *Alexandrium* y *Pseudo-nitzschia*, tanto de cultivos puros como de poblaciones silvestres (Scholin *et al.* 1994; Miller y Scholin, 1998; Scholin *et al.* 1997 y 1999).

Por mencionar algunos ejemplos, Not *et al.* (2004) diseñaron y probaron sondas específicas para picoplancton eucariótico (Prasinophyceae), mientras que para la identificación de *Alexandrium tamarense* y *Alexandrium catenella*, Hosoi-Tanabe y Sako (2006) reportaron un método rápido, preciso y cuantitativo utilizando sondas de hibridación, capaces de detectar estas especies en solo 30 minutos. De manera similar,

Chen *et al.* (2008) desarrollaron un procedimiento de WC-FISH para detectar a *Heterosigma akashiwo* (Raphidiophyceae, ictiotóxica) en menos de 1 hora. Las sondas de hibridación, tienen la ventaja de que pueden adaptarse y utilizarse en microarreglos, consiguiendo así ser una excelente opción para llevar a cabo un eficiente programa de monitoreo (Medlin, 2009).

2. ANTECEDENTES

En México, en la mayoría de los casos, los organismos causantes de FAN han sido escasamente estudiados (Cortés-Altamirano, 1998). En la figura 1, se muestran algunos de los puntos del litoral mexicano que han sido fuerte y frecuentemente afectados por eventos FAN. Band *et al.* (2011) presenta una revisión de las principales especies de microalgas que han provocado FAN en las costas de México, en el periodo comprendido de 1991 -2011.

La Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), presenta de manera detallada un registro de los eventos FAN ocurridos en territorio mexicano desde el año 2003 a la fecha (<http://www.cofepris.gob.mx>

/marea Roja), siendo un total de 91 eventos, de los cuales 33 correspondieron a envenenamiento

paralizante por marisco (paralytic shellfish poisoning o PSP), 17 a envenenamiento diarreico por mariscos (diarrheic shellfish poisoning DSP), 12 a envenenamiento amnésico por mariscos (amnesic shellfish poisoning ASP), 22 ictiotóxicos y 25 no tóxicos. Adicionalmente, se observó que en ocasiones estos eventos se presentaron más de un tipo de envenenamiento, siendo la combinación más recurrente DSP y PSP. Ante de estos eventos, como medida de mitigación se estableció veda sanitaria y monitoreo de fitoplancton y especies susceptibles al daño en 45 ocasiones.

Específicamente, en la región Noroeste de México, particularmente en la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de California (GC), ocurren casi todos los tipos

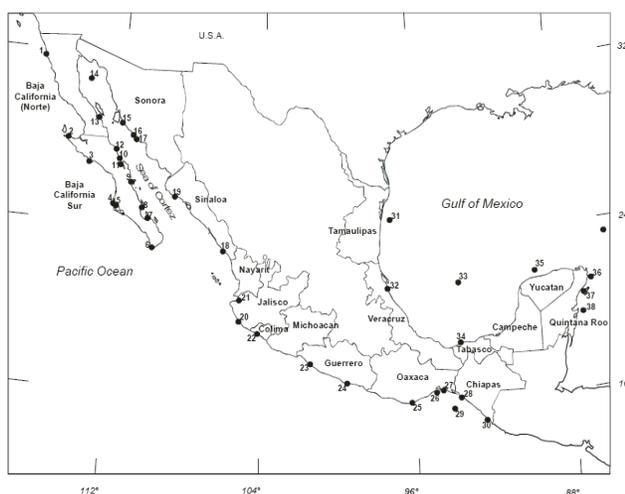


Figura 1. Mapa de localización de Estados de la República Mexicana afectados por eventos FAN (tomado de Ochoa *et al.*, 2002).

de toxinas marinas producidas por los eventos FAN (PSP, DSP y ASP), las cuales impactan seriamente la salud humana y ambiental así como importantes actividades económicas. En estas áreas, las especies reportadas con mayor frecuencia son: *Gymnodinium catenatum*, *Akashiwo sanguinea*, *Noctiluca scintillans*, *Lingulodinium polyedrum*, *Porocentrum minimum* y *Pseudo-nitzschia australis* (Cortés-Altamirano *et al.* 1996). Herrera (2008) presenta una revisión más extensa de los eventos ocurridos en el periodo 1998-2004.

Sierra *et al.* (2007) presentó un informe en el Programa Regional de Algas Nocivas en el Caribe de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO (ANCA-IOCARIBE) sobre los eventos FAN ocurridos en el litoral mexicano en el periodo 2003-2007. Específicamente para la región del GC y costas del Pacífico Noroeste, reportó que en julio del 2005 ocurrió el primer evento de alto impacto para B.C.S., resultando en una veda relacionada con el incremento en las concentraciones de ASP en moluscos de importancia comercial ocasionado por el incremento en las poblaciones de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*. En ese mismo año, en la zona del litoral del Pacífico (Bahía de Todos Santos) *L. polyedrum* dominó el ambiente durante seis meses (desde abril hasta septiembre). Se determinó, que en algunas ocasiones, el evento contenía concentraciones elevadas de *Prorocentrum micans* y *Ceratium furca*, y durante junio se observó la presencia de *Pseudo-nitzschia* spp, y en mayo del 2006, en esta misma zona se observó a *Chattonella marina*. En junio de 2006, las concentraciones de *Pseudo-nitzschia* spp. alcanzaron niveles nunca antes vistos en la Bahía de la Paz, ocasionando la declaración de veda y el cierre de actividades de colecta de moluscos. En marzo de 2007, *G. catenatum* ocasionó un evento de acumulación de toxinas PSP en los moluscos bivalvos en la Bahía de La Paz, obligando a la veda por un periodo de 3 a 4 semanas.

Un claro ejemplo del impacto ecológico, social y económico de los eventos FAN, ocurrió en Punta Abreojos B. C. S. durante agosto-septiembre del 2007. Este evento tuvo un impacto significativo en los principales recursos pesqueros y acuícolas de importancia

comercial de la región, entre ellos: abulón, langosta, caracol, almeja pismo y ostión de cultivo, además de una gran variedad de especies de escama (**Fig. 2**). Los estudios realizados en septiembre del 2007 por el Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA) a través del Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz (CRIP La Paz) y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), demostraron una disminución del 40% en la abundancia de



Figura 2. Impacto de evento FAN en Punta Abreojos (2007), ocasionado por el dinoflagelado *Akashiwo sanguinea* (Sierra *et al.*, 2007).

abulón respecto al promedio de los últimos tres años (2004-2006), y hasta un 80% en el caso del caracol. En el recurso langosta, se observó una disminución cercana al 65% de la abundancia relativa, sugiriendo una posible disminución de más del 50% de la captura en la temporada 2007-2008, y en ostión cultivado se observó un 95% de mortalidad. Todo esto resultó en considerables pérdidas económicas, debido a que Punta Abreojos es una de las principales regiones productoras pesqueras del noroeste Mexicano, además de la consecuente contaminación ambiental debido a la acumulación, en playas y fondos marinos, de una gran cantidad de materia orgánica en descomposición.

Aun cuando la frecuencia de los FAN en aguas mexicanas va en aumento, la mayor parte de los programas y actividades de investigación esta basado en muestreos puntuales y programas de investigación a corto plazo, los cuales involucran en al análisis de muestras naturales para la identificación de los organismos presentes, enfocándose a pocas especies FAN, mientras que otras líneas de investigación han sido abordadas pobremente (Hernández-Becerril *et al.* 2007; Band *et al.* 2011), tal es el caso de la escasa existencia de estudios referentes a la generación de herramientas moleculares que podrían ser útiles en el mejoramiento de los programas de monitoreo de organismos FAN.

Con referencia a lo anterior, en México se han realizado pocos estudios relacionados con la identificación o discriminación de dinoflagelados basado en el uso de métodos moleculares. En el 2003, Band *et al.* (2003) identificaron a *Alexandrium margalefii* y *Alexandrium affine* aisladas de Bahía Concepción (México) mediante la secuenciación del dominio 28S LSU D1-D2 y PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) del LSU-rDNA. En el 2008 Band *et al.* (2008) reportaron polimorfismo en una base de secuencias nucleotídicas del dominio 28S LSU D1-D2 en *G. catenatum* aislada de Bahía Concepción, con lo que sugieren que la población del oeste del Pacífico puede ser la población ancestral de la especie. Mientras que Hernández-Becerril *et al.* (2012) utilizaron sondas de hibridación en el formato FISH, para explorar la diversidad del picoplancton y ver como responde en diferentes ambientes, identificando una alta abundancia de *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), revelando su potencial en la ecología del fitoplancton.

Como resultado de investigaciones realizadas en los últimos cinco años, en el laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR se han diseñado métodos para la identificación de especies formadoras de FAN y para el estudio de comunidades de fitoplancton basados en la caracterización de diversas regiones del ADNr de 12 especies de dinoflagelados que se distribuyen en la región noroeste de México (Herrera, 2008). Se obtuvieron 54 secuencias nucleotídicas de dinoflagelados aislados de las costas de B.C.S. y Golfo de California. Basados en estas secuencias, se diseñaron 5 parejas de cebadores: tres para la generación de sondas de hibridación (identificación especie-específica), y dos aplicables en la metodología de SSCP, para llevar a cabo el análisis de comunidades fitoplanctónicas. Se realizaron pruebas preliminares de hibridación, evidenciando la necesidad de llevar a cabo una adecuada estandarización de los métodos involucrados. Sin embargo, los alcances de este trabajo son aún limitados, ya que se requiere de optimizar,

evaluar en muestras de campo y mejorar el formato de presentación, en vías de la generación de uno o varios kits para su aplicación en actividades de monitoreo.

2.1 Género *Prorocentrum*

Los dinoflagelados del género *Prorocentrum* Ehrenberg conforman uno de los grupos más diversos y ampliamente distribuidos en ambientes tropicales marinos. Este género incluye alrededor de 56 especies marinas (Gómez, 2005) con hábitos bentónicos, planctónicos o epibentónicos (Hernández-Becerril *et al.* 2000); algunos de los miembros del género *Prorocentrum* se encuentran asociados a eventos FAN (Faust y Gullede, 2002; Cohen-Fernández *et al.* 2006). En la lista de referencia taxonómica de microalgas nocivas de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO (IOC, por sus siglas en inglés) figuran 13 especies del género *Prorocentrum*: *Prorocentrum arabianum*, *P. arenarium*, *P. belizeanum*, *P. borbonicum*, *P. cassubicum*, *P. concavum*, *P. emarginatum*, *P. faustiae*, *P. hoffmanianum*, *P. lima*, *P. maculosum*, *P. minimum* y *P. rhathymum* (Hoppenrath y Elbraechter, 2014).

En las costas de México, las especies más representativas de *Prorocentrum* son: 1) *P. lima*, 2) *P. minimum*, 3) *P. rhathymum*, 4) *P. triestinum*, 5) *P. dentatum*, 6) *P. micans*, 7) *P. gracile*, 8) *P. maculosum*, 9) *P. belizeanum*, 10) *P. concavum* y 11) *P. emarginatum*, (Cortez-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003; Hernández-Becerril *et al.* 2000, 2007; Cohen *et al.* 2010). Específicamente, en las costas del Pacífico Mexicano, los dinoflagelados más conspicuos incluyen a 20 especies de este género (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006).

2.1.1 Características generales del género *Prorocentrum*

El género *Prorocentrum* se caracteriza por la inserción de dos flagelos en la zona apical (desmocontes) y la ausencia de cingulum y sulcus (**Fig. 3**). Las células son comprimidas lateralmente y sus tecas consisten en dos grandes valvas unidas en sus extremos

marginales (suturas); y un conjunto de pequeñas placas apicales que rodean el área periflagelar; aparentemente estas placas pueden ir desde ocho hasta doce, y su arreglo presenta cierta estabilidad. Regularmente la valva derecha presenta una excavación o indentación y para algunas especies esta placa se prolonga en una espina. La superficie de las valvas puede estar perforada por poros, generalmente oblicuos, a veces densos y con frecuencia dispuestos en hileras; aunque puede ser lisa, también es posible la presencia de poroides densos de poca profundidad o espinas muy pequeñas (Dodge y Bibby, 1973; Fensome, 1993; Hallegraeff, 2004).

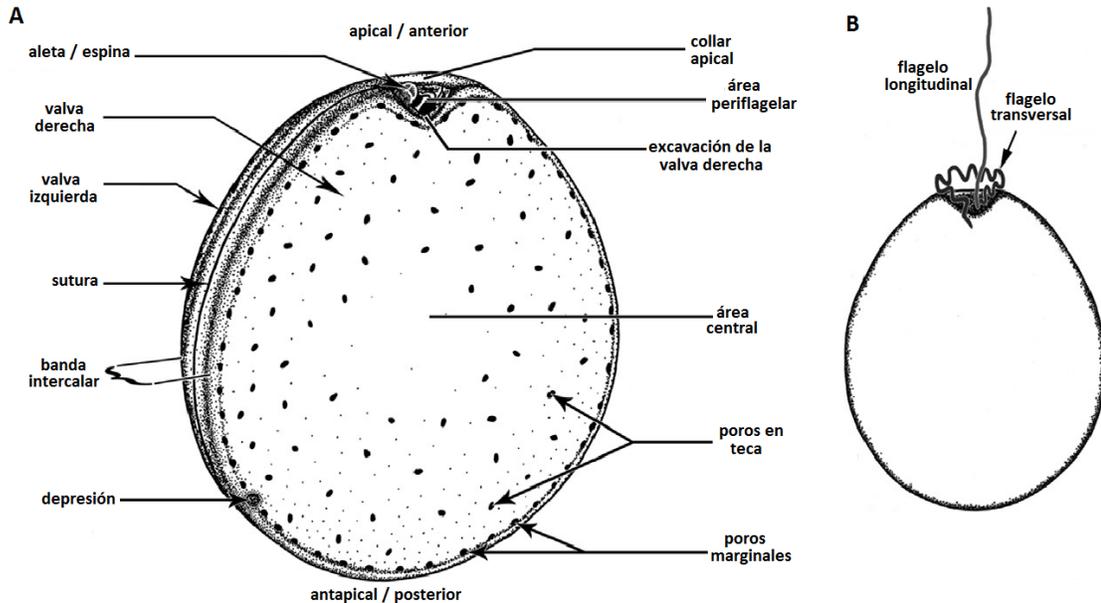


Figura 3. Dibujo esquemático de una célula hipotética de *Prorocentrum*. A) Tipo de tabulación de la célula, ornamentación y nombres de los caracteres morfológicos. B) Flagelos tipo desmocontes.

Al igual que con el resto de especies de microalgas nocivas, la identificación a nivel especie dentro de este género es complicada y se basa principalmente en la forma del cuerpo, el tamaño, la relación largo: ancho, la forma y posición de la espina apical, la ornamentación y la densidad de los poros en las principales valvas; sin embargo algunos caracteres

únicamente pueden evaluarse haciendo uso de microscopía electrónica de barrido, por ejemplo: forma, número y posición de los poros en las válvulas y la arquitectura de las placas del poro apical (o área periflagellar), considerando a este último como el carácter taxonómico más estable a nivel de especie (Hoppenrath *et al.* 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

En las costas de México la relevancia del seguimiento de los eventos FAN radica en las afectaciones recurrentes por este tipo de episodios, que dependiendo de su ubicación, intensidad y composición pueden ser un riesgo para la salud pública y vida marina, incluso, provocando grandes pérdidas económicas en el sector pesquero y acuícola. Por lo anterior, es necesario el desarrollo de técnicas modernas para una rápida identificación y enumeración de las especies causantes de los eventos FAN, siendo los métodos moleculares de las principales opciones viables que contribuirían a solventar esta problemática.

Un programa de monitoreo de organismos causantes de FAN basado en métodos moleculares, permitirá el análisis de un mayor número de muestras en un periodo de tiempo corto, sin la apremiante necesidad de contar con personal altamente calificado en taxonomía de organismos fitoplanctónicos. Esta estrategia permitirá llevar a cabo un análisis más cercano al tiempo real del ecosistema (logrando profundizar en el entendimiento de la ecología de las diferentes especies presentes en eventos FAN) con lo que sería factible ofrecer y/o generar un sistema de alerta temprana para las costas de México, permitiendo la posibilidad de establecer estrategias de mitigación de impactos.

4. HIPÓTESIS

Las características genéticas intrínsecas de los genes ribosomales de los dinoflagelados, permitirán que el uso de métodos moleculares como CE-SSCP, HRM, sondas de hibridación y/o PCR, generen la suficiente especificidad, resolución y reproducibilidad para llevar a cabo la identificación especie específica de dinoflagelados tóxicos y nocivos, por lo que dichos métodos integrados con identificación morfológica, podrán ser utilizados como herramientas para optimizar las actividades de monitoreo de fitoplancton en las costas de México.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Desarrollar métodos moleculares basados en marcadores moleculares ribosomales y mitocondriales para la identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos, como propuesta para la detección temprana y el monitoreo de microalgas nocivas en las costas de México.

5.2 *Objetivos particulares*

- Analizar la resolución de diferentes fragmentos de genes ribosomales, mediante el uso de las técnicas de CE-SSCP y HRM, para llevar a cabo el estudio de comunidades de fitoplancton.
- Diseñar y optimizar sondas moleculares para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos del género *Prorocentrum*, aplicable al formato de WC-FISH.
- Diseñar y optimizar cebadores especie-específicos para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos del género *Prorocentrum* aplicables al formato de PCR.
- Caracterización morfológica y molecular de las especies *Prorocentrum belizeanum* Faust (1993) y *Prorocentrum hoffmannianum* Faust (1990), mediante microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido así como construcción de árboles filogenéticos a partir de marcadores ribosomales 18S SSU, ITS1-5.8S-ITS2, 28S LSU y del gen mitocondrial *CytB*.

- Integrar los resultados de caracterización morfológica y molecular para *Prorocentrum belizeanum* Faust y *Prorocentrum hoffmannianum* Faust, como herramientas útiles para la discriminación de especies filogenéticamente relacionadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos y mantenimiento de organismos

En la **Tabla I** se presentan las características generales, condiciones de cultivo y mantenimiento de las especies y cepas utilizadas para el desarrollo de este estudio, las cuales se obtuvieron de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR (CODIMAR, <http://www.cibnor.mx/es/investigacion/colecciones-biologicas/codimar>) y de la Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA, <https://ncma.bigelow.org/>).

6.2 Extracción de ADN genómico

6.2.1 Cosecha de células

De cada cultivo en fase exponencial media se tomó 10 mL. Las células se colectaron en tubos cónicos estériles de 50 mL mediante centrifugación (10 min, 1 000 x g, 4 °C); el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en el medio remanente en el tubo para la posterior extracción de los ácidos nucleicos.

6.2.2 Extracción de ADN genómico

El ADN total se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito por Stoeck et. al. (2007) modificado. Brevemente, el paquete celular se resuspendió en 500 µL de buffer de extracción salino [100 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM Na₂EDTA (pH 8), 100 mM buffer fosfato de sodio (pH 8), 1.5 M NaCl, 1% CTAB], y se añadieron 200 µL de perlas de vidrio antes de lisar las células y se agitaron por 40 s en un Mini Bead-beater (Biospec Products Inc.). Las muestras se incubaron a 55 °C por 1 h, con intervalos de agitación cada 20 min. Posteriormente, se añadió a cada muestra Proteinasa K (10 mg/mL, concentración final); los tubos se incubaron a 55 °C por 1 h, con agitación cada 30 min. Seguido, se añadieron

80 μL de buffer de extracción hexadeciltrimetil bromuro de amonio (CTAB) pre-calentado [10% CTAB (p/v) en 0.7 M NaCl]; las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 min. Después, se agregó un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25: 24: 1) y la fase acuosa se recuperó por centrifugación (5 min, 4 °C, 16 000 $\times g$). Para precipitar el ADN, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, y la mezcla se incubó a -20 °C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 4 °C (18000 $\times g$), el botón de ácidos nucleicos se lavó con 500 μL etanol pre-enfriado (70%) y se disolvió en 100 μL de Buffer TE 1X pH 8.0 [1M Tris (pH 8.0), 0.5M EDTA (pH 8.0)]. Las muestras se trataron con 1 μL ARNasa (100 mg/mL), incubando a 45 min a 37 °C en baño maría. Finalmente, se realizaron varios pasos de extracción añadiendo el mismo volumen de TE 1X y fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25: 24: 1). La integridad del ADN total se analizó mediante electroforesis horizontal (Wide Mini-Sub Cell GT System Cat. 170-4485; BioRad) en geles de TBE-agarosa (1%), mientras que la concentración se determinó espectrofotométricamente en un Nanodrop (ND-1000 UV-Vis; Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

6.3 Amplificación de fragmentos discretos mediante PCR

Se amplificaron regiones específicas del ADNr (18S SSU, ITS 1 y 2, 5.8S y 28S LSU) (**Fig. 4**) y del gen mitocondrial citocromo b (Cytb) de las especies presentadas en la **Tabla I**, haciendo énfasis en el genero *Prorocentrum*. Los cebadores utilizados se presentan en el **anexo 1**. Se amplificaron segmentos específicos de estos genes, para identificar una región óptima para el adecuado diseño de cebadores aplicables en las metodologías de WC-FISH y PCR, para la detección de especies endémicas de la región de B.C.S.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para cada reacción de 10 μL , se emplearon 0.5 pM de cebadores (**anexo 1**), 10 ng de ADN genómico, PCR Buffer 1 X, 0.2 mM dNTP's, 1.5 mM MgCl_2 , 1% DMSO y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Los diferentes programas de amplificación, de acuerdo a cada par de cebadores, se presentan

en el **anexo 2**. La integridad de los amplicones se verificó mediante electroforesis horizontal en geles de TBE-agarosa (1%) preteñidos con bromuro de etidio (45 min, 70 V a temperatura ambiente [TA]). Los geles se observaron bajo luz UV y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc (UVP, England). La secuencia de nucleótidos de los amplicones se determinó en ambas cadenas, usando los cebadores F y R correspondientes a cada combinación. El servicio de purificación y secuenciación de amplicones fue realizado por la compañía MacroGen (Seoul, Korea; <http://www.macrogen.com>).

6.3.1 Análisis de secuencias de ADN

El análisis de la calidad de las secuencias obtenidas así como su edición fue llevada a cabo con el software (SeqManPro, Lasergene). Para confirmar la identidad, se realizaron búsquedas de similitud con aquellas reportadas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information, usando el algoritmo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6.4 Métodos de análisis y caracterización genética

6.4.1 Análisis de comunidades mediante CE-SSCP

El análisis de CE-SSCP se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Ghiglione *et al.* (2005) incluyendo a las especies *Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium margalefii*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Ceratium balechii*, *Coolia monotis*, *Gymnodinium catenatum*, *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum*, *Prorocentrum rhathymum* y *Prorocentrum minimum* (**Tabla I**). Se amplificaron las regiones hipervariables 18S SSU V4; 28S LSU D2 y D7 (**Fig. 3**). Todos los cebadores con sentido F, fueron marcados en el extremo 5' con TET (tetrachlorofluorescein) (Thermo Scientific Biopolymers).

6.4.1.1 Diseño de cebadores. Como se mencionó en la sección 6.3, la región variable 28S LSU D1-D2 fue amplificada de acuerdo al procedimiento reportado por Herrera (2008). Sin

embargo, para amplificar la región 28S LSU D2 se diseñó un nuevo cebador considerando tanto las secuencias disponibles en el GenBank, así como las generadas previamente en nuestro laboratorio (Herrera, 2008). Un cebador interno D1/D2 dinos F (5'-ATCGAGACCGATAGCA-3) fue diseñado utilizando el software ARB (del Latin *arbor*, árbol) (Ludwig *et. al.*, 2004).

6.4.1.2 Amplificación de fragmentos específicos mediante PCR. El ADN genómico fue empleado como templado para la amplificación de fragmentos específicos correspondientes las regiones ribosomales 18S SSU V4, 28S LSU D2 y 28S LSU D7. La mezcla de reacción contenía buffer PFU 1X, 0.8 mM dNTPS, 0.3 μ M cebadores, 1 U PFU ADNpol; el volumen de reacción se ajustó a 10 μ L con agua ultra-pura estéril (mili-Q). Las condiciones de amplificación se presentan en el anexo 2. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa (1%) y la concentración se estimó por comparación con el marcador de bases (Smart Ladder, Promega).

6.4.1.3 CE-SSCP. Los productos de PCR fueron diluidos en agua grado biología molecular de 2 a 40 veces. Se mezcló 1 μ L de cada dilución con 18.8 μ L de formamida deionizada (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) y 0.2 μ L de estándar de tamaño interno GeneScan (400HD ROX para la región D7, y 500 ROX para las regiones D2 y V4; Applied Biosystem). Las muestras se desnaturalizaron a 94 °C por 5 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 10 min (West *et. al.*, 2008). Los fragmentos se separaron mediante electroforesis capilar (CE-SSCP) siguiendo las indicaciones de Delbes *et. al.*, (2000) utilizando un ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem); las condiciones de electroforesis fueron 2 kV y 30 °C por 30 min por muestra.

6.4.1.4 Análisis de datos. Los electroferogramas fueron analizados con el software Genescan (Applied Biosystem), utilizando el método de mínimos cuadrados de segundo orden para normalizar la movilidad entre las diferentes corridas. El procedimiento de CE-SSCP fue realizado por duplicado para cada muestra para corroborar la reproducibilidad de los electroferogramas.

6.4.2 Análisis de comunidades mediante HRM

El análisis de HRM se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Alkandari *et al.* (2010). Para las especies *Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium margalefii*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Ceratium balechii*, *Coolia monotis*, *Gymnodinium catenatum*, *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum*, *P. rathymum*, *P. belizeanum*, *P. maculosum*, *P. lima* y *Prorocentrum minimum*, se amplificó la región correspondiente al dominio 18S SSU V4; 28S LSU D2, D5 y D7 así como las regiones intertranscritas ITS 1 e ITS 2 (**Tabla I, Fig. 3**) utilizando los cebadores presentados en el **anexo 1**.

Para amplificar los fragmentos 18S SSU V4 y 28S LSU D2 se empleó una mezcla de reacción que contenía GoTaq® Flexi buffer 1X, 10 mM dNTPs, 10 µM cebadores, 1 U GoTaq® DNApol (Promega) y 1 µL de EvaGreen® (intercalante); el volumen de reacción se ajustó a 25 µL con agua mili-Q. Por otra parte, para la amplificación de los fragmentos D2, D7, ITS1 e ITS2 se llevaron a cabo pruebas de estandarización para determinar la composición de la mezcla de reacción de PCR. La composición final de la mezcla de reacción fue: 20 ng/ µL de ADN templado (dilución de amplicones D5-D8 LSU e ITS/SSU respectivamente), PCR Buffer 1 X, DMSO 1%, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.5 pM cebadores, EvaGreen®, 0.08 U Platinum Taq polimerasa, ajustando el volumen de reacción a 10 µL con agua milli-Q. El PCR fue llevado a cabo utilizando un Rotor-Gene 3000 (RG-3000, Corbett Life Science); las condiciones de amplificación se presentan en el **anexo 2**.

Los análisis de disociación de los productos de PCR se llevaron a cabo en un rango de 80 °C – 90 °C y de 75 °C - 90 °C para las regiones 28S LSU D1-D2 y para 18S SSU V4 (respectivamente), con un rango de incrementos de 0.5 °C, manteniéndose durante 30 s en el primer paso y 2 s en los siguientes pasos, acumulando la fluorescencia detectada en cada temperatura. Finalmente, para los fragmentos 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS 1 e ITS 2 se utilizaron rampas 70-90 °C mantenidas durante 30 s en el primer paso y 2 s en los siguientes pasos.

6.4.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación

6.4.3.1 Diseño de sondas de hibridación. Mediante el alineamiento de las secuencias generadas en este estudio y las secuencias correspondientes a los genes 18S y 28S disponibles en el GenBank y en la Base de datos del proyecto ribosomal (RDP), utilizando el programa ARB (Ludwig et. al., 2004) se diseñaron dos grupos de sondas de hibridación. El primer grupo se diseñó para la identificación especie-específica de tres miembros del género *Prorocentrum*: *P. rathymum*, *P. maculosum* y *P. belizeanum*, así como otras sondas basadas en los hábitos de estos organismo (Prorocentrales bentónicos y Prorocentrales planctónicos). Un segundo grupo de sondas se diseñó utilizando el procedimiento descrito anteriormente, específicamente dirigido a las especies *P. maculosum* y *P. belizeanum*.

La especificidad del primer grupo de sondas se probó en formato de microarreglo (proyecto internacional MIDTAL, <http://www.midtal.com/>), mientras que del segundo lote únicamente se probó la sonda específica para *P. maculosum* en formato de WC-FISH (en filtros de policarbonato) (Töbe et al. 2010).

6.4.3.2 Hibridación en microarreglo. Para llevar a cabo el método de hibridación se siguió el protocolo descrito por el MIDTAL Project. Previamente, las sondas fueron impresas manualmente en el lado izquierdo sin interferir con la impresión del resto de las sondas incluidas en el microarreglo.

Marcaje del RNA. El marcado del ARN se realizó el kit Kreatech Platinum Bright 647, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, partiendo de 1 µg de ARN cuantificado en Nanodrop.

Fragmentación. Posteriormente al marcado, el ARN se fragmentó utilizando un 1/10 de volumen de buffer de fragmentación (100 mM ZnCl₂ en 100 mM Tris-HCl pH 7). Las muestras se incubaron a 70 °C por 15 min.; para detener la reacción se adicionó un 1/10 de volumen de buffer stop (0.5 M EDTA pH 8).

Pre-Hibridación. Los chips se incubaron con 20 mL de buffer de pre-hibridación (BSA 10 µg/µL; Buffer 2X STT [NaCl 5 M; Tris-HCl 1 M, pH 8; Tritón 100X 10%]) por 1 h a 45 °C. Posteriormente, los chips se lavaron con agua deionizada y se secaron por centrifugación a 1 000 x g por 10 min a TA.

Hibridación. En cada chip se colocaron 25 µL de la reacción de hibridación (buffer de hibridación 2X STT [1 M NaCl, 10 mM Tris [pH 8], 0.005% de Tritón 100 X y 1 mg/mL seroalbumina bovina]; 30 ng/µL de RNA; formamida deionizada 20%; control 100 ng de TBP [Fragmento de 250 pb del gen de la proteína de unión a la caja TATA (Tata binding protein TBP) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*]. Previo a la hibridación, las muestras se incubaron a 80 - 85 °C por 10 min. A continuación, la hibridación se llevó a cabo a 45 °C por 1 h en una cámara húmeda, posteriormente el chip se lavó 3 veces con 40 mL de buffer de lavado 1 [2X SSC (0.30 M Citrato de Sodio, 0.030 M NaCl pH 7.0); 10 mM EDTA y 0.05% SDS] por 10 min a TA, seguido del buffer de lavado 2 (0.5 X SSC; 10 mM EDTA) por 10 min a TA. Finalmente, se utilizó el buffer de lavado 3 (0.2 X SSC; 10 mM EDTA) por 10 min, utilizando un gradiente de temperatura de 45 a 60 °C por 10 min; los chips se secaron por centrifugación a 1000 x g por 10 min a TA.

Análisis de datos. Los chips se leyeron en un GenePix® 4000b Microarray Reader y los datos fueron analizados mediante el uso del software GenePix pro 6.0.

6.4.3.3 Hibridación de células completas (Whole Cell Fluorescent *in situ* Hybridization WC-FISH) en filtros de policarbonato. Siguiendo la metodología descrita por Töbe *et al.* (2010) se llevó a cabo la estandarización de la sonda (PmacuSSU) específica para *P. maculosum*. Como metodología base, se tomaron 5 mL de cultivo en fase media exponencial y se filtraron a través de filtros de policarbonato (poro de 0.2 µm, presión < 200 mm Hg para prevenir la lisis de las células). Posteriormente, se agregaron 5 mL de solución salina de fijado [22 vol. EtOH 95%; 3 vol. 25 X SET (3.75 M NaCl; 25 mM EDTA; 0.5 M Tris/HCl, pH7.8)]; 5 vol. agua ultra-pura estéril [mili-Q]) y se incubaron por 2 h a TA. Las muestras se filtraron y se les añadió 1 mL de buffer de pre-hibridación (5 X SET, 0.1% IGEPAL-CA630;

32% Formamida ultra pura; 30 µg ác. poliadenílico) y se incubaron a TA durante 5 min. El buffer se removió por filtrado posteriormente, los filtros se secaron en papel Whatman y se cortaron en 6 piezas. Las piezas de filtro se transfirieron a cajas de cultivo y se colocaron sobre papel filtro. Posteriormente, se agregaron 54 µL de buffer de hibridación (buffer de pre-hibridación más la sonda a una concentración final de 10 mM) y se incubó a en un gradiente de temperatura de 50 a 75 °C en una cámara húmeda, durante 1 h en oscuridad, para minimizar la degradación del fluorocromo (las condiciones de hibridación se adaptaron de acuerdo a las características de la sonda utilizada). Posteriormente, los filtros se secaron en papel Whatman. Una vez secos, estos se colocaron en una cámara de lavado y se agregaron 500 µL de solución de lavado (1 X SET pre-calentado a la temperatura de hibridación), y se incubó durante 10 min a la temperatura de hibridación. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente los filtros se secaron en papel Whatman y se montaron en portaobjetos. Se agregaron 25 µL de SlowFade Light (Molecular Probes) sobre el filtro y se colocó el cubreobjetos; las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan 2, microscopio equipado con set de filtros Zeiss #10 para FITC (Fluorescein) excitación: BP 450-490, beam splitter: FT 510, emisión: 515-565 y filtro #02 para DAPI excitación G 365, beam splitter: FT 395, emisión: LP 420. Las imágenes fueron captadas mediante la cámara digital Axiocam.

Dentro de los parámetros que se probaron para estandarizar la eficiencia y especificidad de la sonda PmacuSSU destacan:

- Método de fijación (solución etanol-salina o formaldehido-metanol)
- Tipo de filtro para el microscopio (long pass o band pass) (John et. al., 2005)
- Tipo de filtros (blancos o negros)
- Gradiente de formamida (0%-42%)
- Gradiente de temperatura (50 °C – 75 °C)
- Tratamiento enzimático (Proteinasa K [1 mg/mL], Lisozima [1 mg/mL], combinación 1:1 de ambas, incubando a 37 °C durante 30 min)

- Tratamientos fisicoquímicos (etanol a 80 °C por 20 min) (Yokouchia et. al., 2003).
- Pruebas cruzadas, con especies del género *Prorocentrum* (*P. hoffmannianum*, *P. lima*, *P. minimum*, *P. micans* y *P. belizeanum*).

6.4.4 Detección especie-específica mediante PCR

Como se mencionó en la sección 6.3, se amplificaron fragmentos discretos del ADNr (**Fig. 4**) y ADNmt para identificar regiones especie-específicas para *P. maculosum* y *P. belizeanum*. Por lo tanto, con las secuencias generadas en este estudio (**Tabla II**) así como las secuencias disponibles en el GenBank, se llevó a cabo un análisis de alineamiento múltiple para las regiones ribosomales 18S SSU, ITS 1 -5.8S- ITS 2, 28S LSU D1-D2 y *Cytb* empleando el software Clustal X versión 2.0.11. Los alineamientos fueron editados manualmente utilizando el software Bioedit versión 7.0.5.3 (Lasergene). Se determinó que dentro de la región 18S SSU V1 se encontraba un fragmento de 250 pb idóneo para discriminar entre estas dos especies. Por lo que se utilizó la pareja de cebadores HAB SSU 1F+ ProbepBel (**anexo 1**), las condiciones de amplificación se presentan en el **anexo 2**.

6.5 Análisis morfológicos y moleculares

Se llevaron a cabo análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía de luz (ML) y análisis filogenéticos con la finalidad de integrar herramientas morfológicas y moleculares para las especies de interés.

6.5.1 Análisis de microscopía

6.5.1.1 Microscopía de luz (ML). Durante la fase media exponencial, para cada uno de los cultivos de las especies de *P. belizeanum*, *P. hoffmannianum* y *P. maculosum* se tomaron 2 mL y se fijaron con lugol (Andersen y Throndsen, 2004). Para las células fijadas, se determinó la posición y forma del núcleo y del pirenoide utilizando el microscopio

Olympus BX43 (Olympus Co. Ltd., Tokio, Japan); se tomaron micrografías a 400 X con una cámara digital Micropublisher 3.3 RTV acoplada al microscopio.

6.5.1.2. Microscopia electrónica de barrido (MEB). Durante la fase media exponencial, para cada uno de los cultivos de *P. belizeanum*, *P. hoffmannianum* y *P. maculosum* se tomaron 2 mL y se fijaron con glutaraldehído 2.5% (concentración final) durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante se removió por centrifugación y el pellet celular se lavó 3 veces con buffer fosfato salino 1 X (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) para eliminar los residuos de glutaraldehído. Posteriormente, para remover el mucilago se siguió el procedimiento recomendado Takano y Matsuoka, 2011; con algunas modificaciones. Las células fueron sometidas a un tratamiento con 2 N NaOH (1:1) incubándose durante 2 min a TA. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1 X y, en el último paso, fueron resuspendidas en 50 µL of PBS 1 X y fijadas con tetróxido de osmio (OsO₄) al 4% durante 2 h. a TA. Las células tratadas, se lavaron 5 veces con PBS 1 X y 6 veces con agua destilada, para ser sometidas a un proceso de deshidratación, utilizando un gradiente de etanol de 30, 50, 70, 85, 95 y 100%, incubando 12 min a 4 °C en cada paso (el último paso se repitió dos veces). Después del último paso, las células fueron concentradas cuidadosamente sobre filtros de policarbonato (Nucleopore MB 13 mm diameter, 8 µm pores; Corning Inc., NY, USA) y se secaron utilizando un secador a punto crítico un dryer Samdri-PVT-3B (Tousimis Research Corporation, Maryland, USA). Finalmente, las células fueron recubiertas con oro (Desk II (Denton Vacuum Inc, NJ, USA). El material fue examinado con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N (Hitachi, Tokyo, Japan, Scanning Electron Microscopy) a 25 kV. Las micrografías fueron procesadas mediante el software Quartz PCI (Quartz Imaging Co., Canada).

Se estimó el tamaño de las células utilizando las imágenes de MEB promediando el largo (L) y ancho(A) para 20 células (n=20), se estimó la relación L/A, y el rango de variación de la relación L/A se analizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia $\alpha= 0.05$ y una prueba a posteriori Fisher LSD; estos análisis

fueron llevados a cabo utilizando el software Statistica ver. 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa OK, USA). Adicionalmente, la descripción de la morfología así como la arquitectura del área periflagellar de 15 células se analizó en base a la nomenclatura propuesta por Hoppenrath *et al.* (2013).

6.5.2. Análisis moleculares: distancia genética y filogenia

Se analizaron regiones de ADN de manera individual y concatenada con otros fragmentos/regiones/genes. Nuestra base de datos consistió en las secuencias nucleotídicas de las regiones: i) ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2 y ii) 28S LSU D1-D2 obtenidas mediante la amplificación de fragmentos discretos (AFD) (sección 6.3) así como las secuencias de Prorocentrales bentónicos disponibles en el genbank, el ciliado *Toxoplasmas gondii* se seleccionó como grupo externo (**Anexo 3**). Se utilizaron dos conjuntos (sets) de alineamientos basados en su estructura secundaria utilizando los software R-coffee (Moretti *et al.* 2008) para la región de los ITS y el fragmento LSU D1D2 se alineó basado en el alineamiento de estructura secundaria LSU rDNA de dinoflagelados (provisto por Dr. Linda Medlin). Ambos alineamientos fueron refinados manualmente utilizando el software BIOEDIT ver. 7.0.5.3. Posteriormente, los alineamientos obtenidos se concatenaron (ITS1-5.8S-IT2-28S D1D2) hasta obtener un alineamiento que consiste en 14 taxa y 1121 pb. Para los alineamientos individuales y concatenados, se estimaron los valores de distancia genética no corregida (p) utilizando el programa MEGA 5.0

Todos los conjuntos de datos fueron analizados con jModelTest ver. 2.1.3 (Darriba *et al.* 2012) para seleccionar el modelo evolutivo óptimo; para el alineamiento ITS1-5.8-ITS2 el modelo TrNef+G fue seleccionado, mientras que para el 28S LSU D1D2 se eligió el modelo TrN+G, finalmente para el alineamiento concatenado ITS-LSU fue el modelo HKY+G todos estos modelos fueron seleccionados utilizando el criterio de inferencia Bayesiano (BIC por sus siglas en inglés Bayesian Inference Criteria). Los análisis bayesianos se llevaron a cabo con MrBayes MPI ver. 3.1.2. Los árboles fueron generados utilizando Cadenas de Markov

Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés Markov Chain Monte Carlo) con 5, 000, 000 de generaciones, muestreando cada 100. Se generaron un árbol consenso de probabilidad posterior por la regla de la mayoría del 50% después de la eliminación de 25% muestras de árboles por la opción default (burn-in trees). La topología de los árboles se visualizó utilizando el programa FigTree ver. 1.4.0.

Tabla I. Listado de especies y condiciones de cultivo.

					Condiciones de cultivo							
Especie					Clave	Localidad	Medio de cultivo	T ° C	Ciclos de luz y oscuridad	Re-siembra		
Δ	•	■	□		<i>Akashiwo sanguinea</i> (Hirasaka) Hansen y Moestrup	ASCQ-1	BACO	GSe	20± 3	12	28	
Θ	•	■	◦	▼	<i>Alexandrium margalefii</i> , Balech	AMCQ-1	BACO	GSe	20± 3	12	28	
Θ	•	■	◦		<i>Cochlodinium polykrikoides</i> , Margalef	CPPV-1	BAPAZ	GSe	25± 3	12	28	
Θ	•	■	◦		<i>Ceratium balechii</i> , Meave, Zamudio et. Okolodkov	CBMV-1	BAMAZ	f/2+Se	20± 3	12	28	
Θ	•		◦	▼	<i>Coolia monotis</i> , Meunier	CMPV-1	BAPAZ	f/2+Se	20± 3	12	28	
Θ	•		◦		<i>Coolia monoti</i> , Meunier	CMHV-1	CUBA	GSe	25± 3	12	28	
Θ		■	◦		<i>Gymnodinium catenatum</i> , Graham	GCCV-11	BACO	GSe	20± 3	12	28	
Θ Δ	•	■	◦		<i>Gymnodinium catenatum</i> , Graham	GCMV-2	BAMAZ	GSe	20± 3	12	28	
Θ			◦		<i>Gonyaulax spinifera</i> , (Claparède & Lachmann) Diesing	GSCQ-1	BACO	GSe	20± 3	12	28	
Θ	•	■	◦		<i>Lingulodinium polyedrum</i> , (Stein) Dodge	LPCQ-1	BACO	GSe	20± 3	12	28	
Θ			* ◦	◇	▣	<i>Prorocentrum belizeanum</i> , Faust	PBHV-1	CUBA	f/2+Se	25± 3	12	28
Θ				◇	▣	<i>Prorocentrum belizeanum</i> , Faust	CCMP2633	Belice	L1	25± 3	12	28
Θ				◇	▣	<i>Prorocentrum lima</i> , (Ehrenberg) Stein	PLHV-1	CUBA	GSe	20± 3	12	28
Θ			* ◦	◇	▣	<i>Prorocentrum lima</i> , (Ehrenberg) Stein	PL6	El Pardito B.C.S.	f/2+Se	25± 3	12	28
Θ			* ◦	◇		<i>Prorocentrum maculosum</i> , Faust	PMHV-1	CUBA	f/2+Se	25± 3	12	28
Θ		■		◇	▣	<i>Prorocentrum rhathymum</i> , Loeblich, Sherley & Schmidt	PXPV-1	BAPAZ	GSe	20± 3	12	28
Θ		■	* ◦	◇	▣	<i>Prorocentrum rhathymum</i> , Loeblich, Sherley & Schmidt	PXHV-1	CUBA	f/2+Se	20± 3	12	28
Θ		■	* ◦	◇	▣	<i>Prorocentrum minimum</i> , (Pavillard) Schiller	PIPV-1	BAPAZ	GSe	20± 3	12	28
Θ						<i>Prorocentrum hoffmannianum</i> , Faust	CCMP683	Florida	L1	25± 3	12	28
Θ						<i>Prorocentrum hoffmannianum</i> , Faust	Faust	Florida	L1	20± 3	12	28
Θ		■	◦			<i>Protoceratium reticulatum</i> , (Claparède & Lachmann) Bütschli	PRPV-1	BAPAZ	GSe	20± 3	12	28

Fuente: (<http://www.cibnor.gob.mx/eplant1.php?pagID=colecciones/codimar/codimar>), <https://ncma.bigelow.org/>)

Nota:

- ⊖ Especies utilizadas para la amplificación de fragmentos discretos (AFD)
- Δ Especies utilizadas para amplificar el fragmento 18S SSU V4 mediante CE-SSCP
- Especies utilizadas para amplificar el fragmento 28S LSU D2 mediante CE-SSCP
- Especies utilizadas para amplificar el fragmento 28S LSU D7 mediante CE-SSCP
- * Especies utilizadas para amplificar el fragmento 18S SSU V4 mediante HRM
- Especies utilizadas para amplificar el fragmento 28S LSU D2 mediante HRM
- Especies utilizadas para amplificar el fragmento 28S LSU D7 mediante HRM
- ◇ Especies utilizadas para amplificar el fragmento 28S LSU D5 mediante HRM
- ▣ Especies utilizadas para amplificar el fragmento ITS 1 e ITS 2 mediante HRM
- ▼ Especies utilizadas para identificación especie específica (IES) mediante PCR
BACO, Bahía Concepción; BAPAZ, Bahía de la Paz; BAMAZ, Bahía Mazatlán

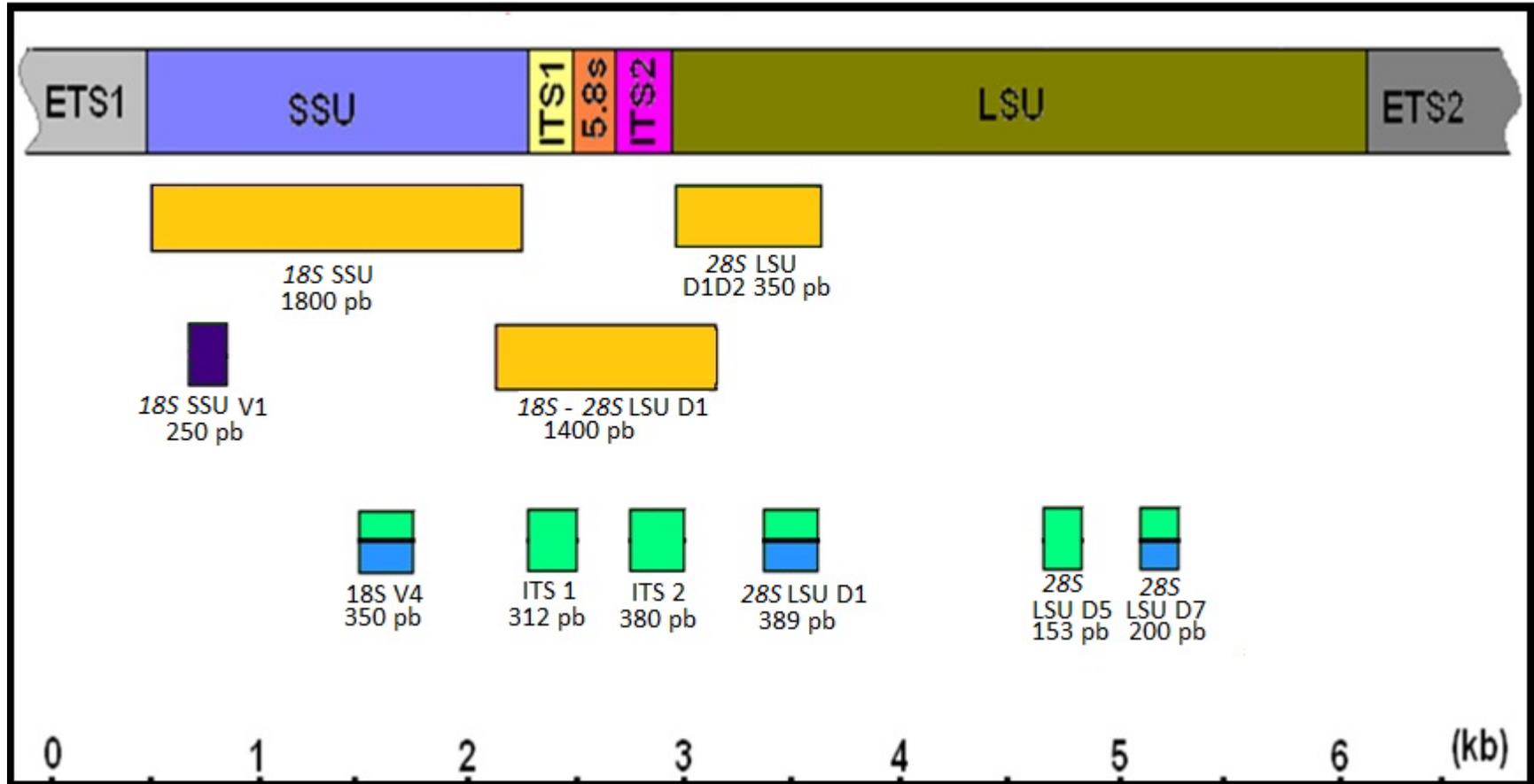


Figura 4. Modelo de un fragmento de ADN ribosomal. Los bloques amarillos representan la amplificación de fragmentos discretos (AFD) utilizados para el diseño de sondas de hibridación y cebadores especie-específicos, los bloques azules representan los fragmentos utilizados para la metodología CE-SSCP, los bloques verdes representan fragmentos utilizados en la metodología de HRM y el bloque púrpura representa el fragmento utilizado para IES.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación de fragmentos específicos mediante PCR

A partir de la amplificación de fragmentos discretos mediante PCR, se obtuvieron 45 secuencias para los genes ribosomales 18S SSU, ITS 1-5.8S-ITS 2, 28S LSU D1-D3 y 28S LSU D5-D8 y 13 secuencias para el gen mitocondrial *Cytb* (Tabla II). Los tamaños de las secuencias fueron variables (327 a 3619 pb).

Tabla II. Registro de secuencias de ADN obtenidas durante este estudio.

Especie	Cepa	Región	Tamaño fragmento (pb)	Número de acceso Genbank
<i>Alexandrium margalefii</i>	AMCQ-1	SSU-LSU	2583	JQ616827
		LSU D5-D8	985	JQ638948
		Cytb	328	KJ410753
<i>Akashiwo sanguinea</i>	ASPV-1	LSU D1-D2	587	JQ616840
		LSU D5-D6	495	JQ616839
		LSU D7-D8	333	JQ616838
<i>Ceratium balechii</i>	CBMV-1	SSU-LSU	1297	JQ638944
		SSU	339	JQ638929
		LSU D5-D8	1105	JQ638947
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CPPV-1	SSU-LSU	3619	JQ616826
		LSU D5-D8	1073	JQ616831
		Cytb	328	KJ410749
<i>Coolia monotis</i>	CMHV-1	5.8 S -LSU	864	JQ638942
		SSU	566	JQ616828
	CMPV-1	5.8 S -LSU	995	JQ638943
		SSU	1047	JQ638931
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCV-11	SSU-LSU	1965	JQ616825
		SSU	597	JQ616829
		LSU D5-D8	1077	JQ616844
	GCMV-2	SSU-LSU	1389	JQ638941
		SSU	936	JQ638928
		LSU D5-D8	1077	JQ616841

Tabla II. Continuación

Especie	Cepa	Región	Tamaño fragmento (pb)	Número de acceso Genbank
<i>Gonyaulax spinifera</i>	GSCQ-1	ITS-LSU	2288	JQ638936
		SSU	833	JQ638933
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	LPCQ-1	SSU-LSU	3022	JQ616824
		LSU D5-D8	1063	JQ616830
<i>Prorocentrum belizeanum</i>	PBHV-1	SSU-LSU	2962	JQ638934
		LSU D5-D8	671	JQ638946
		Cytb	327	KF885219
	CCMP2633	SSU-LSU	2964	KF885226
		COB	327	KF885221
<i>Prorocentrum hoffmannianum</i>	CCMP683	SSU-LSU	2963	KF885225
		Cytb	327	KF885223
	CCMP2804	SSU-LSU	2946	KF885224
		Cytb	327	KF885222
<i>Prorocentrum lima</i>	PLHV-1	SSU	643	JQ638930
		LSU D5-D8	1093	JQ616843
		LSU D1-D2	1189	JQ616842
		Cytb	327	KJ410748
	PBT	Cytb	328	KJ410750
	PLC16	Cytb	328	KJ410752
	PL6	5.8S-LSU D1-D3	1486	JQ616837
		LSU D5-D8	1086	JQ616836
		Cytb	327	KJ410755
	<i>Prorocentrum minimum</i>	PIPV-1	SSU-LSU	3433
LSU D5-D8			1145	JQ616845
<i>Prorocentrum maculosum</i>	PMHV-1	SSU-LSU	3500	JQ638940
		LSU D5-D8	1090	JQ638945
		Cytb	327	KF885220
<i>Prorocentrum rhathymum</i>	PXPV-1	SSU-LSU	3376	JQ616822
		LSU D5-D8	1074	JQ616832
		Cytb	327	KJ410751
	PXHV-1	SSU-LSU	2499	JQ638938
		LSU D5-D8	1074	JQ616833
		Cytb	327	KJ410754
<i>Protoceratium reticulatum</i>	PRPV-1	SSU-LSU	1870	JQ638939
		LSU D1-D2	396	JQ616834
		LSU D5-D8	644	JQ616835

7.2 Análisis de comunidades

7.2.1 Análisis individual de cultivos de dinoflagelados, mediante CE-SSCP (Herrera et al. 2013)

Con base a la tasa de evolución del ADN ribosomal (ADNr), se seleccionaron tres regiones de genes ribosomales altamente variables para su evaluación mediante CE-SSCP. Utilizando oligos universales para eucariontes, que amplifican la región 18S SSU V4 (**Fig. 5**), se obtuvo un amplicón de 350 pb a partir del ADN genómico extraído de cultivos puros de *A. sanguinea* (ASPV-1) y *G. catenatum* (GCMV-2). Al analizar estos productos mediante CE-SSCP, se observan múltiples picos de fluorescencia para ambas especies, sin embargo, si el análisis de datos se realiza considerando únicamente los picos más altos, las especies individuales pueden resolverse.

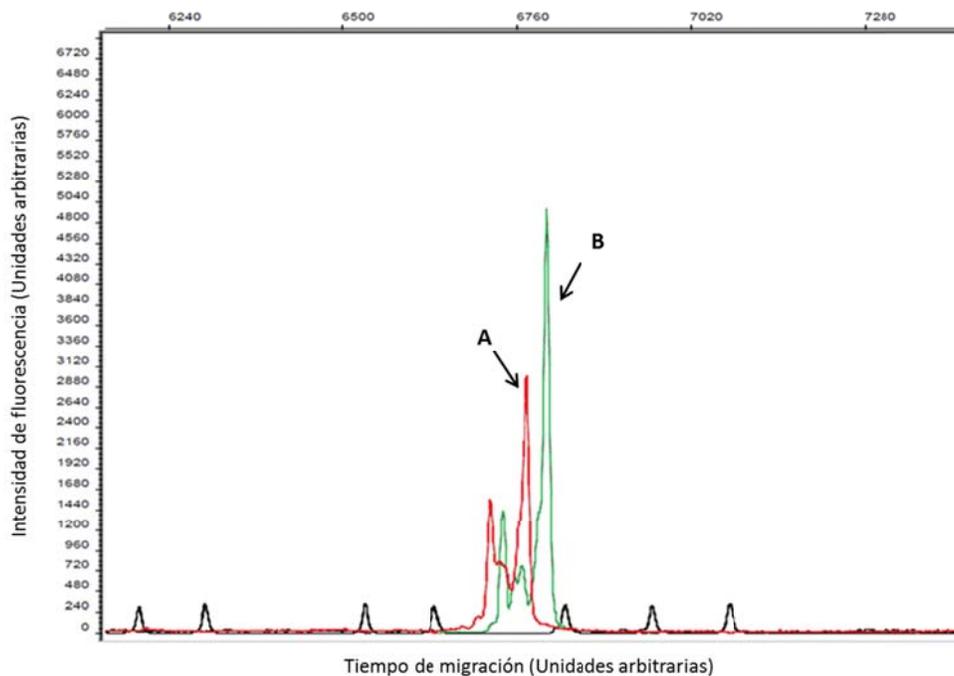


Figura 5. Perfil de separación del fragmento 18S SSU V4 (359 pb) mediante CE-SSCP. A) *A. sanguinea* (rojo) y B) *G. catenatum* (verde). Picos color negro representan el estándar de migración interno. Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de fluorescencia (eje de las Y) están indicadas en unidades arbitrarias proporcionadas por el software GenScan.

Dados estos resultados, la región variable 28S LSU D2 fue amplificada para varias especies, obteniendo en todos los casos amplicones de 389 pb. En la **Figura 6** se muestra el resultado obtenido a partir de los amplicones de *A. margalefii* (AMCQ-1), *A. sanguinea* (ASPV-1), *C. monotis* (CMHV-1), *G. catenatum* (GCMV-2), *L. polyedrum* (LPCQ-1), *C. polykrikoides* (CPPV-1) y *C. balechii* (CBMV-1), en el que se observa que todos los picos se traslapan, a excepción del correspondiente a *G. catenatum* que claramente se resuelve.

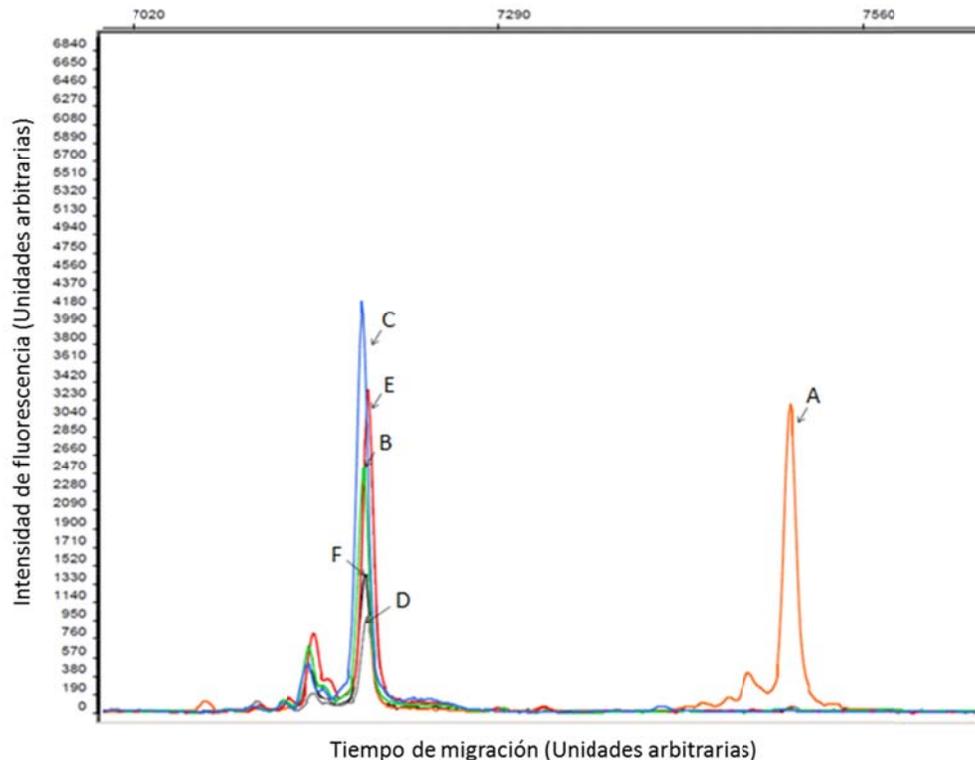


Figura 6. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D2 (389 pb) mediante CE-SSCP. A) *G. catenatum* (GCMV-2), B) *A. sanguinea* (ASPV-1), C) *A. margalefii* (AMCQ-1), D) *L. polyedrum* (LPCQ-1), E) *C. polykrikoides* (CPPV-1), y F) *C. balechii* (CBMV-1). Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de fluorescencia (eje de las Y) están indicadas en unidades arbitrarias proporcionadas por el software GenScan.

Cuando se analizó la región 28S LSU D7 se obtuvo un amplicón de 200 pb. En la **Figura 7** se muestra el electroferograma de los amplicones D7 para las especies *A. margalefii* (AMCQ-1), *A. sanguinea* (ASPV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. rathymum* (PXHV-1), *P. reticulatum*

(PRPV-1) y *L. polyedrum* (LPCQ-1). En esta figura se pueden distinguir fácilmente cada una de las especies analizadas, básicamente en función del tiempo de retención (**Fig. 8**).

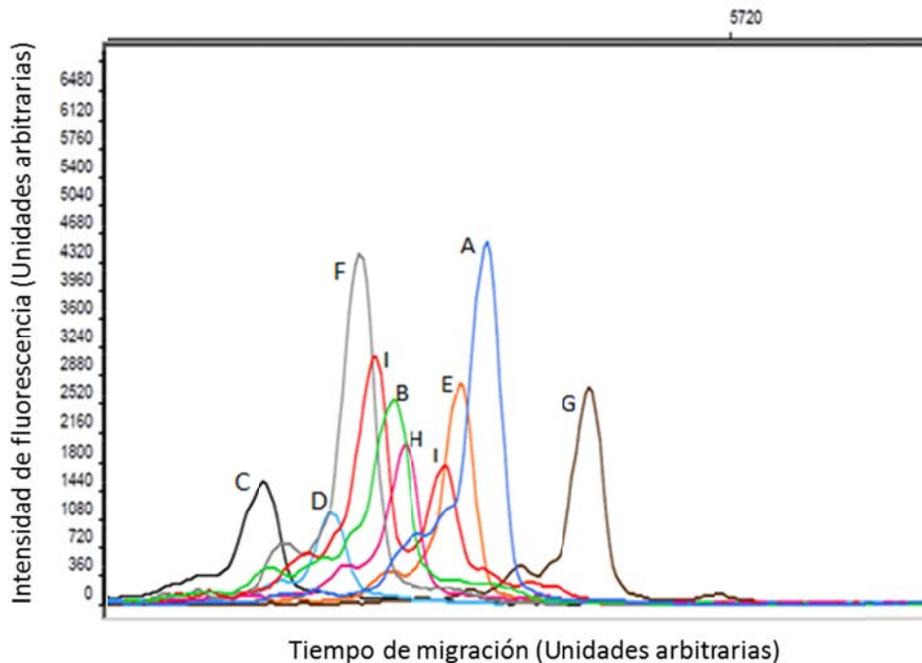


Figura 7. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D7 (200 pb) mediante CE-SSCP. A) *A. margalefii* (AMCQ-1), B) *A. sanguinea* (ASPV-1), C) *C. balechii* (CBMV-1), D) *C. polykrikoides* (CPPV-1), E) *P. minimum* (PIPV-1), F) *P. rathymum* (PXHV-1), G) *P. reticulatum* (PRPV-1), H) *L. polyedrum* (LPCQ-1) y I) *G. catenatum* (GCCV-1). Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de fluorescencia (eje de las Y) están indicadas en unidades arbitrarias proporcionadas por el software GenScan.

Con base en los resultados altamente resolutivos para diferentes especies, este fragmento se usó para analizar varias cepas de la misma especie, con la finalidad de probar el poder resolutivo intraespecífico en CE-SSCP. En el caso de *P. rathymum* (cepas PXHV-1 y PXPV-1), no se mostraron diferencias entre las diferentes cepas, ya que la especie fue reconocida como un mismo pico (**Fig. 8B**), mientras que en el caso de *G. catenatum* (cepas GCMV-2 y GCCV-11) la presencia de múltiples picos se observó para ambas cepas (conservando el mismo patrón de picos), aun cuando las condiciones de amplificación fueron optimizadas (**Fig. 8A**).

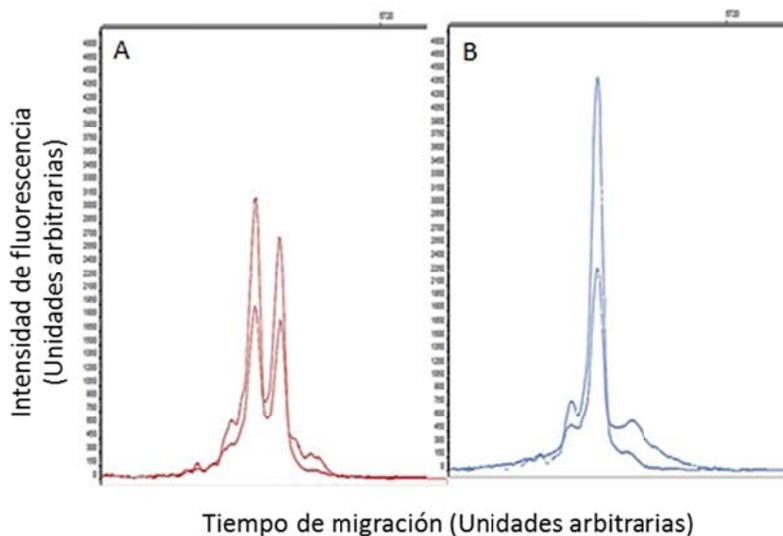


Figura 8. Perfil de separación del fragmento 28S LSU D7 (200 pb) mediante CE-SSCP, probando diferentes cepas/aislamientos de la misma especie. Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de fluorescencia (eje de las Y) están indicadas en unidades arbitrarias proporcionadas por el software GenScan. Panel A) *G. catenatum* (GCCV-11 y GCMV-2); Panel B) *P. rathymum* (PXPV-1 y PXHV-1).

7.2.2 Análisis de comunidades mediante HRM

Bajo la premisa de la alta variabilidad de algunas regiones ribosomales como son los dominios 18S SSU V4 y 28S LSU D2, estas regiones fueron amplificadas por PCR y subsecuentemente sometidas a análisis de disociación utilizando la metodología HRM. Utilizando oligos universales para eucariontes se obtuvo un amplicón de 350 pb (18S V4, **Fig. 4**) a partir de ADN genómico extraído de cultivos de *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. lima* (PLHV-1), *P. maculosum* (PBHV-1) y *P. rathymum* (PXHV-1). El perfil de disociación (**Fig. 9**) muestra múltiples picos de fluorescencia (comparable para todas especies); las temperaturas de disociación para cada especie se presentan en la **Tabla III**.

La región variable D2 fue amplificada para varias especies, generando para todos los casos amplicones de 389 pb. En la **Figura 10** se muestra el perfil de disociación de los

Tabla III. Temperaturas de disociación obtenidas para los fragmentos 18S SSU V4, 28S LSU D2, 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS 1 e ITS 2.

Región	Especie	Cepa	Temperatura de disociación (° C)		
			Pico 1	Pico 2	Pico 3
18S SSU V4	<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	76.55	83.73	
	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	75.45	83.68	
	<i>P. lima</i>	PLHV-1	79.5	83.5	
	<i>P. rhathymum</i>	PXHV-1	75.55	83.8	
	<i>P. maculosum</i>	PMHV-1	79.1	83.6	
28S LSU D2	<i>A. margalefii</i>	AMCQ-1	87.08		
	<i>A. sanguinea</i>	ASCQ-1	87.05		
	<i>C. balechii</i>	CBMV-1	87.15		
	<i>C. monotis</i>	CMHV-1	86.85		
	<i>C. monotis</i>	CMPV-1	86.98		
	<i>C. polykrikoides</i>	CPPV-1	86.95		
	<i>G. catenatum</i>	GCCV-11	87.45		
	<i>G. catenatum</i>	GCMV-2	82.88	83.6	87.45
	<i>G. spinifera</i>	GSCQ-1	87.32		
	<i>L. polyedrum</i>	LPCQ-1	87.12		
	<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	87.1		
	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	87.17		
	<i>P. maculosum</i>	PMHV-1	87.27		
	<i>P. reticulatum</i>	PRPV-1	87.23		
	<i>P. rhathymum</i>	PXHV-1	87.1		
28S LSU D5	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	85.75		
	<i>P. rhathymum</i>	PXHV-1	85.67		
	<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	87.55		
	<i>P. maculosum</i>	PMHV-1	87.45		
	<i>P. lima</i>	PLHV-1	87.40		
28S LSU D7	<i>P. rhathymum</i>	PXPV-1	84.90		
	<i>P. rhathymum</i>	PXHV-1	84.90		
	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	85.10		
	<i>P. maculosum</i>	PMHV-1	86.04		
	<i>P. lima</i>	PLHV-1	85.90		
	<i>P. lima</i>	PL6	85.96		
	<i>P. lima</i>	PBT	86.10		
	Proro. Mix	ProroMix	85.10		
ITS 1	<i>P. rhathymum</i>	PXHV-1	85.76	86.86	87.94
	<i>P. rhathymum</i>	PXPV-1	85.24	86.70	
	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	87.24		
	<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	88.50		
	Proro mix		87.20		
	<i>P. lima</i>	PLHV-1	85.16	86.40	87.654
	<i>P. lima</i>	PL6	86.26	87.10	
<i>P. lima</i>	PBT	86.30			

ITS 2		<i>P. rathymum</i>	PXPV-1	87.68		
		<i>P. rathymum</i>	PXHV-1	87.90		
		<i>P. minimum</i>	PIPV-1	87.68		
		<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	88.76		
		<i>Proro mix</i>		87.68		
		<i>P. lima</i>	PLHV-1	87.04		
		<i>P. lima</i>	PL6	87.54		
		<i>P. lima</i>	PBT	87.06		

7.2.3. Identificación de especies pertenecientes al género *Prorocentrum*, mediante HRM.

Se decidió emplear la técnica de HRM para la identificación de especies del género *Prorocentrum*, debido a que de este grupo se tiene un mayor número de especies; lo cual permitiría retar la sensibilidad de esta metodología y aportar información sobre este género. En la **Figura 11**, se presentan los perfiles de disociación obtenidos para las regiones 28S LSU D5 (138 pb), 28S LSU D7 (180 pb), ITS 1 (320 pb) e ITS 2 (380 pb) respectivamente. En la **Tabla III** se presentan las temperaturas de disociación generada para cada especie de acuerdo a la región analizada.

En la **Figura 11**, panel **A** y **B**, se puede observar en los perfiles de disociación correspondientes a los fragmentos 28S LSU D5 y 28S LSU D7 una clara separación de dos grupos, basada en los hábitos de estos organismos, es decir, un grupo perteneciente a los Prorocentrales bentónicos y otro a los Prorocentrales planctónicos. Por otra parte el perfil de HRM del fragmento del ITS 1 (**Fig. 11 C**) se generan múltiples picos para algunas de las especies, mientras que el perfil del fragmento ITS 2 (**Fig. 11 D**) se obtuvieron picos únicos para las especies, incluso es posible separar 3 cepas de la especie *P. lima*, así como una ligera separación entre las 2 cepas de *P. rathymum*; sin embargo, no se logró obtener una separación óptima de las cepas de hábitos planctónicos *P. minimum* y *P. rathymum*.

7.2.3.1 Análisis de secuencias. Con base en los perfiles HMR obtenidos para los fragmentos 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS1 e ITS2, se consideró necesario obtener sus secuencias, con la finalidad de corroborar y comprender los resultados obtenidos. Las secuencias obtenidas para el fragmento ITS2, no presentan homología con las secuencias

registradas en la base de datos del GenBank, por lo que fue necesario ligar en vector y clonar este fragmento. Mediante este procedimiento se hizo evidente la presencia de múltiples copias de este fragmento, específicamente en *P. minimum* y *P. lima* (PL6) (datos no presentados). Para los fragmentos 28S LSU D5, 28S LSU D7, ITS1 e ITS2. Se realizó un análisis de composición de bases de las secuencias (**Tabla IV**).

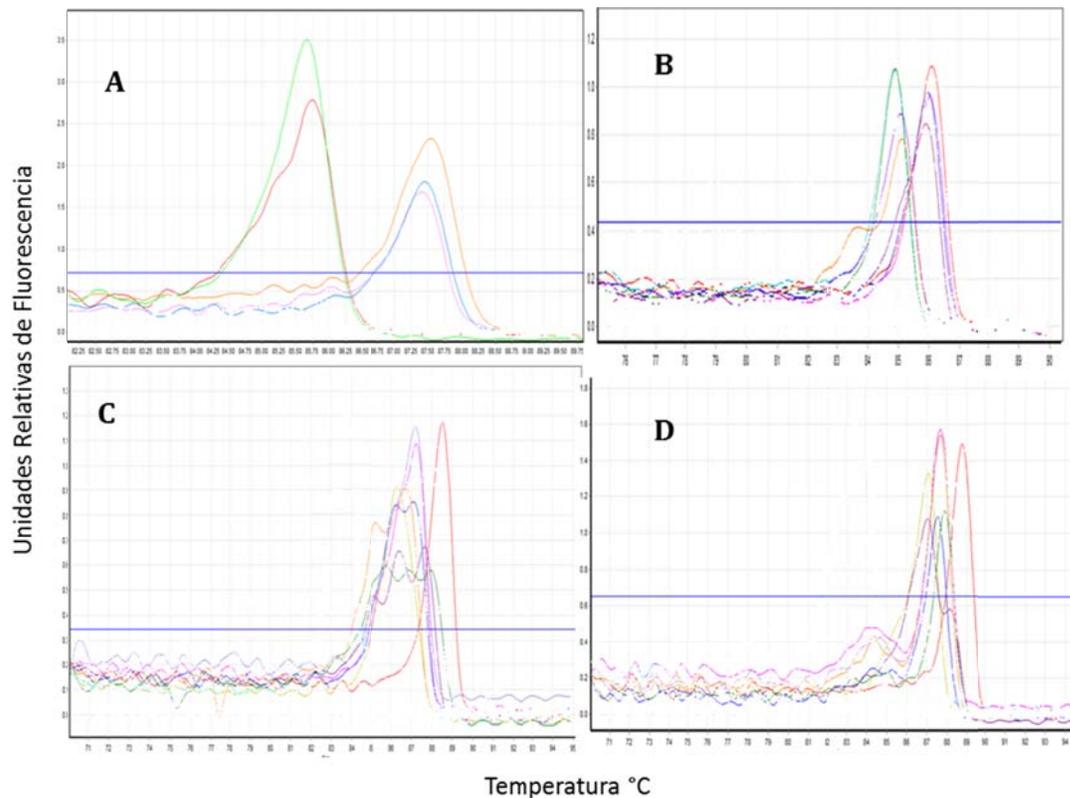


Figura 11. Perfil de HRM para los fragmentos: **A)** 28S LSU D5, **B)** 28S LSU D7, **C)** ITS 1 y **D)** ITS 2. **A)** *P. rhathymum* (PXHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. maculosum* (PMHV-1) y *P. lima* (PLHV-1); **B)** *P. rhathymum* (XPV-1, PXHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. maculosum* (PMHV-1), *P. lima* (PLHV-1, PL6, PBT) y mezcla de Procentrales (Proromix); **C)** *P. rhathymum* (XPV-1 y PXHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. maculosum* (PMHV-1), *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. lima* (PBT, PL6, PLHV) y Mezcla de Procentrales (Proromix); **D)** *P. rhathymum* (XPV-1 y PXHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. maculosum* (PMHV-1), *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. lima* (PBT, PL6, PLHV) y Mezcla de Procentrales (Proromix).

Tabla IV. Análisis de composición de secuencias nucleotídicas para los fragmentos 28S LSU D5, 28S LSU D7 e ITS 1

Región	Especie	Cepa	Tamaño (pb)	G	C	GC%	A	T
28S LSU D5	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXPV-1	153	51	29	52.3	35	38
	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXHV-1	153	51	29	52.3	35	38
	<i>Prorocentrum minimum</i>	PIPV-1	153	50	30	52.3	36	37
	<i>Prorocentrum lima</i>	PLHV-1	153	53	33	56.2	35	32
	<i>Prorocentrum lima</i>	PL6	153	54	33	56.9	34	32
	<i>Prorocentrum lima</i>	PBT	153	54	33	56.9	34	32
	<i>Prorocentrum maculosum</i>	PMHV-1	153	55	32	56.8	34	32
28S LSU D7	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXPV-1	200	47	51	49	48	54
	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXHV-1	200	47	51	49	48	54
	<i>Prorocentrum minimum</i>	PIPV-1	199	48	52	50.2	44	55
	<i>Prorocentrum lima</i>	PLHV-1	198	50	50	49.1	42	56
	<i>Prorocentrum lima</i>	PL6	198	50	50	49.1	42	56
	<i>Prorocentrum lima</i>	PBT	198	50	50	49.1	42	56
	<i>Prorocentrum maculosum</i>	PMHV-1	198	50	51	51.1	42	55
ITS 1	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXPV-1	303	78	73	49.8	64	88
	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXHV-1	306	83	76	51.9	65	82
	<i>Prorocentrum minimum</i>	PIPV-1	300	82	75	52.3	64	79
	<i>Prorocentrum lima</i>	PL6	292	87	66	52.4	65	74
	<i>Prorocentrum lima</i>	PBT	293	87	67	52.6	64	75
	<i>Prorocentrum maculosum</i>	PMHV-1	289	78	49	44	66	96
	<i>Prorocentrum belizeanum</i>	PBHV-1	285	91	69	56.1	59	66

Las regiones 28S LSU D5 y 28S LSU D7 están altamente conservadas en los Prorocentrales bentónicos (100% similitud), mientras que en los Prorocentrales planctónicos se presentan 3 o 4 sustituciones en las secuencias nucleotídicas; estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante HRM. Sin embargo, es importante mencionar que esta información no es de utilidad para llevar a cabo la diferenciación de estas especies. En el caso de la región del ITS 1, se observa una gran variabilidad entre las especies planctónicas y bentónicas, esto puede deberse al tamaño del fragmento (310 pb).

aprox.) por lo que se generan múltiples picos o probablemente este resultado puede deberse al alineamiento inespecífico de los cebadores y/o a la generación de dímeros (ya que se trabajó con cebadores degenerados). La composición de nucleótidos de los fragmentos evidencia las diferencias observadas entre las curvas de disociación de *P. maculosum* (PMHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. belizeanum* (PBHV-1) y *P. lima* (PBT).

7.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación

7.3.1 Diseño de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género *Prorocentrum*

En la **Tabla V** se muestran las características generales de los dos lotes de las sondas oligonucleotídicas diseñadas con el software ARB, tomando como base las secuencias completas y parciales de las subunidades ribosomales pequeña (18S SSU) y grande (28S LSU) de dinoflagelados disponibles en las bases de datos internacionales y las generadas en este estudio. En total, se diseñaron diez sondas especie específicas para *P. belizeanum*, *P. maculosum* y *P. rathymum*, así como tres sondas para identificación de Prorocentrales basado en sus hábitos (planctónicos y bentónicos, respectivamente).

Una vez que las sondas fueron diseñadas, se utilizó la función Probe Design (ARB) para considerar el número de disparidades (*mismatches*) con secuencias no flanqueantes, así como su posición (al centro o en los extremos de la sonda). La especificidad teórica de las sondas fue calculada utilizando la función Match (ARB), para aplicarse en formato de microarreglo (primer lote) y en formato de células completas (WCFISH) en filtros de policarbonato (segundo lote de sondas).

7.3.2 Pruebas de especificidad de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género *Prorocentrum* en formato de microarreglo

Como se mencionó anteriormente, para determinar la especificidad del primer lote de sondas se usó la primera versión del microarreglo generado en el “MIDTAL Project”; este microarreglo incluye sondas específicas para varias especies formadoras de FAN. En las **Figuras 12 y 13**, se presentan los resultados obtenidos para la hibridación en el microarreglo, utilizando ARN de las especies de *P. lima* (**Fig. 12**) y *P. micans* (**Fig. 13**), respectivamente. De manera general, podemos resumir que se obtuvo reconocimiento inespecífico para todas las sondas del primer lote, únicamente se seleccionó la sonda de los específica para los Prorocentrales bentónicos, la cual fue incluida en la versión 3.0 del microarreglo del proyecto MIDTAL. Debido a la baja especificidad del primer lote de sondas, se diseñó un segundo lote de sondas para las especies *P. maculosum* y *P. belizeanum*.

7.3.3 Pruebas de especificidad de sondas de hibridación para la identificación especie específica de dinoflagelados del género *Prorocentrum*, formato de WC-FISH en filtros de policarbonato.

Un problema recurrente en la metodología WC-FISH es cuando la señal de autofluorescencia de las células es tan fuerte que enmascara la señal de hibridación. Debido a ello en este estudio se utilizaron filtros “long pass”, ya que estos permiten discernir entre la señal de autofluorescencia de la verdadera señal de la sonda. Este paso es esencial para llevar a cabo la estandarización de la metodología WC-FISH.

Al llevar a cabo la estandarización de las condiciones de hibridación en filtros de policarbonato utilizando la sonda PmacuSSU, se observó que uno de los cuellos de botella es la alta señal de autofluorescencia de *P. maculosum*, la cual fue evidenciada con los filtros “long pass” (**Fig. 14**). Bajo las condiciones experimentales probadas, se determinó que las mejores condiciones para la hibridación y detección de la sonda PmacuSSU son:

fijación de las muestras con formaldehído al 1.9%, incubando durante toda la noche con metanol (**Fig. 15**). Temperatura de hibridación de 50 °C (**Fig. 16**), incorporando el pretratamiento físico de las células, incubando a 80 °C por 20 min en etanol al 50% (**Fig. 17**). Finalmente, se llevaron a cabo pruebas de hibridación cruzadas (**Fig. 18**) en donde puede apreciarse que hay una mayor intensidad en la señal de FITC cuando se utilizó la sonda Plim02 en comparación con la señal obtenida para la sonda PmacuSSU.

Tabla V. Sondas de hibridación diseñadas para el grupo de Prorocentrales

Lote	Nombre sonda	Especificidad	Secuencia	Tamaño (Pb)
1er Lote	Proro Benthic 1	Prorocentrales bentónicos	5'-GAUGCCCAGAUCAAGCCAGAUGCUC-3'	25
	Proro Benthic 2		5'-CCAACUAUCCCCAUUGACCAUJACC-3'	25
	Bel&mac	<i>P. maculosum</i> y <i>P. belizeanum</i>	5'-AUUUAUCGCCAGCGGACGCCAUACG-3'	25
	Proro maculosum	<i>P. maculosum</i>	5'-UUCSSCGUUCAUUCGCGCAUUCUG-3'	25
	Proro mac 2		5'-UGGUGCCCUUUAUCCAAGAGGCCCGCACCUGC-3'	32
	Pro Belizeanum	<i>P. belizeanum</i>	5'-GAGAGCUGCAGAGUUGAA-3'	18
	Planctónicos	Prorocentrales planctónicos	5'- UUCAAGGCGUAAGCCUGVUUGAAAC-3'	25
	Prmex 1	<i>P. rhathymum/mexicanum</i>	5'-GACAAGAAGCGCUGCAACCAGACAC-3'	25
	Prmex 2		5'-UGUGUCAGGGAAACGCCAGUCACC-3'	25
2do Lote	PmacuSSU	<i>P. maculosum</i>	5'-TCACCGAAGGGCCAGGCA-3'	18
	Pmacu competitor	<i>P. belizeanum</i>	5'-TCACCGAATGGCCAGGCA-3'	18
	PbelSSU	<i>P. belizeanum</i>	5'-TCACCGAATGGCCAGGCA-3'	18
	Pbel competitor	<i>P. maculosum</i>	5'-TCACCGAAGGGCCAGGCA-3'	18

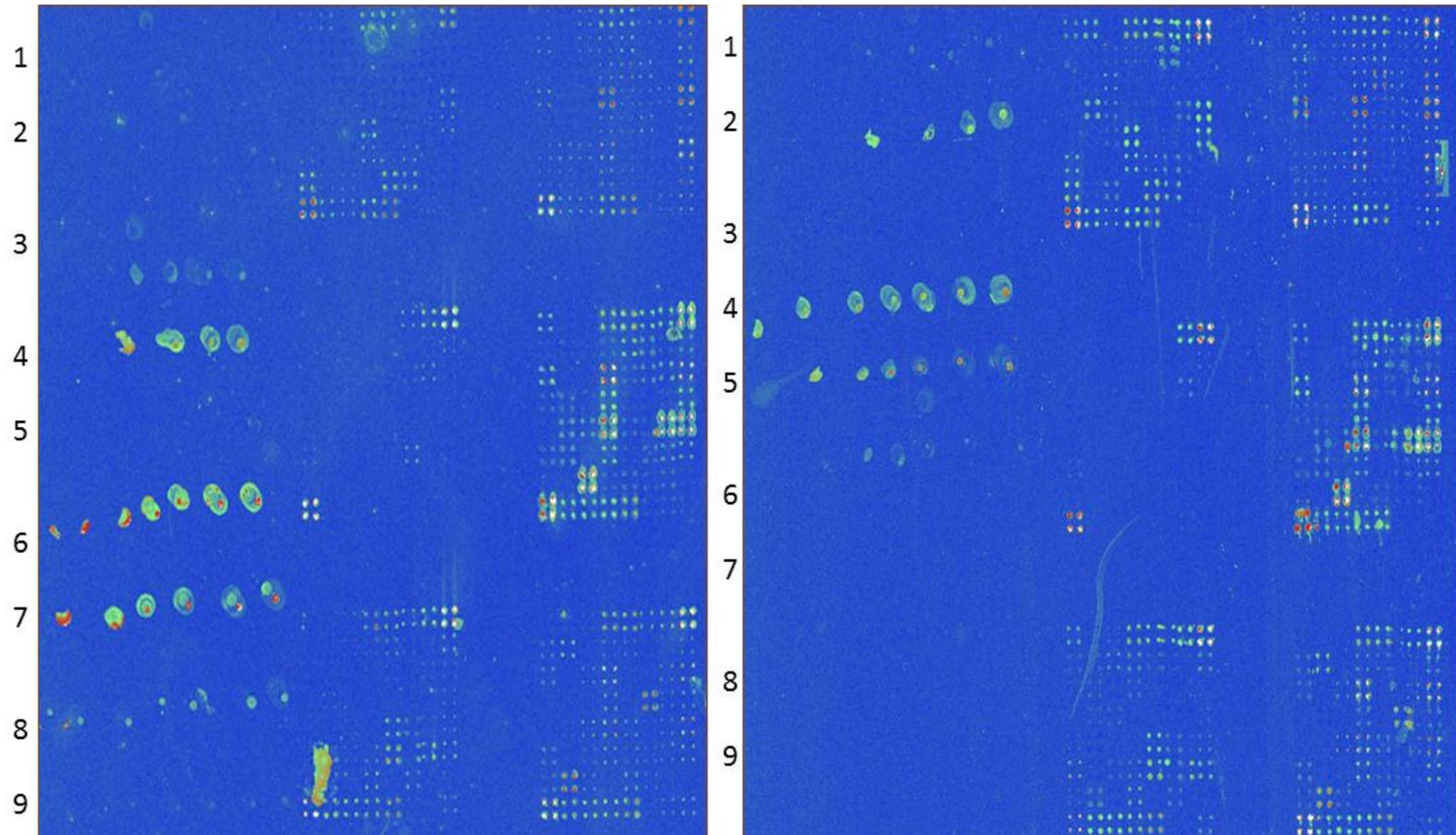


Figura 12. Imágenes del lector de microarreglo hibridando a 45 °C, utilizando ARN de la especie *Prorocentrum lima* (558C). Las sondas diseñadas se encuentran en el lado izquierdo de la figura, indicando su ubicación con los siguientes números: 1) Proro Benthic 1, 2) Proro Benthic 2, 3) Bel&mac, 4) Proro maculosum, 5) Proro mac 2, 6) Pro Belizeanum, 7) Planctónicos, 8) Prmex 1 y 9) Prmex 2.

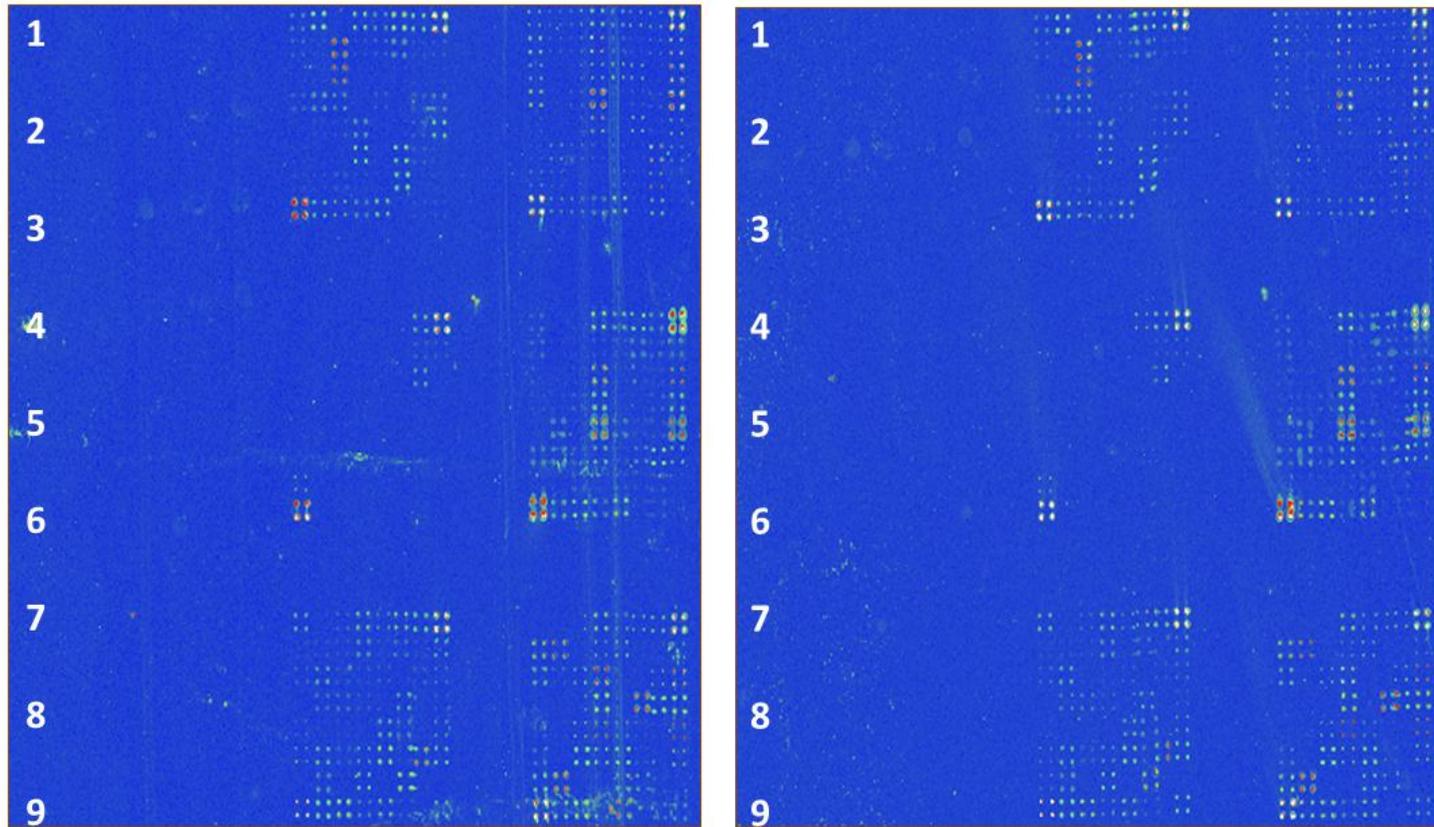


Figura 13. Imágenes del lector de microarreglo hibridando a 45 °C, utilizando ARN de *P. micans* (97B). Las sondas diseñadas se encuentran en el lado izquierdo de la figura, indicando su ubicación con los siguientes números: 1) Proro Benthic 1, 2) Proro Benthic 2, 3) Bel&mac, 4) Proro maculosum, 5) Proro mac 2, 6) Pro Belizeanum, 7) Planctónicos, 8) Prmex 1 y 9) Prmex 2.

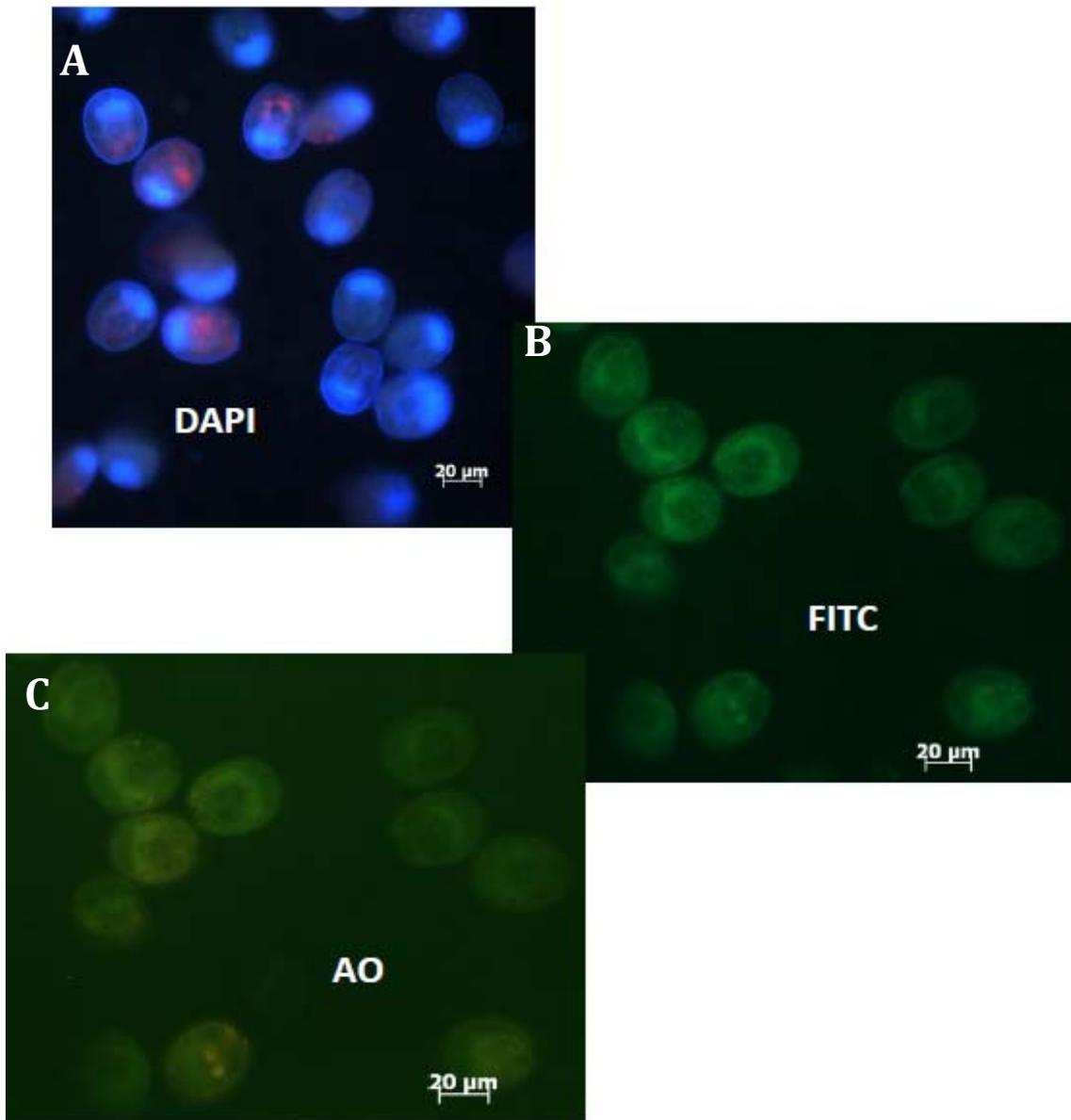


Figura 14. Control de auto fluorescencia (sin sonda) de las células de *Prorocentrum maculosum*, visualizada con filtros “long pass”. Las células se fijaron con solución etanol-salina durante 1 h. a TA y posteriormente se incubaron en dimetilformamida al 50% a TA. Panel A, Señal de DAPI, tiempo de exposición 660.0 ms; Panel B, Señal de FITC, tiempo de exposición 1.19 s; Panel C, señal de naranja de acridina (AO), tiempo de exposición 1.59 s. Los puntos rojos observados en el panel A, representan el contenido de clorofila en las células.

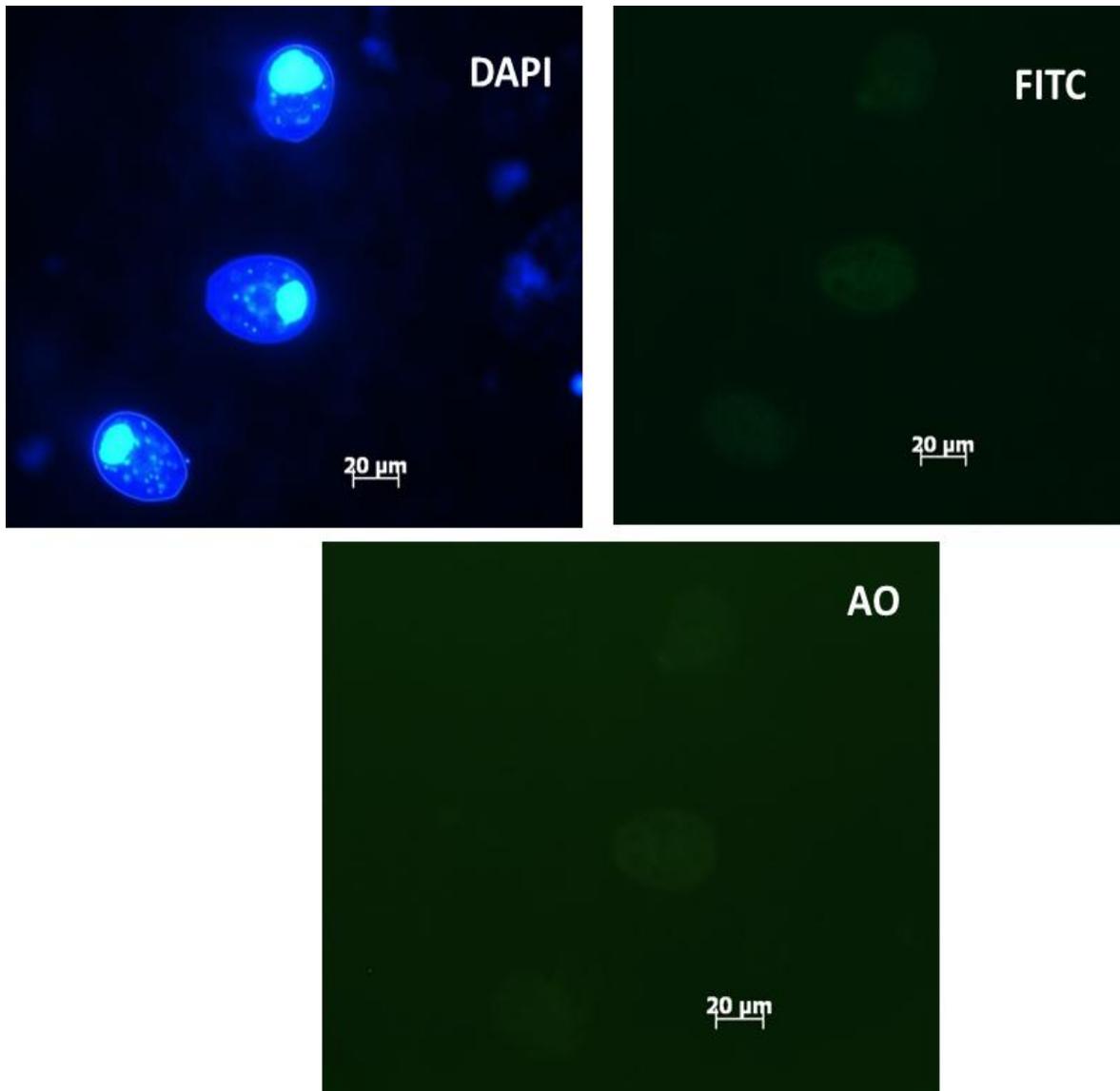


Figura 15. Control de auto fluorescencia (sin sonda) de *Prorocentrum maculosum*, visualizada con filtros “long pass”. Las células se fijaron en formaldehído al 1.9% durante 1 h en hielo, posteriormente se incubaron metanol durante toda la noche. Panel A, señal de DAPI, tiempo de exposición 130.2 ms; Panel B, señal de FITC, tiempo de exposición 1.19 s; Panel C, señal de naranja de acridina (AO), tiempo de exposición 1.59 s. La señal de auto fluorescencia se reduce considerablemente en comparación con el método de fijación utilizando solución etanol-salina.

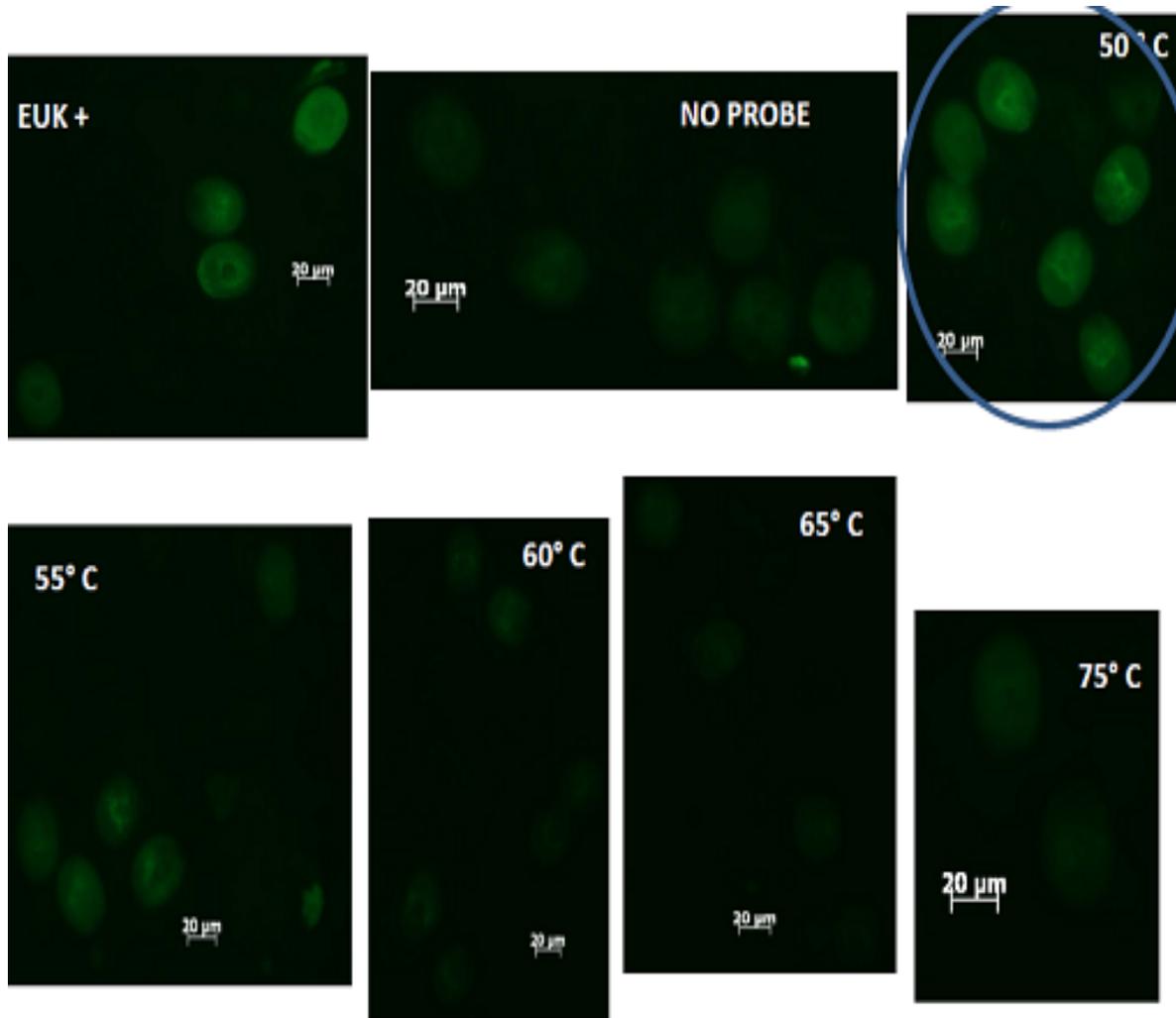


Figura 16. Gradiente de temperatura para la sonda PmacuSSU. Las células de *P. maculosum* fueron fijadas con la solución etanol-salina. El círculo azul indica la mejor temperatura de hibridación.

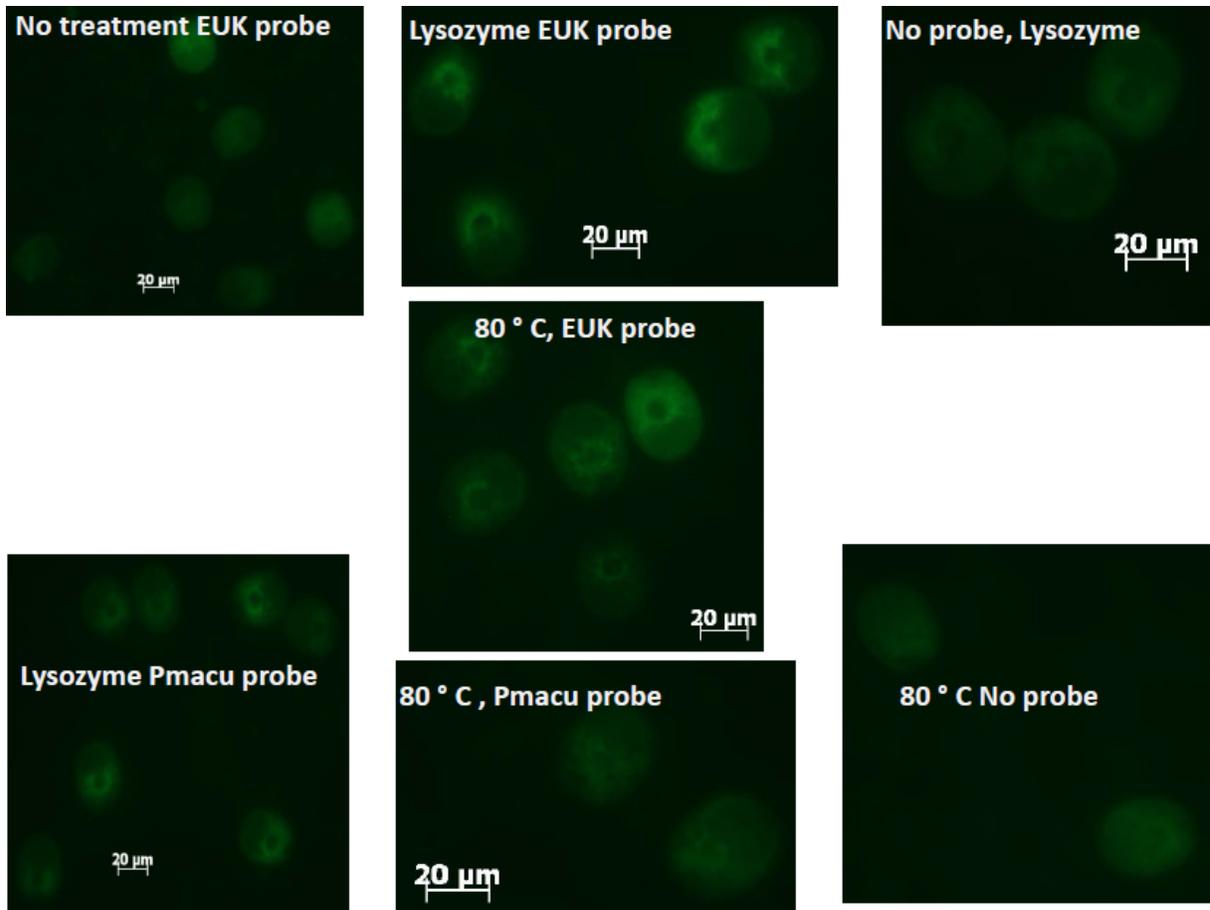


Figura 17. Señal de FITC, obtenida mediante pre-tratamientos físicos, químicos y enzimáticos a las células de *P. maculosum*, utilizados para mejorar la señal de hibridación de la sonda PmacuSSU. *P. maculosum* fue fijada con formaldehído-metanol.

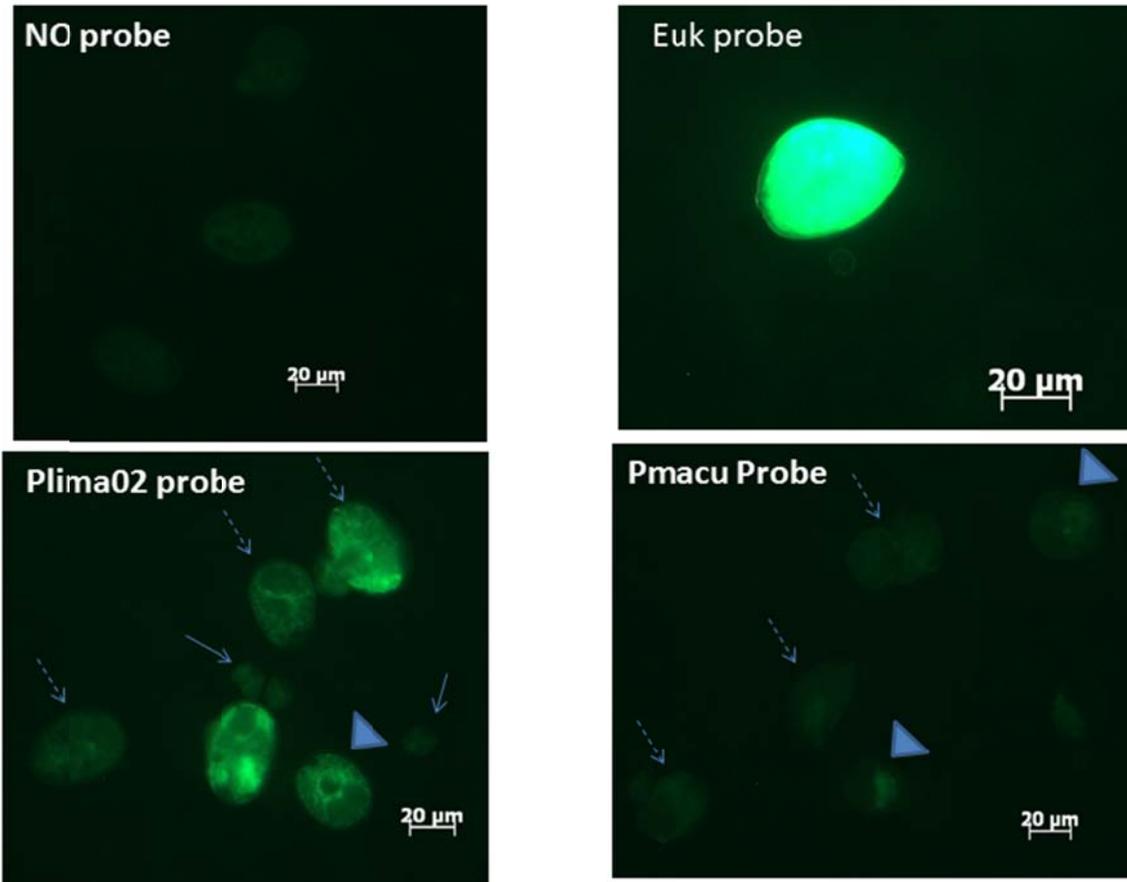


Figura 18. Señal de FITC, obtenida en pruebas de hibridación cruzada para la sonda PmacuSSU. Utilizando una mezcla de las especies *P. minimum*, *P. micans*, *P. lima* (grupos externos) así como *P. maculosum* (PMHV-1). Las células fueron fijadas con el método de formaldehído-metanol. Flechas punteadas corresponden a *P. lima*, Flechas continuas *P. minimum* y el triángulo corresponde a *P. maculosum*. Únicamente en el panel superior derecho se encuentra una célula de *P. micans*. Cepas proporcionadas por la Dra. Lucie Maranda (Universidad de Rhode Island, EUA).

7.4 Diseño y estandarización de cebadores para la identificación especie específica de dinoflagelados del género *Prorocentrum*, mediante PCR

Utilizando la pareja de cebadores HAB SSU 1F + ProbeBel y ADN genómico para las especies seleccionadas (**Tabla II**), se llevaron a cabo pruebas cruzadas para la identificación especie-específica de *P. maculosum*. Se amplificó un fragmento de 250 pb, mediante PCR punto final. Los resultados se presentan en la **Figura 19**.

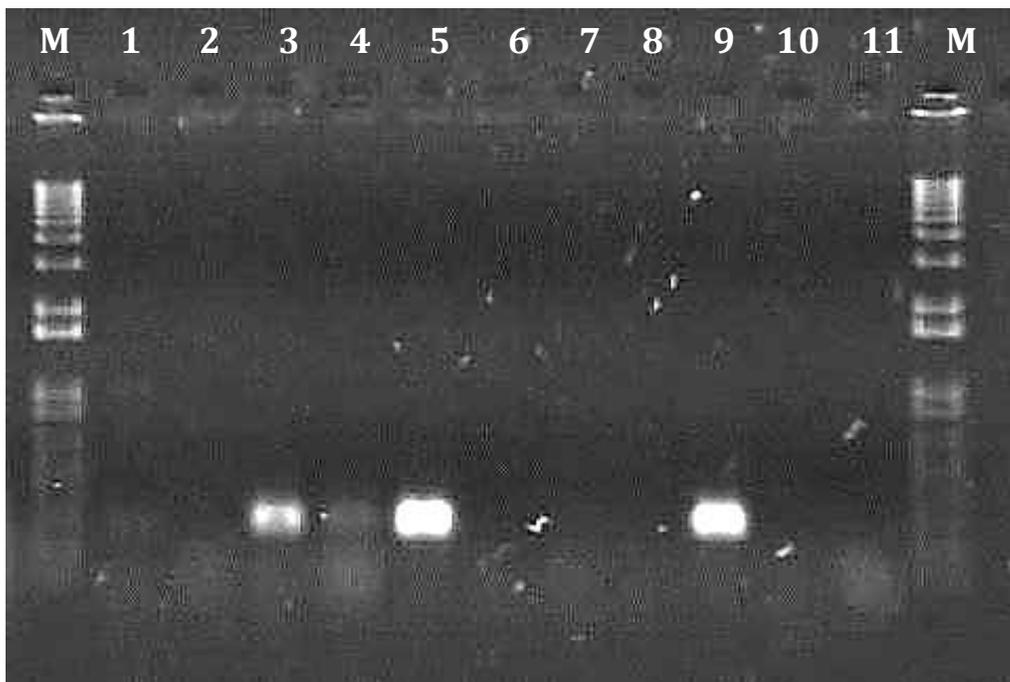


Figura 19. Amplificación de fragmento del 18S SSU V1 (250 pb) mediante PCR punto final. 1) *A. margalefii* (AMCQ-1); 2) *C. monotis* (CMPV-1); 3) *P. hoffmannianum* (CCMP 683); 4) *P. belizeanum* (CCMP 2633); 5) *P. hoffmannianum* (CCMP 2804); 6) *P. minimum* (PIPV-1); 7) *P. lima* (PL6); 8) *P. rathymum* (PXPV-1); 9) *P. maculosum* (PMHV-1; +); 10 -11) (-) Negativo. M) Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

Para el control positivo (**Fig. 19** línea 9, *P. maculosum*) se obtuvo una amplificación del tamaño esperado, sin embargo, se puede observar que con este par de cebadores no se

observa especificidad suficiente, ya que se obtuvo un amplicón del mismo tamaño para *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*, las cuales son especies filogenéticamente cercanas a *P. maculosum*. Mientras que, para la especie utilizada como grupo externo (*A. margalefii*) se presentó la amplificación de dos fragmentos, uno de aproximadamente 1000 pb mientras que el segundo amplicón corresponde al tamaño esperado (250 pb).

7.5 Análisis morfológicos y moleculares (Herrera et al. 2014 en progreso)

7.5.1 Descripción morfológica de las especies *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*.

7.5.1.1 *Prorocentrum belizeanum*. El tamaño de las células de *P. belizeanum* fue variable (**Fig. 20** y **21**, paneles a y b). El largo de la valva fue de 34.10 – 48.40 μm (media, 43.13 \pm 3.01 μm , n= 20) y ancho 29.90 – 44.40 μm (media, 34.83 \pm 2.52). Las células son más amplias en la parte media, haciéndose más estrechas en la región anterior y redondeada en el margen posterior. La variación en la forma de las células expresada como relación L/A presentó valores entre 1.11 y 1.38 (media, 1.24 \pm 0.072) (**Fig. 22**). La relación L/A fue significativamente diferente entre los cultivos de *P. belizeanum* (Anova de una vía; F= 10.12, P<0.05).

La superficie de las valvas presentó ornamentación profunda (reticulata foveata) (**Figs. 20** y **21**, paneles a y b). El patrón de depresiones fue denso, observándose depresiones con tamaños en un rango de 0.610 – 1.250 μm (media 0.803 \pm 0.145 n=40) y forma variables: alargada, redonda u oval. Se observaron poros dentro de las depresiones (**Fig. 23**, paneles a y b). El número promedio de depresiones por valva varió entre 672 - 1050 (media, 867 \pm 100.96, n = 12). El área periflagelar de *P. belizeanum* presenta forma de “V” amplia (wide V), con un largo de 3.57 – 6.00 μm (media 4.61 μm \pm 0.53, n =20) (**Fig. 26**, paneles a y b). La banda intercalar (**Fig. 24**, paneles a y b) y la arquitectura del área periflagellar (**Fig. 26**, paneles a y b), así como la forma y posicionamiento del núcleo (**Fig. 27**) son iguales a la descripción de *P. hoffmannianum* presentada a continuación.

7.5.1.2 *P. hoffmannianum*. El tamaño de las células de *P. hoffmannianum* fue variable (**Figs. 20 y 21**, paneles c y d). El largo de la valva fue de 35.40 – 49.20 μm (media, $44.15 \pm 2.94 \mu\text{m}$, $n=20$) y ancho 28.70 – 44.0 μm (media, 36.61 ± 3.19 , $n=20$). Las células son más amplias en la parte media, haciéndose más estrechas en la región anterior y redondeada en el margen posterior. La variación en la forma de la célula expresada como relación L/A presentó valores entre 1.10 y 1.35 (media 1.22 ± 0.074) (**Fig. 22**).

La superficie de las valvas presentó una ornametación profunda (reticulate foveate) (**Figs. 20 y 21**, paneles c y d). El patrón de depresiones fue denso, observándose depresiones con tamaño de 0.40 – 0.75 μm (media 0.67 ± 0.052 , $n=40$) y forma variables, presentándose desde alargada, redonda u ovalada. Se observaron pequeños poros dentro de las depresiones (**Fig. 23**, paneles c y d). El número promedio de depresiones por valva varió entre 855 – 1013 μm (media 919.89 ± 59.82 , $n=10$). La banda intercalar (**Fig. 24**, paneles c y d) es lisa y aparece como cresta (ridge) alrededor de la célula. La valva derecha presenta una indentación en donde se encuentran las placas periflagelares (**Fig. 20**, paneles c y d).

El área periflagelar de *P. hoffmannianum* presenta forma de “V” amplia (wide V-shape), con un largo de 3.88 – 5.95 μm (media, $8.06 \mu\text{m} \pm 0.77$, $n=20$) (**Fig. 26**, paneles c y d). Se observó un borde engrosado (thick flange) rodeando el área periflagellar. El collar periflagelar (platelet list) rodea los poros flagelar (pf) y accesorio (pa). El margen de la valva izquierda exhibe un collar que va desde ensanchado (flared), aplanado (flattened) o curvo, el cual rodea el area periflagellar (**Fig.23**, paneles c y d). La forma y tamaño del collar se observó que puede variar dentro del cultivo. El área periflagelar (**Fig. 26**) esta compuesta por ocho placas y dos poros periflagelares. El poro flagelar (pf) es más grande que el poro accesorio (pa). Para la comparación las placas se nombraron de acuerdo al esquema propuesto por Hoppenrath *et al.* (2013) (**Fig. 25**). Cuatro placas (1, 2, 3 y 4) rodean el collar. El poro auxiliar (pa) se encuentra rodeado por cuatro placas (2, 6, 7 y 8) mientras que el poro flagelar (pf) está rodeado por cinco placas (2, 3, 5, 6 y 8); en algunas ocasiones la placa “4” se encuentra en contacto con el poro flagelar (pf). Los poros se

encuentran separados el uno del otro únicamente por la placa "8". En cada una de las placas, a excepción de la placa "8", se pudo observar la presencia de poroides (porelike), sin embargo, la forma de estas ornamentaciones es diferente entre las células de un mismo cultivo. Las células presentan un pirenoide que se encuentra en el área central de la célula, y el núcleo se presenta en la parte posterior adyacente al pirenoide (**Fig. 27**).

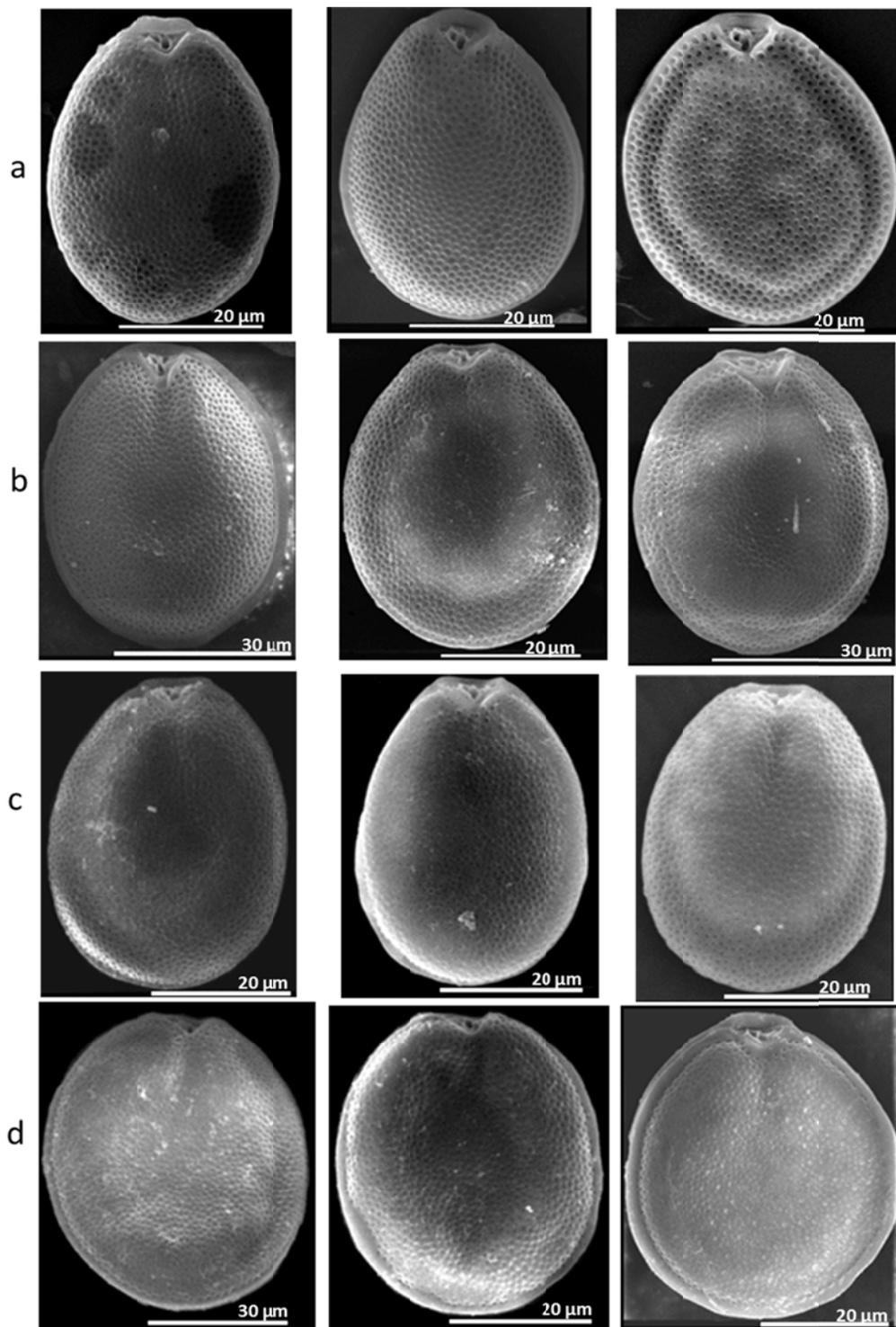


Figura 20. Micrografías de MEB de la valva derecha de *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *P. belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *P. hoffmannianum*: c) CCMP683 y d) CCMP2804.

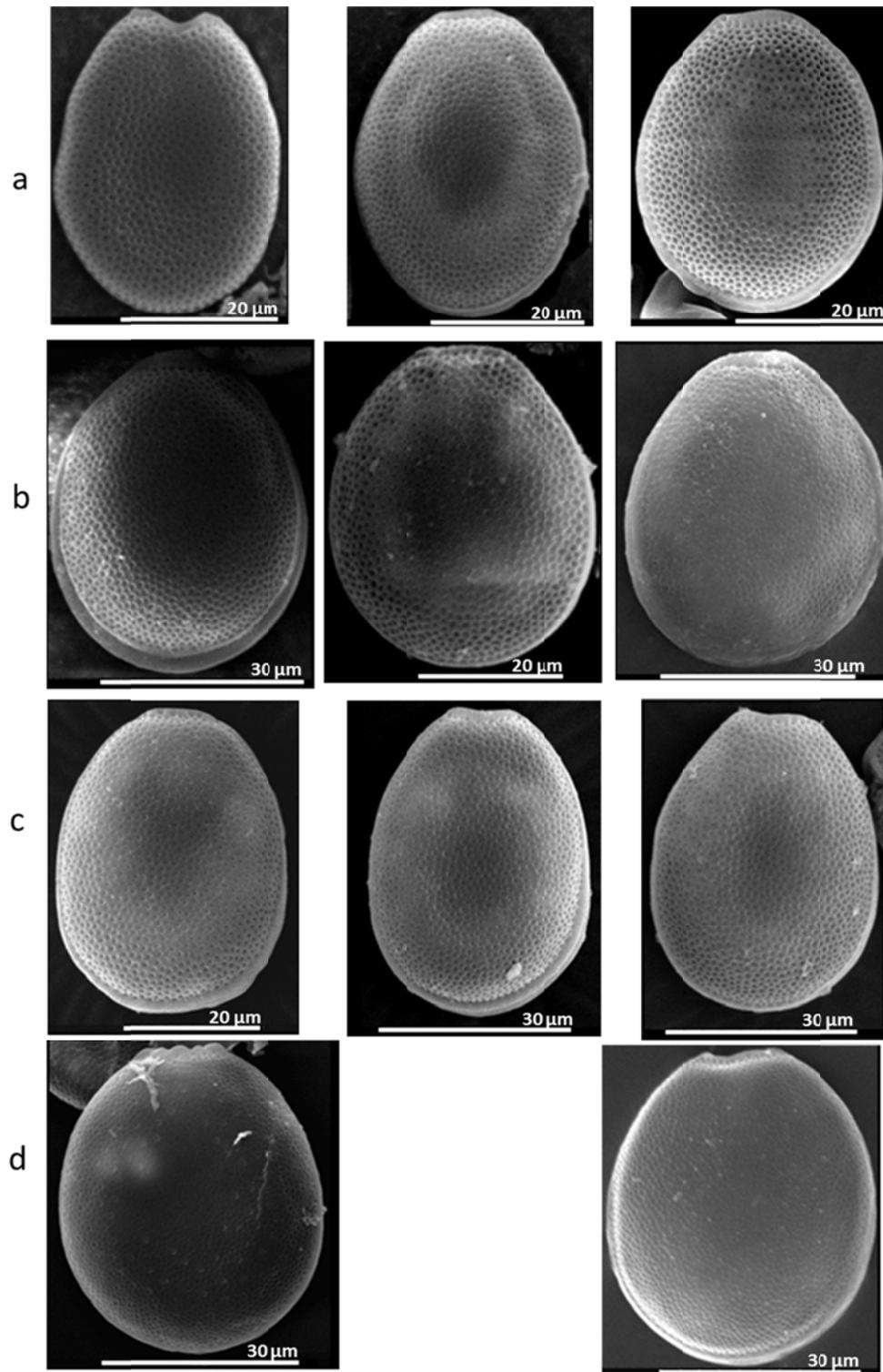


Figura 21. Micrografías de MEB de la valva izquierda de *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *P. belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *P. hoffmannianum*: c) CCMP683 y d) CCMP2804.

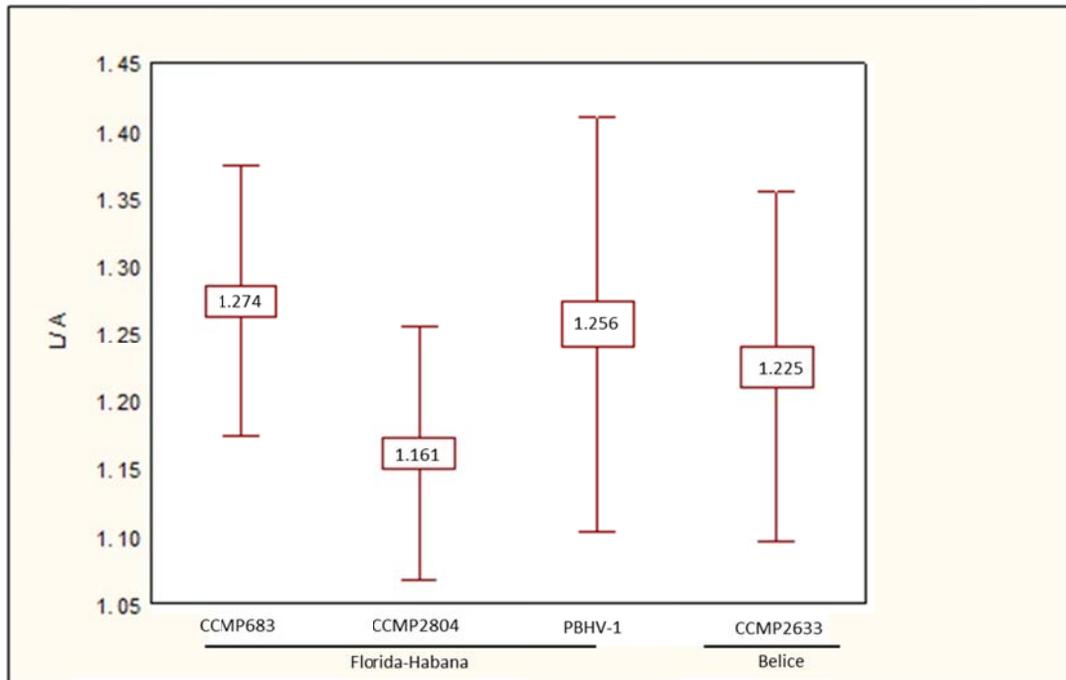


Figura 22. Variación en el rango de la relación largo: ancho (L/A) de los cultivos de *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmanianum*. El número dentro de la caja representa el valor de la media de la relación L/A, respectivamente.

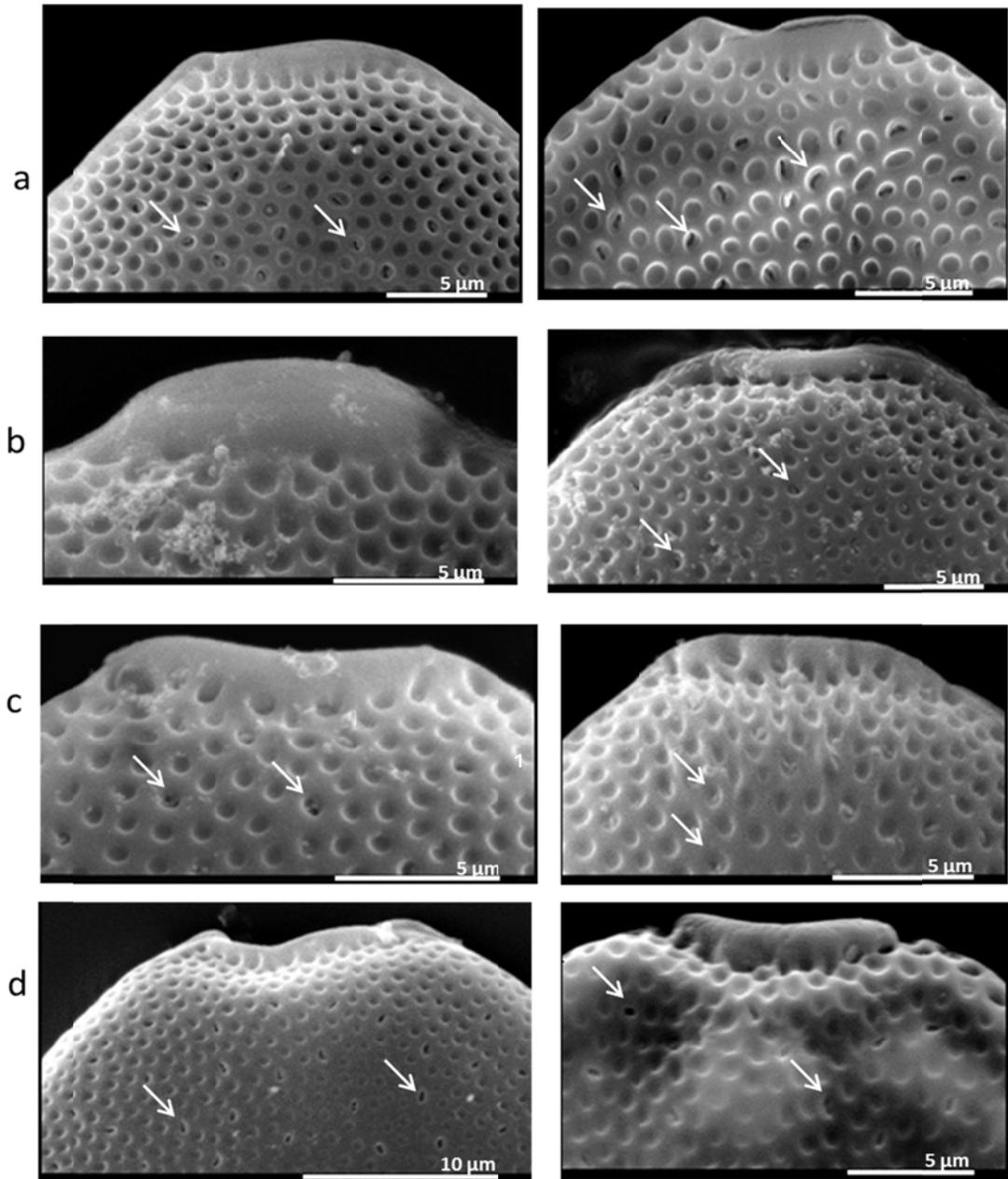


Figura 23. Micrografías de MEB del collar de *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *P. belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *P. hoffmannianum* c) CCMP683 y d) CCMP2804. Se puede observar la presencia de poros dentro de las depresiones (flechas), así como la variación en la forma de las depresiones.

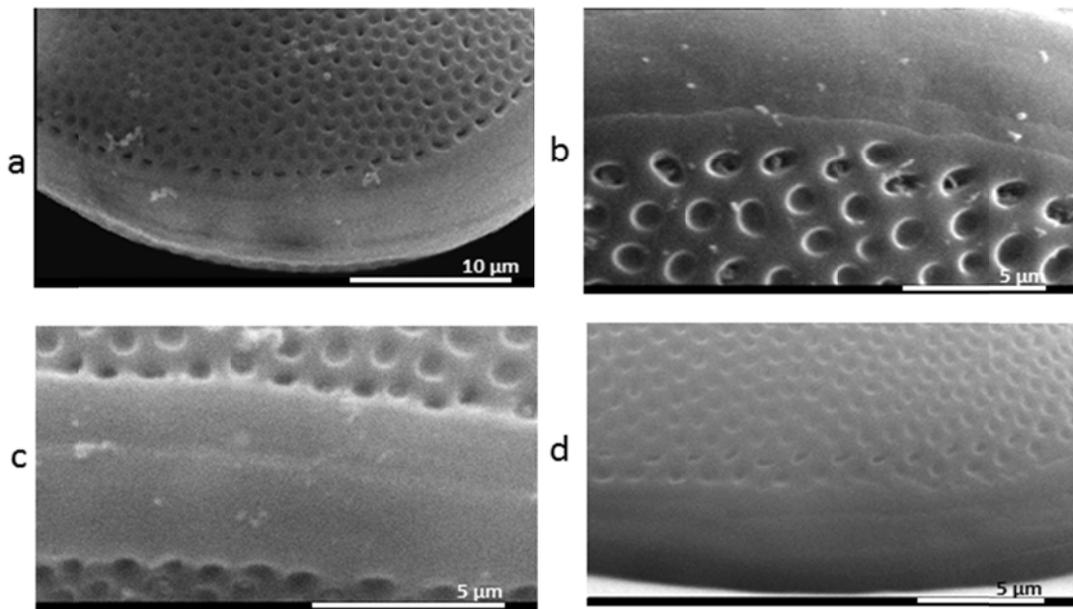


Figura 24. Micrografías de MEB de la banda intercalar de *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *P. belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *P. hoffmannianum*: c) CCMP683 y d) CCMP2804.

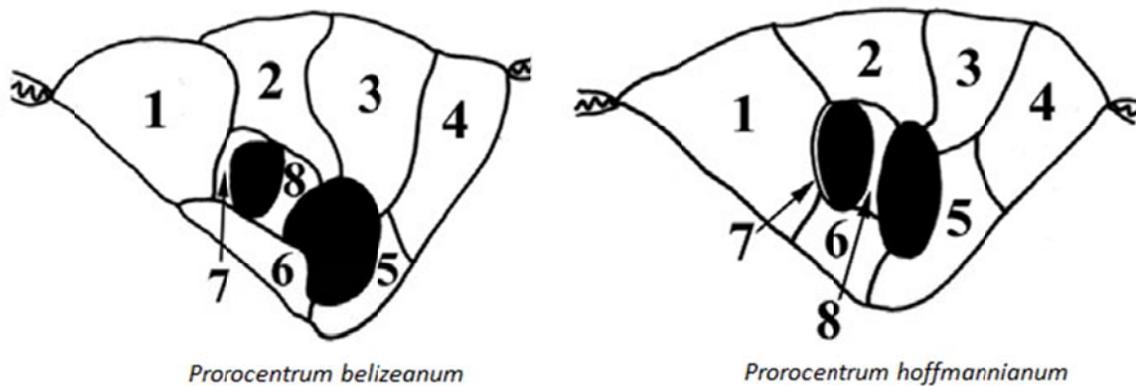


Figura 25. Patrón de placas del área periflagelar de Prorocentroides (Tomado de Hoppenrath *et al.* 2013).

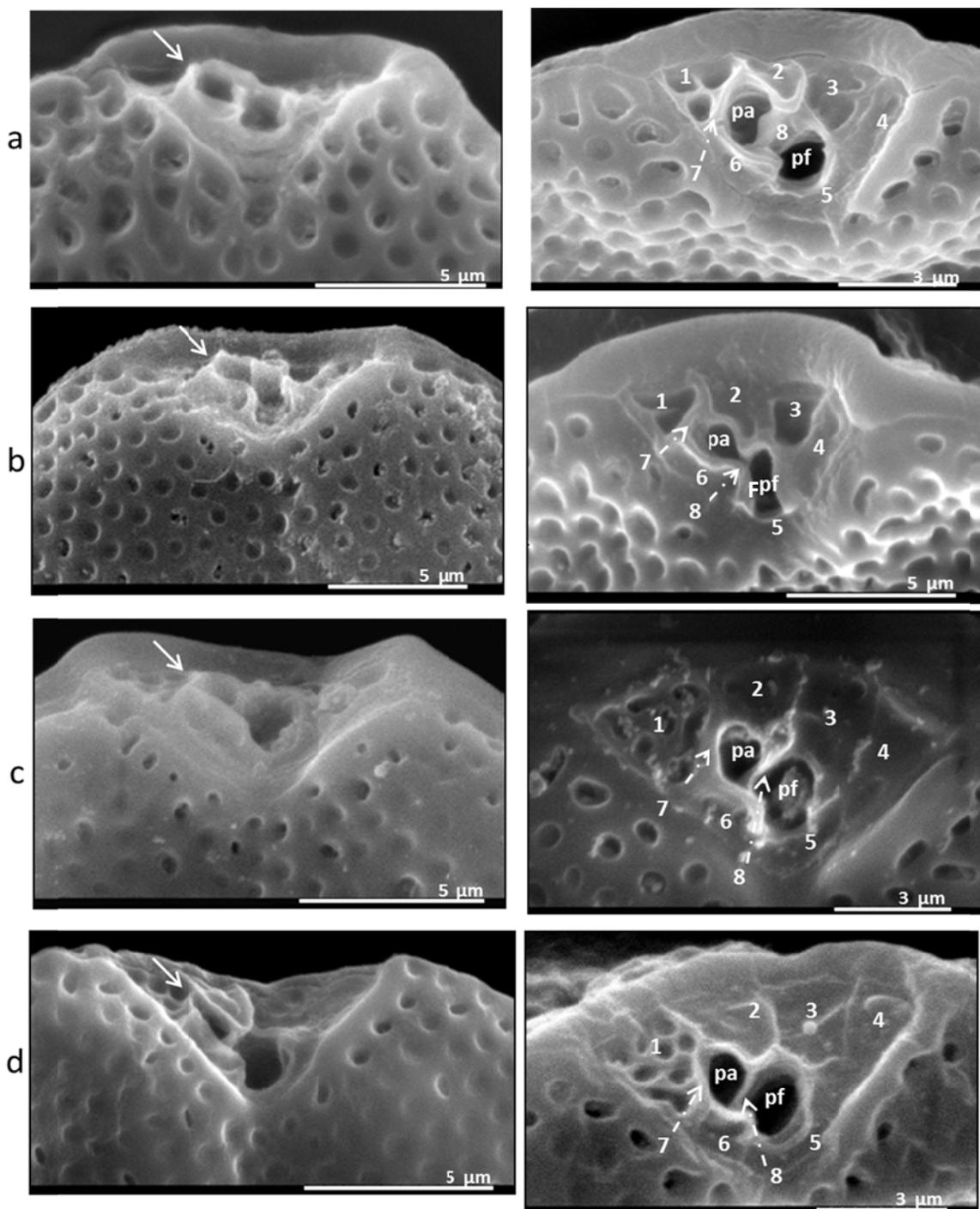


Figura 26. MEB micrografías de área periflagelar para las especies *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *P. belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *P. hoffmannianum* c) CCMP683 y d) CCMP2804. Poro flagellar (pf) y Poro accesorio (pa). Se observan el collar flagelar (platelet list) flechas y la variación en la ornamentación las placas. Los números representan el patrón de placas del área periflagelar.

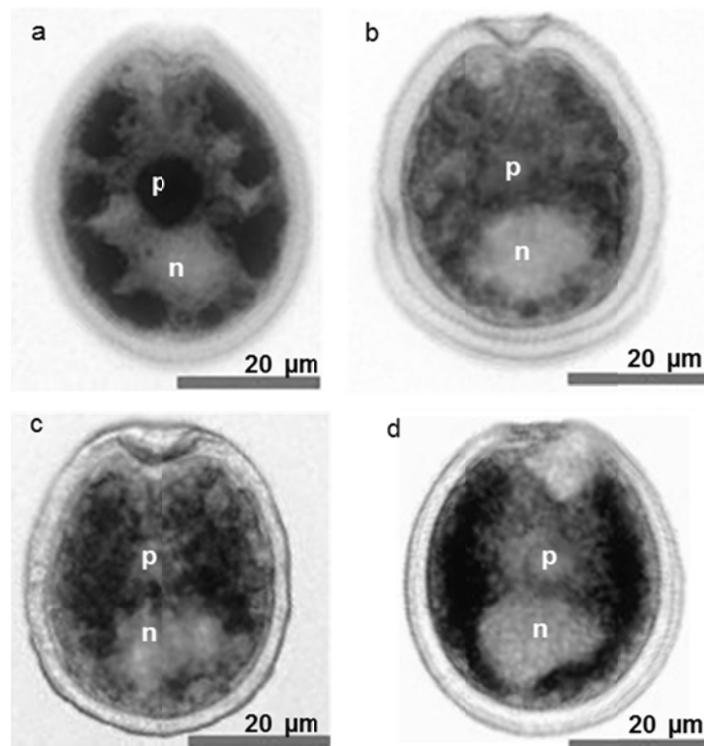


Figura 27. Imágenes de microscopía de luz para las especies *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum hoffmannianum*. *Prorocentrum belizeanum*: a) PBHV-1 y b) CCMP2633; *Prorocentrum hoffmannianum*: c) CCMP683 y d) CCMP2804. P: pirenoide, n: núcleo.

7.5.2 Estimación de distancia genética

El número absoluto de diferencias nucleotídicas y los valores de distancia (ρ distancia) entre los alineamientos individuales y concatenados, correspondientes a las regiones LSU, ITS para *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* se presentan en las **Tablas VI-VIII**.

Para el LSU (**Tabla VI**), las diferencias en la composición nucleotídica entre *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* fueron pequeñas, con valores de 0 a 10 nucleótidos en un fragmento de 575 pb, lo que equivale a valores de distancia genética de 0.0 – 1.859% aproximadamente (media, 0.057% \pm 0.253). En contraste, se encontró un mayor número

de diferencias nucleotídicas, que van de 0 a 20 pb, **Tabla VII**, para el fragmento completo del ITS1-5.8S-ITS2 (546 pb.) equivalente a valores de distancia de 0 - 3.933% (media, $1.819\% \pm 1.481$). Finalmente, para las secuencias concatenadas (**Tabla VIII**) se encontraron de 0 a 21 nucleótidos de diferencia, lo cual corresponde a una distancia genética de 0 - 2.7347 (media, $1.220\% \pm 0.887$). Para las regiones ITS y LSU se observaron valores de distancia genética menores al 0.7% en las zonas geográficas Florida-Cuba, La Reunión y Australia; únicamente en las secuencias correspondientes al fragmento del ITS 1 -5.8S rDNA-ITS 2 de la zona de Belice, se encontraron valores superiores al 2%, lo que puede atribirse a la presencia de múltiples bases degeneradas en el registro DQ238042, cepa CCMP2633.

Tabla VI. Valores porcentuales de distancia genética (p distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia parcial del LSU rDNA (575pb) de *P. hoffmannianum* – *P. belizeanum*. En negritas se resaltan los registros obtenidos en este estudio.

Zona Cepa		Belice		Florida-Cuba					Isla La Reunion					Australia	
		CCMP2633	CCMP2633	PBHV-1	CCMP683	CCMP683	CCMP2804	CCMP2804	PBMA_01	PHSE_01	PHSE_01_02	PHGE_02	PBGLO1	PHH101	SM33
Belice	CCMP2633	0.561		1.301	1.301	1.859	1.487	1.301	1.498	1.487	1.673	1.673	1.673	1.301	1.301
	CCMP2633	3	-	0.374	0.374	0.935	0.561	0.374	0.565	0.561	0.748	0.748	0.748	0.374	0.374
Florida-Cuba	PBHV-1	7	2	-	0	0.558	0.186	0.000	0.562	0.558	0.743	0.743	0.743	0.372	0.372
	CCMP683	7	2	0	-	0.558	0.186	0.000	0.562	0.558	0.743	0.743	0.743	0.372	0.372
	CCMP683	10	5	3	3	-	0.743	0.558	1.124	1.115	1.301	1.301	1.301	0.929	0.929
	CCMP2804	8	3	1	1	4	-	0.186	0.749	0.743	0.929	0.929	0.929	0.558	0.558
	CCMP2804	7	2	0	0	3	1	-	0.562	0.558	0.743	0.743	0.743	0.372	0.372
Isla La Reunión	PBMA_01	8	3	3	3	6	4	3	-	0.000	0.187	0.187	0.187	0.187	0.187
	PHSE_01	8	3	3	3	6	4	3	0	-	0.186	0.186	0.186	0.186	0.186
	PHSE_01_2	9	4	4	4	7	5	4	1	1	-	0.372	0.000	0.372	0.372
	PHGE_02	9	4	4	4	7	5	4	1	1	2	-	0.372	0.372	0.372
	PBGLO1	9	4	4	4	7	5	4	1	1	0	2	-	0.372	0.372
Australia	PHH101	7	2	2	2	5	3	2	1	1	2	2	2	-	0
	SM33	7	2	2	2	5	3	2	1	1	2	2	2	0	-

Tabla VII. Valores porcentuales de distancia genética (p distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia completa del ITS-5.8S rDNA-ITS2 (545pb) de *P. hoffmannianum* – *P. belizeanum*. En negritas se resaltan los registros obtenidos en este estudio.

Zona Cepa		Belice			Florida-Cuba				
		CCMP2633	CCMP2633	CCMP1633	PBHV-1	CCMP683	CCMP683	CCMP2804	CCMP2804
Belice	CCMP2633	-	2.434	0.000	3.371	3.371	3.745	3.371	3.933
	CCMP2633	13	-	2.434	1.311	1.311	1.685	1.311	1.873
	CCMP1633	0	13	-	3.371	3.371	3.745	3.371	3.933
Florida - Cuba	PBHV-1	18	7	18	-	0.0000	0.375	0.000	0.562
	CCMP683	18	7	18	0	-	0.375	0.000	0.562
	CCMP683	20	9	20	2	2	-	0.375	0.187
	CCMP2804	18	7	18	0	0	2	-	0.562
	CCMP2804	21	10	21	3	3	1	3	-

Tabla VIII. Valores porcentuales de distancia genética (p distance, superior derecha) y número absoluto de diferencias nucleotídicas (inferior izquierda), para la secuencia completa del ITS-5.8S rDNA-ITS2 y parcial LSU (1121 pb) de *P. hoffmannianum* – *P. belizeanum*. En negritas se resaltan los registros obtenidos en este estudio.

Zona Cepa		Belice			Florida-Cuba				
		CCMP2633	CCMP2633	CCMP1633	PBHV-1	CCMP683	CCMP683	CCMP2804	CCMP2804
Belice	CCMP2633	-	1.463	0.731	2.279	2.279	2.735	2.370	2.552
	CCMP2633	16	-	1.467	0.823	0.823	1.280	0.914	1.097
	CCMP1633	8	16	-	1.920	1.920	2.377	2.011	2.194
Florida - Cuba	PBHV-1	25	9	21	-	0	0.456	0.091	0.273
	CCMP683	25	9	21	0	-	0.456	0.091	0.273
	CCMP683	30	14	26	5	5	-	0.547	0.365
	CCMP2804	26	10	22	1	1	6	-	0.365
	CCMP2804	28	12	24	3	3	4	4	-

7.5.3 Análisis filogenéticos

La topología de los árboles a partir de inferencia Bayesiana (Bayesian Inference BI) de los alineamientos individuales (ITS y LSU) así como el alineamiento concatenado se presentan en las **Figuras 27-29**. Para todos los análisis se utilizó el ciliado *T. gondii* como grupo externo. Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior (PP) en unidades porcentuales.

En la **Figura 28** se presenta el dendograma construido a partir de LSU rDNA D1-D2 parcial. Se observa que el dendograma se divide en 6 clados altamente soportados (90-99%) que incluyen a las especies *P. levis*, *P. arenarium*, *P. lima*, *P. borbonicum*, *P. concavum*, *P. faustiae*, *P. bimaclatum*, *P. consuetum*, *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum*; a excepción del clado compuesto por *P. emarginatum*, *P. sculptile* y *P. fukuyoi* con valores del 58 %. Específicamente *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* forman un clado monofilético altamente soportado (100%), el cual a su vez se divide en 3 sub-clados, denominados A, B y C. Los sub-clados presentan una gran concordancia con las regiones de colecta de las muestras. **A**, corresponde a *P. belizeanum* de Belice; **B**, se divide en 2 sub-clados (99%): **B1**, compuesto con *P. hoffmannianum*-*P. belizeanum* de la isla Reunión (99%) y **B2**, por *P. hoffmannianum* de Australia; y **C**, *P. hoffmannianum*-*P. belizeanum* de Florida-Cuba (85%). El grupo hermano del clado de *P. hoffmannianum*-*P. belizeanum* es *P. lima*.

En la **Figura 29** se presenta el dendograma construido a partir ITS1-5.8SrDNA-ITS2 región completa. Se observa que el dendograma muestra para *P. arenarium*, *P. lima*, *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* una división en 3 clados. Los clados formados por *P. lima* presentan valores de PP mayores al 90%, mientras que *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* forman un clado monofilético altamente soportado (100%) el que a su vez se divide en 2 sub-clados altamente soportado (100%, respectivamente), denominados A y B; nuevamente los sub-clados presentan una gran concordancia con las regiones de colección de las muestras. **A**, corresponde a *P. belizeanum* de Belice y **B**, *P. hoffmannianum*-*P. belizeanum* de Florida-Cuba. El grupo hermano del clado de *P.*

hoffmannianum-*P. belizeanum* es *P. lima*. Resultados similares fueron encontrados para el grupo de interés, en el concatenado ITS-LSU (**Fig. 30**).

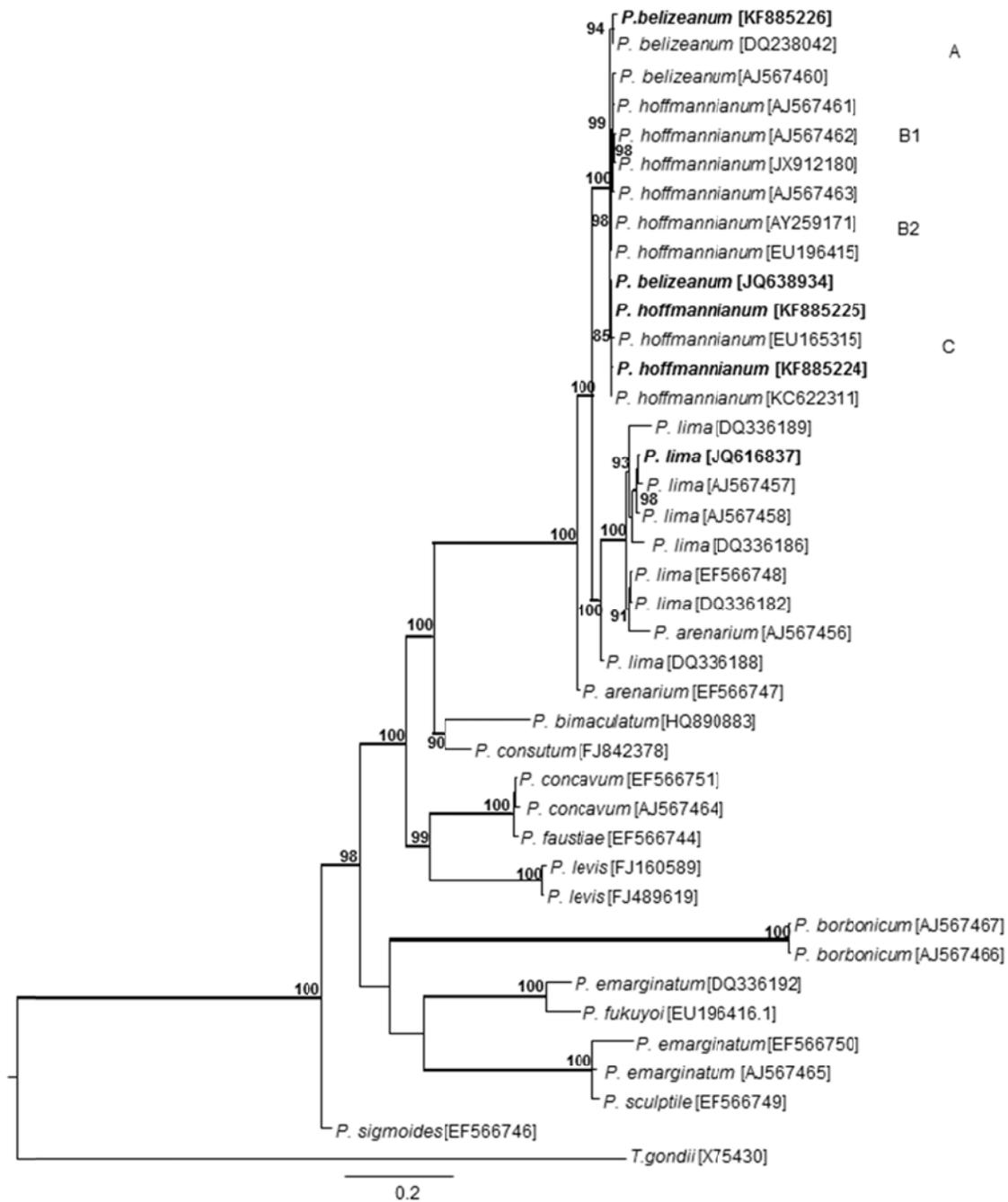


Figura 28. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de secuencias parciales del LSU rDNA (575pb). Los números en los nodos representan valores porcentuales de Probabilidad Posterior (PP). Valores menores al 85% se omiten. Los números de acceso de Genbank aparecen entre corchetes. El grosor de las ramas indica valores de $p \geq 0.95$ a partir de BI. La barra de escala indica el número de sustituciones por unidad de longitud de rama. Las secuencias obtenidas en este estudio se resaltan en negritas.

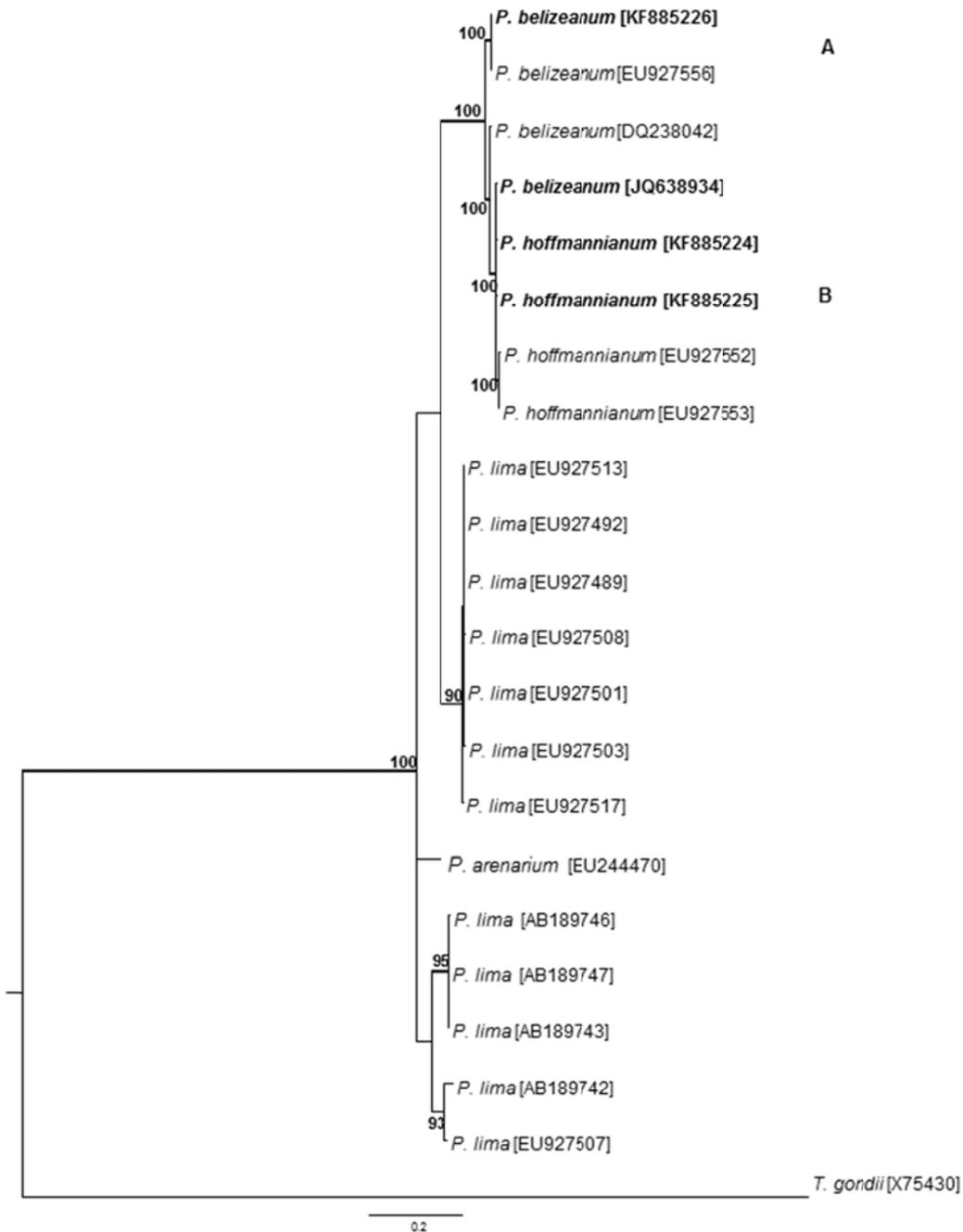


Figura 29. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de la secuencia completa del ITS1-5.8SrDNA-ITS2 (545pb). Los números en los nodos representan valores porcentuales de Probabilidad Posterior (PP). Valores menores al 85 % se omiten. Los números de acceso de Genbank aparecen entre corchetes. El grosor de las ramas indica valores de $p \geq 0.95$ a partir de BI. La barra de escala indica el número de sustituciones por unidad de longitud de rama. Las secuencias obtenidas en este estudio se resaltan en negritas.

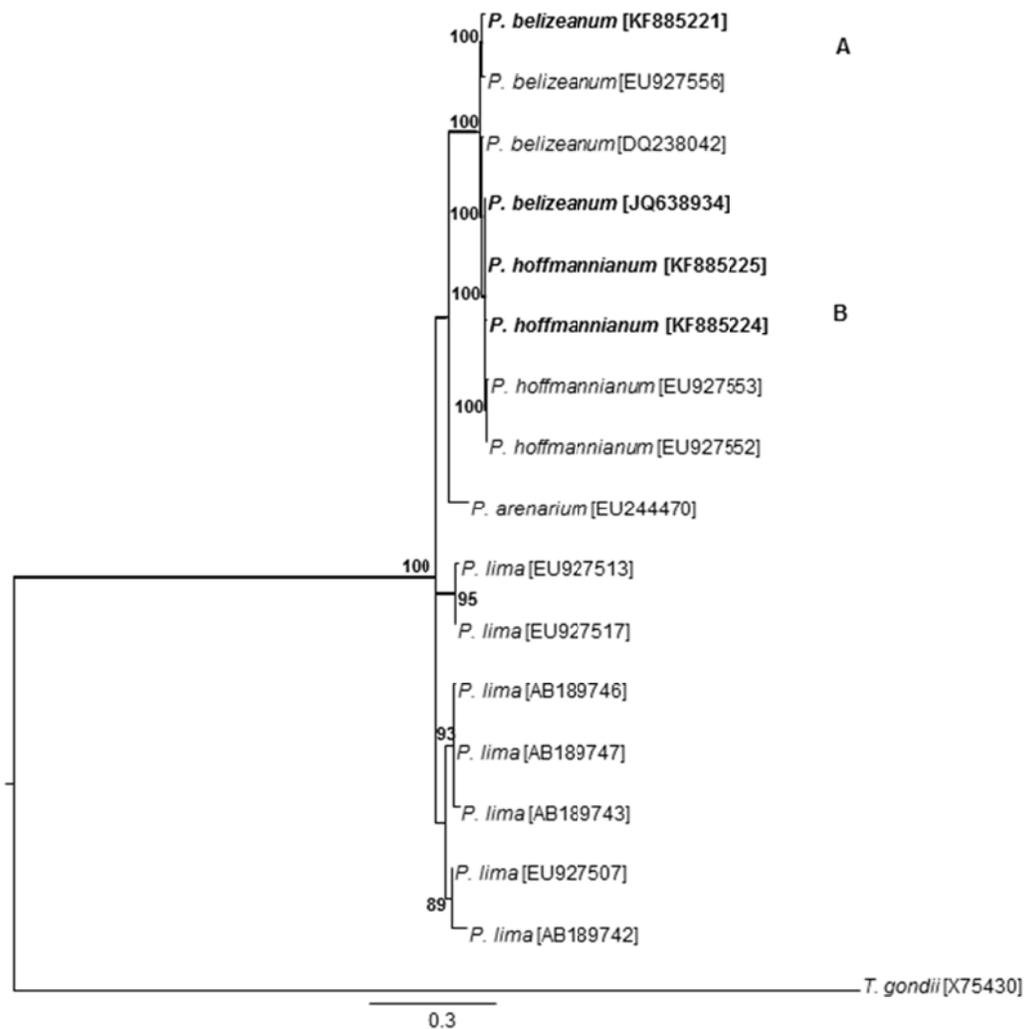


Figura 30. Esquema de árbol consenso obtenido mediante inferencia bayesiana (BI) para algunas especies de Prorocentrales bentónicos basado en el alineamiento de la secuencia completa del ITS1-5.8SrDNA-ITS2 y secuencia parcial del LSU (1121pb). Los números en los nodos representan valores porcentuales de Probabilidad Posterior (PP). Valores menores al 85% se omiten. Los números de acceso de Genbank aparecen entre corchetes. El grosor de las ramas indica valores de ≥ 0.95 a partir de BI. La barra de escala indica el número de sustituciones por unidad de longitud de rama. Las secuencias obtenidas en este estudio se presentan en negritas.

8. DISCUSIÓN

8.1 CE-SSCP

El principio de la metodología de SSCP es que una alteración en la secuencia nucleotídica, causada por una mutación, puede afectar el plegamiento de la cadena sencilla de ADN (ssADN), influenciando de esta forma su conformación nativa. Teóricamente, el análisis de SSCP detecta mutaciones puntuales; el cambio en una sola base es suficiente para provocar un cambio en la conformación de la molécula de ADN, este cambio conformacional es detectable como un cambio en la movilidad electroforética (Wu *et al.* 2009). Nuestra meta fue desarrollar un estudio preliminar para evaluar la eficiencia del CE-SSCP para resolver e identificar varias especies de dinoflagelados comúnmente presentes en costas mexicanas.

Para evaluar la composición de especies presentes en muestras ambientales, probamos procedimientos PCR/CE-SSCP utilizando el ADN genómico extraído de cultivos puros. Se probaron tres diferentes regiones del ADNr: la región V4 del gen ARNr 18S (SSU) y los dominios D2 y D7 del gen ARNr 28S (LSU). Debido a la alta variabilidad en la composición de las secuencias de nucleótidos de las regiones 18S SSU V4 y 28S LSU D2, esperábamos encontrar un cambio drástico en el patrón de migración entre las diferentes especies, sin embargo, bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, no fue posible. Para la región V4, encontramos un complejo patrón de picos y en el caso de la región D2, el patrón obtenido (número y superficie de los picos) no permiten distinguir entre 7 especies, sólo *G. catenatum* (GCMV-2) se resolvió de manera eficiente. Dado que las muestras ambientales suelen ser complejas, estas regiones no fueron útiles y el utilizarlas puede dar lugar a errores en la estimación del número de especies. Como se describe y resumen en Ren (2002) y Kourkine *et al.*(2002) varios parámetros pueden afectar los resultados de CE-SSCP: 1) tamaño y composición de la secuencia, 2) la composición del tampón y el pH, 3) las matrices de separación del ADN, y 4) la temperatura. En lo que respecta al tamaño y

composición de la secuencia del ADN, es definitivamente más fácil detectar mutaciones en algunas regiones del gen que otras, tal vez debido a los efectos de la secuencia de ADN sobre el plegamiento de la cadena. Varias investigaciones han concluido que en la medida que aumenta la longitud de los fragmentos de ADN disminuye la sensibilidad de la detección de mutaciones del CE-SSCP (Ren, 2002). El contenido de GC de la secuencia de ADN también parece tener algún impacto en la facilidad de detección de mutaciones por CE-SSCP. Nataraj *et al.* (1999) reportaron que hay una mayor sensibilidad en la detección de mutaciones de fragmentos con alto contenido de GC (60%) que en los fragmentos con un menor contenido de GC (40%), bajo las mismas condiciones de análisis. Probablemente, el mayor número de pares de bases GC proporciona conformaciones más estables. El tamaño óptimo de los productos de PCR en la técnica de SSCP se encuentra entre 150 a 250 pb. De hecho, la variabilidad debido a la conformación tridimensional puede ser enmascarada en fragmentos mayores de 250 pb. Un fragmento de 150-250 pb es conveniente porque los riesgos de errores producidos por la PCR, vinculados con el tamaño de amplificación, se reducen. Además, se permite el uso de fragmentos de ADN como templado, reduciendo tanto el impacto de los inhibidores como los errores de la ADN polimerasa (Zinger *et al.* 2006).

En la **Figura 4**, la presencia de picos múltiples podría atribuirse a que los oligos reconocen más de un sitio en el ADN, dando como resultado que para la misma especie se generan varios amplicones con pequeños cambios. Resultados similares se presentaron cuando se utilizaron oligos universales para dinoflagelados (King *et al.* 2004). Zinger *et al.* (2007) sugieren que los diferentes picos representan diferentes operones gen 16S ARNr o que los picos múltiples (en una sola cepa) son el resultado de los artefactos de PCR más que conformaciones diferentes. Para un exitoso experimento de SSCP, se debe de seleccionar una región que produzca un solo pico para una sola especie (King *et al.* 2004). Hemos conseguido un resultado exitoso de CE-SSCP para separar 12 especies de dinoflagelados, utilizando como marcador molecular a la región D7. Sin embargo, el perfil de separación de *G. catenatum* (en las condiciones experimentales) mostró múltiples picos.

Kourkine *et al.* (2002) reiteran que la temperatura óptima y las condiciones de pH para la detección de mutaciones sensibles parecen ser secuencia-específica, y probablemente no es posible determinarlas *a priori* debido a la ausencia de un conocimiento de principios y la predicción de estructuras tridimensionales de SSCP, debido a la naturaleza idiosincrásica de plegamiento del ADN. Las temperaturas de análisis entre 20 y 30 °C se recomiendan generalmente como punto de partida para la optimización de la temperatura en los intentos de analizar nuevos fragmentos de ADN por SSCP, hay que tener en cuenta que las temperaturas mayores o menores pueden proporcionar análisis más sensibles. El buffer de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) que contiene 10% de glicerol sigue siendo la mejor opción en la mayoría de protocolos CE-SSCP, sin embargo, otros buffers como Tris-HEPES y Tris-EDTA-MES también se han utilizado con éxito.

Kourkine *et al.* (2002) mencionan que en la técnica de CE-SSCP aún no está claro cuál es la matriz óptima, y que aún queda mucho por hacer en esta área. Como se ha descrito en varios estudios y se resume en la revisión de Ren (2000) existen una serie de nuevos polímeros, tales como hidroxietilcelulosa (HEC), polivinilpirrolidona (PVP), la metilcelulosa (MC), POP de ABI y poliacrilamida lineal (LPA) que se han aplicado al análisis CE-SSCP, con diversos grados de éxito.

8.2. HRM

El principio teórico en el que se basa la metodología de HRM es que la alteración en una secuencia nucleotídica, causada por una mutación, puede afectar la temperatura de disociación de la cadena de ADN, amplicones, variando de 1 a 2 °C, por lo que las diferencias pueden detectarse fácilmente (Odell *et al.* 2005).

En este caso, nuestro objetivo fue determinar si la resolución de los fragmentos SSU V4 y LSU D2 podría incrementarse mediante el uso de la técnica HRM para resolver e identificar entre varias especies de dinoflagelados, o si los resultados obtenidos con esta técnica son comparables con los obtenidos mediante CE-SSCP.

En este contexto, encontramos que los resultados obtenidos mediante el análisis HRM, tanto para el fragmento 18S SSU V4 como para el 28S LSU D2 son similares a los obtenidos con CE-SSCP. Con el fragmento 18S SSUV4 se generaron múltiples picos para las especies *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. lima* (PLHV-1), *P. maculosum* (PMHV-1) y *P. rathymum* (PXHV-1), siendo imposible establecer una temperatura de disociación suficiente para discriminar entre estas especies (**Fig. 8**). En el caso de la región 28S D2 la temperatura de disociación (**Tabla III, Fig. 9**) de *A. margalefii* (AMCQ-1), *A. sanguinea* (ASPV-1), *C. balechii* (CBMV-1), *C. polykrikoides* (CPPV-1), *C. monotis* (CMHV-1), *G. catenatum* (GCCV-11 y GCMV-2), *G. spinifera* (GSCQ-1), *L. polyedrum* (LPCQ-1), *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. maculosum* (PMHV-1), *P. reticulatum* (PRPV-1) y *P. rathymum* (PXHV-1) es muy similar. Entre especies pertenecientes a diferentes géneros, como por ejemplo *A. margalefii* (AMCQ-1) y *Akashiwo sanguinea* (ASCQ-1) la diferencia es únicamente de 0.03 °C.

Generalmente, los diferentes productos de PCR tienen diferente temperatura de disociación, dependiendo de su relación de GC/AT, tamaño y composición de la secuencia y temperatura de corrimiento, entre otros (Ririe *et al.* 1996; Talmi *et al.* 2010). Además, el fabricante (Applied Biosystem) recomienda utilizar fragmentos cortos de entre 100 y 300 pb, debido a que el tamaño afecta considerablemente la resolución de esta metodología. Bajo esta premisa, es posible identificar que estas variables son las mismas que afectan la resolución de la metodología de CE-SSCP, lo cual refuerza la importancia del tamaño del amplicón, sin ser tan importante la alta variabilidad nucleotídica que presente.

Dado que CE-SSCP y HRM se están desarrollando para la identificación de organismos en muestras de campo, será posible revisar la muestra original y comparar los

resultados moleculares vs. morfológicos con la finalidad de determinar con mayor precisión la composición de las muestras. Adicionalmente estas metodologías ofrecen la posibilidad de recuperar información de eventos FAN ocurridos en el pasado, permitiéndonos realizar análisis retrospectivos al identificar el cambio en la composición de las comunidades a través del tiempo.

La resolución de CE-SSCP y HRM puede proporcionar una rápida visión general de la composición de la comunidad de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las muestras ambientales; en este contexto, podríamos medir la abundancia de un grupo objetivo y su incremento acelerado, proporcionando una señal de alerta. Tras su adecuada estandarización y validación, la técnica CE-SSCP puede mejorar las actividades de monitoreo en los países con limitados recursos financieros y técnicos, en particular para el análisis de las especies de dinoflagelados tóxicos y nocivos.

8.3 Detección especie-específica mediante métodos de hibridación

El método de hibridación fluorescente es un método que ha sido utilizado para el análisis *in situ* de comunidades microbianas y su dinámica. Específicamente, el método de WC-FISH ha sido ampliamente utilizado para llevar a cabo la identificación de varias especies de organismos formadores de FANs alrededor del mundo (Adachi *et al.* 1996; Sako *et al.* 2004; Cho y Costas, 2005; Anderson *et al.* 2005;). Esta metodología permite reconocer a especies que morfológicamente son muy parecidas, su principal ventaja radica en que, al contrario de la hibridación en sándwich, es posible mantener la morfología de los dinoflagelados, permitiendo no solo identificar a los organismos por medio de la señal fluorescente, sino también con base en su morfología.

En las **Figuras 12 y 13** se muestra el reconocimiento inespecífico del primer lote de sondas; no fue posible continuar con pruebas posteriores para la estandarización de estas sondas ya que no se contó con las facilidades de equipo y espacio. Adicionalmente, hay que resaltar que las condiciones de hibridación para este microarreglo estaban previamente establecidas para el funcionamiento de las sondas impresas para esta versión del microarreglo. La inespecificidad de la sonda puede atribuirse a un inadecuado diseño de la misma o a una incorrecta identificación de la especie, a partir de la cual se hizo el diseño; por lo que sería recomendable re-diseñarla usando el software ARB (Ludwing *et al.* 2004). Para el segundo lote de sondas, se hizo un esfuerzo por tomar en consideración algunos parámetros diacríticos tratar de asegurar el éxito en su funcionamiento, como: la longitud de la sonda (18 pb), contenido de GC (50%), disparidad (“*mismatch*”) de bases que le confiera la especificidad de la sonda. Se debe encontrar en el centro de la secuencia de la sonda, además se recomienda contar con una sonda competidora (oligonucleótido no marcado), y de ser posible, la temperatura de disociación (T_m) debe estar por debajo de los 50 °C (temperaturas superiores podrían dañar las células).

Tomando en cuenta estas consideraciones, se diseñaron dos sondas especie-específicas, para *P. maculosum* y *P. belizeanum* adicional a la sonda también se diseñó su respectivo competidor. Una vez que se estandarizaron las condiciones de hibridación (**Fig. 14 -17**) para la sonda PmacuSSU, se llevaron a cabo pruebas cruzadas (cross reaction test) utilizando una mezcla de las especies *P. lima* cepa PLC16, *P. micans* y *P. minimum*; hibridadas con la sonda PmacuSSU y Plim02 (**Fig. 18**). Se obtuvo una señal de fluorescencia mayor para la *P. maculosum* al hibridar con la sonda específica para *P. lima*, mientras que la señal de fluorescencia obtenida con la sonda de PmacuSSU fue baja para todas las especies (**Fig. 18**). Este resultado sugiere una inadecuada identificación de la cepa PMHV-1 identificada previamente como *P.*

maculosum (CODIMAR, Amada Reyes 2005)¹; también puede atribuirse a una deficiente permeabilización de las células, a un bajo número de ribosomas o a la inaccesibilidad de la sonda al sitio de unión dictaminado principalmente por la estructura de los ribosomas (es decir, estructura secundaria, terciaria o cuaternaria) (Amman y Fuchs, 2008). Estos resultados evidencian la importancia de llevar a cabo una adecuada estandarización para el uso de cada sonda molecular, ya que las características de hibridación son únicas. Se recomienda probar: diferentes métodos para fijar las muestras, gradientes de formamida, pre-tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. Además de realizar pruebas de hibridación cruzada con especies filogenéticamente relacionadas.

Para continuar con las pruebas cruzadas, se decidió llevar a cabo un análisis de PCR (sección 7.4), utilizando como cebador, la sonda competidora para *P. belizeanum* que es específica para *P. maculosum*, con la finalidad de amplificar un fragmento de 250 pb aprox. En la **Figura 18**, podemos observar la presencia de amplicones para las especies genéticamente relacionadas, así como para la especie blanco. Estas observaciones complementan los resultados obtenidos para el método de FISH, en donde podemos considerar que esta problemática se atribuye a la principal limitante del WC-FISH: la identificación de una “verdadera” secuencia especie-específica. Estos problemas se generan como producto del depósito de secuencias de organismos que han sido incorrectamente identificadas en el GenBank, y de los que no se corrigen errores taxonómicos (ej. *P. rathymum* vs *P. mexicanum*, *P. arenarium* vs *P. lima*, por mencionar algunos). Macmanus y Katz (2009), alienta a los taxónomos para hacer un esfuerzo en la incorporación de información molecular en las descripciones formales de las especies; de la misma forma que incita a biólogos moleculares a hacer una revisión más exhaustiva sobre los organismos a partir de los cuales se obtienen secuencias nucleotídicas.

¹ Se tomaron imágenes de MEB para la identificación de caracteres taxonómicos de esta cepa, las imágenes y su comparación con las imágenes presentadas en la descripción original propuesta por Faust, 1993, se presentan en el Anexo 4

De tal manera que la integración de ambas aproximaciones metodológicas es de vital importancia para mejorar la descripción de las especies existentes así como de nuevas especies. Estos resultados despertaron interés, en torno a la búsqueda de una nueva “etiqueta” genética, que presentará suficiente resolución para discriminar entre las especies de interés, por lo que se amplificó un fragmento de gen mitocondrial citocromo B (*Cytb*) (Sección 7.1), el cual presenta una tasa de mutación mayor en comparación con el 18S rDNA, además de que las características de edición de los genes mitocondriales pueden potencialmente actuar como marcadores moleculares especie-específicos (Lin *et al.* 2002). Se ha encontrado variabilidad en las secuencias del gen COB a nivel poblacional, por lo que se sugiere que este puede ser un marcador molecular para especies o incluso poblaciones del género *Prorocentrum* (Lin *et al.* 2006). Lin *et al.* (2009) encontró específicamente para *P. minimum* una variación intraespecífica baja, por el contrario, la divergencia interespecífica fue notablemente superior para *P. cassubicum*, *P. dentatum*, *P. donghaiense*, *P. lima*, *P. micans*, *P. minimum* y *P. nanum*. En este estudio se amplificó un fragmento de 350 pb, el cual presentó homología del 100% entre de *P. maculosum*, *P. belizeanum* y *P. hoffmanianum* (números de acceso en Genbank KF885223, KF885222, KF885219 y KF885220).

Con base a los resultados mencionados previamente para WC-FISH y PCR, se llevaron a cabo análisis complementarios para asegurar la identidad taxonómica de las especies en cuestión. Esto con base a información presentada por Hoppenrath *et al.* (2013) en donde después de hacer una revisión extensiva considerando caracteres morfológicos, disposición de organelos, producción de toxinas y relaciones filogenéticas; destaca la incertidumbre relacionada con la delimitación de algunas especies de Prorocentrales bentónicos, los cuales incluyen a las especies de *Prorocentrum hoffmannianum*, *Prorocentrum belizeanum*, *Prorocentrum maculosum* y *Prorocentrum faustiae*.

8.4 Análisis morfológicos y moleculares.

Los análisis complementarios comprenden análisis morfológicos de las especies *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* mediante ML y MEB, además de análisis moleculares que incluyen la determinación de valores de distancia genética y construcción de árboles moleculares mediante inferencia bayesiana (BI). Los cuales serán discutidos a continuación.

8.4.1 Análisis morfológicos.

Los caracteres morfológicos fueron las primeras características utilizadas para distinguir entre especies. Se reconoció que había una variación morfológica y que los límites entre las especies fueron establecidos como producto de las variaciones morfológicas.

El incremento en la sofisticación de nuestro conocimiento basado en caracteres no morfológicos, sugiere una re-evaluación periódica de los límites entre las especies y actualmente nos encontramos en ese momento. Taylor (1993) concluyó que diferencias visuales no necesariamente significa aislamiento genético, mientras que similitudes no significan genéticamente idénticos “looking alike does not necessarily mean genetically identical, and looking different does not mean genetically isolated”. Este fenómeno se conoce como plasticidad del fenotipo.

La morfología de un organismo es la expresión compleja del total de su genotipo, sujeto a cambios fenotípicos originados por el ambiente, transformaciones durante su ciclo de vida así como otras influencias. A través de la examinación de miles de individuos, es necesario identificar aquellos caracteres que son conservados y útiles para fines taxonómicos. Recientemente, se ha incrementado el uso de caracteres no morfológicos como lípidos, pigmentos, perfil de toxinas, rasgos inmunocitológicos, número de cromosomas y secuencias nucleares o de plástidos, para ayudar a la identificación de las especies (Hallegraeff, 2004).

En el caso de *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*, las principales diferencias morfológicas encontradas son: el tamaño y forma de la célula, la areolación (depresiones) en las valvas (número de depresiones por valva), la complejidad del área periflagelar, la prominencia de collar y la posición y forma del núcleo (Faust, 1990, 1993; Hoppenrath *et al.* 2013). En la descripción de Faust (1990) se reportan células de *P. hoffmannianum* con un largo de 45-55 μm y 40-50 μm ancho, 650-700 areolas (depresiones) por valva (media $670 \pm \text{SE } 5.54$), el diámetro de las areolas (depresiones) es de 1 – 1.5 μm , el núcleo se encuentra adyacente al pirenoide, y la valva izquierda presenta una cresta aplanada (flat ridge) mientras que la valva derecha se encuentra excavada (excavated), adyacente al área periflagelar. Con respecto al área periflagelar, Faust (1993) solo hace mención de la complejidad de ésta, sin embargo no se especifica en que consiste esta complejidad. Las células de *P. belizeanum* son de mayor tamaño que las dimensiones reportadas para *P. hoffmannianum*, presentando un largo de 55-60 μm y 50-55 μm de ancho. Además *P. belizeanum* presenta un mayor número de poros por valva 853-1024 poros (media, $950 \pm \text{SE } 5.53$), el collar es más prominente que el de *P. hoffmannianum* y el núcleo presenta forma de riñón y se encuentra desplazado del pirenoide. No se hace mención a la complejidad del área periflagelar, únicamente se hace referencia a la similitud con *P. lima* y *P. hoffmannianum* en la disposición de las placas (Faust, 1993, Faust *et al.* 2009).

En nuestro estudio, encontramos que el tamaño de las células de *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum* son variables, particularmente en la relación L/A, en donde se encontró diferencia significativa entre los cultivos utilizados en este estudio. Las dos cepas de *P. hoffmannianum* fueron más pequeñas que el tamaño reportado en la descripción original y presentaron un mayor número de depresiones por valva. Por otra parte, las células de *P. belizeanum* son más pequeñas y presentan un mayor número de areolas por valva. La variación en la forma de las células ha sido reportada previamente para la especie de *P. lima* (Faust, 1991; Nagahama *et al.* 2011), en donde la morfología que presenta va de elipsoidal, ovoide a redonda; Hoppenrath *et al.* (2013) reporta que las variaciones en la morfología de *P. consutum* que van de subcircular a ovoide.

La variación en el tamaño y ornamentación de las células puede ser artefacto de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, Mohammad-Noor *et al.* (2007) reporta cambios en la simetría de las células de *P. concavum* (sinónimo *P. arabianum*), pasando de asimétricas a simétricas (en la descripción original estas se clasificaron como asimétricas) (Morton y Faust, 2002) después de estar bajo condiciones de cultivo por casi 10 años; mientras que Hoppenrath *et al.* (2013) demostró que existe variaciones entre las células de *P. hoffmannianum* en condiciones de cultivo en relación a células provenientes de muestras naturales, la cual se ve reflejada tanto en la morfología de las células como en su ornamentación. Con base a lo anterior, la variación en el tamaño, forma y ornamentación de las células se puede atribuir a que las clonas han estado en cultivo por más de cinco años (CCMP 2804 aislado en Enero, 2007; CCMP 683 Agosto 1986; CCMP2633 febrero 2006 y PBHV-1 en el 2004).

Recientemente, Hoppenrath *et al.* (2013) concluyeron que dentro de las especies del género *Prorocentrum* los caracteres taxonómicos reconocidos como más estables dentro de una especie son: 1) la simetría de las tecas; 2) forma del área periflagelar visible en la placa de la teca derecha I) forma de arco (arc-shape); II) V o V amplia (wide or simply V shape); III) V estrecha (narrow V shape) y IV) linear; y 3) número y disposición de placas del área periflagelar. En el párrafo anterior, se discutió la simetría de las células, ahora con respecto a la forma del área periflagelar, encontramos una variación en el tamaño de esta forma por lo cual puede pasar desde forma de V a V amplia, sin embargo, no existe un parámetro fijo el cual permita distinguir claramente entre éstas dos formas, más bien tiene carácter de apreciación.

Las principales diferencias morfológica entre *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum* propuestas por Faust (1990, 1993) son el tamaño y el número de depresiones por valva, sin embargo, estos caracteres morfológicos no son estables y pueden llegar a trasladarse esto puede evidenciarse claramente cuando se analiza la relación L/A (**Fig. 22**) en donde se aprecia que dentro de un cultivo puede presentarse variación en esta relación e incluso

se genera un traslape entre estas dos especies, las cuales como se mencionó previamente, co-ocurren en el ambiente.

Finalmente, dado que el número y disposición de las placas del área periflagelar es un carácter taxonómico clave para separar especies del género *Prorocentrum* (Mohammad-Noor *et al.* 2007; Chrómerat *et al.* 2010; Takano y Matsuoka, 2011; Nagahama *et al.* 2011; Hoppenrath *et al.* 2013) se recomienda su uso para la discriminación entre especies taxonómicamente cercanas. En nuestro estudio, no se encontraron evidencias claras en la disposición y ornamentación del área periflagelar que nos permitieran separar a las especies de *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*, ambas especies poseen: ocho placas, algunas de estas placas presentaron poros accesorios dentro de ellas; un collar periflagelar que rodea al poro flagelar y poro accesorio; el tamaño de éstos poros es desigual, siendo el poro flagelar de mayor tamaño, ambas especies poseen un borde en la excavación del área periflagelar (V-shape excavated, thick flange).

8.4.2 Análisis moleculares.

8.4.2.1 Distancia genética. La estimación de los valores de distancia genética es una herramienta útil para determinar el número de diferencias de bases por sitio entre las secuencias utilizadas.

Entre las especies *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* los valores de distancia genética encontradas en un fragmento de 575 pb del LSU fueron de 0.0 – 1.859%. Estos valores son similares a los reportados por Edvarsen *et al.* (2003) quienes a partir de secuencias del LSU, encontraron poca o nula variabilidad interespecífica para especies del género *Dinophysis* aisladas de dos localidades de la costa sur de Noruega en diferentes periodos del año, con valores de 0.4 - 1.6% entre las especies fototróficas *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. norvergica*. Mohammad-Noor *et al.* (2007) comparó las secuencias parciales del LSUrDNA para las especies *P. arabianum* y *P. concavum*, encontrando valores de 0.2%, estos

valores tan bajos se presentan a nivel poblacional (Hansen *et al.* 2000a); lo cual es consistente con nuestros resultados ya que entre poblaciones aisladas geográficamente los valores de distancia genética fueron inferiores a 0.56%. Finalmente, Lilly *et al.* (2007) encontraron valores de distancia genética con un rango de 6 a 11% entre los cinco grupos formados a partir de aislamientos del complejo *A. tamarensis* (*A. tamarensis*, *A. fundyense* y *A. catenella*), sin embargo dentro de cada grupo los valores de distancia genética fueron de 2%; los cuales son considerados como valores típicos de los haplotipos dentro de una misma especie. Aun cuando los valores de 1 – 2% en el LSU ADNr puede relacionarse con la conespecificidad, es en cierta medida una cuestión concetual (Litaker *et al.* 2007) y dependerá del nivel de recombinación genética entre poblaciones.

Los valores de distancia genética encontrados entre *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* para el fragmento de 546 pb del ITS fue de 0 a 20 pb equivalente a valores de distancia de 1.819%, estos valores fueron menores al realizar comparaciones entre regiones geográficas, con valores de 0.29% para Florida y 1.6% para la zona de Belice. Edvarsen *et al.* (2003) determinó que las especies *D. acuminata* y *D. norvergica* solamente difirieren en ocho pb. dentro de la región del ITS 1-ITS 2 mientras que Mohammad-Noor *et al.* (2007) encontraron valores de variabilidad genética nulos para *P. concavum* – *P. arabianum* analizando los fragmentos del ITS1 e ITS2 así como secuencias parciales del gen mitocondrial Cytb. Litaker *et al.* (2007) determinó los valores de distancia genética basados en secuencias del ITS rDNA; encontrando variabilidad intraespecífica de 0.72% para *P. micans* y *P. minimum* y 21.26% de variabilidad interespecífica para éstas dos especies. Finalmente, a partir de un alineamiento de la región ITS, provisto por la Dra. S. Murray (utilizado en el artículo de Nagahama *et al.* 2011), se determinaron los valores de distancia genética y número de diferencias nucleotídicas para un fragmento de 537 pb de la especie *P. lima* encontrando valores menores al 2% para especies aisladas de la misma zona geográfica (Pacífico, Caribe y Atlántico) pero al comparar entre los aislamientos, los

valores de distancia genética fueron de 0 a 12% (análisis no presentados) con diferencias nucleotídicas de 0 a 90 pb.

Adicionalmente, se determine el valor de distancia genética en utilizando la secuencia nucleotídica parcial del SSU (1746 pb) y 2) el alineamiento concatenado SSU-ITS-LSU-Cytb (3277 pb). Para el fragmento del SSU, encontrando 99.5% de similitud entre las secuencias de *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum*, sin embargo 6 nucleótidos de diferencia fueron encontrados entre los clados de las zonas geográficas de Belice y Florida-cuba, estas diferencias se localizan en orquillas internas dentro de las hélices de las regiones hipervariables V2 y V4. Mientras que para el alineamiento concatenado los valores de distancia genética decrecieron a cero entre las cepas aisladas de la zona de Florida-Cuba, sin embargo entre las cepas de la zona de Belice y Florida-Cuba, los valores fueron de 1.0% (datos no presentados).

8.4.2.2. Análisis filogenéticos. Los estudios filogenéticos que incluyen a las especies de *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum* son escasos. Uno de los estudios más completos que incluye a éstas especies, fue presentado por Murray *et al.* (2009). En este estudio y utilizando BI para secuencias parciales del LSU y SSU encontraron clados fuertemente soportados (1.0 PP ambos casos), además encontraron que la secuencia de *P. belizeanum* es 98.9% similar a la secuencia de *P. hoffmannianum*, basado en un alineamiento de 560 pb del LSU rDNA. Otro análisis es el presentado por Hoppenrath *et al.* (2013) en donde basados en un análisis de LSU (515 pb), encontraron un alto nivel de similitud entre las secuencias identificadas como *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum* concluyendo que aún existe incertidumbre en el establecimiento de los límites de estas especies.

Los construcción de los árboles filogenéticos mediante BI, a partir de secuencias correspondientes a la regiones ITS rDNA, LSU rDNA y concatenadas, reveló un patrón constante en la generación de clados monofiléticos altamente conservados para *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*, el cual se encuentra subdividido en relación a la zona geográfica; estos resultados coinciden con los resultados presentados por Nagahama *et al.*

(2011) y Lilly *et al.* (2007). Nagahama *et al.* (2011). observaron la formación de un grupo monofilético para la especie de *P. lima* la cual se subdivide en varios subclados; sin presentar caracteres morfológicos específicos relacionados con estos subclados. Los subclados se relacionan directamente con la zona geográfica de la cual fueron tomadas, sugiriendo que las poblaciones geográficamente aisladas pueden llegar a ser genéticamente distintas. Estos tres clados, podrían ser considerados como un complejo de especies. Por otra parte, Lilly *et al.* (2007) encontraron que las especies incluidas en el complejo de *A. tamerense*, forman un clado monofilético fuertemente soportado; subdividido en cinco grupos, rechazando así el concepto de especie filogenética el cual requiere que todas las especies sean recíprocamente monofiléticas (Eldredge y Cracraft, 1980).

Piganeau *et al.* (2011) enfatizó la importancia que representa las diferencias en la secuencia de genes ribosomales, entre especies cercanamente relacionadas, y que estas son de mayor importancia en comparación con los cambios presentados en genes que codifican para proteínas, pequeños cambios en las secuencias de genes ribosomales, puede denotar la presencia de diferentes especies. En este estudio, se encontraron seis diferencias nucleotídicas en el gen SSU ARNr y nueve para la secuencia parcial del gen LSU ARNr entre las secuencias disponibles para las especies *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*. Estas sustituciones son consistentes con el patrón de agrupamiento por zonas geográficas de muestreo, encontradas en la topología de los árboles filogenéticos para las regiones ITS y LSU, por lo que sugerimos que estos sean considerados como cuatro ribotipos: A) Belice, (B) Florida-Cuba, (C) India, y (D) Australia.

No existe una regla que dictamine estrictamente los límites de una especie basado únicamente en un solo carácter morfológico y/o filogenético, es por esta razón que existen diferentes definiciones de lo que constituye a una especie (biológica, filogenética etc); por lo que es importante analizar la información en su totalidad incluyendo:

morfología, análisis de diferentes genes (manera individual y concatenada), producción de toxinas y de ser posible estudios de entrecruzamiento o búsqueda de simpatria (co-ocurrencia en el ambiente, sin entrecruzamiento).

9. CONCLUSIONES

9.1 Conclusión y recomendaciones para análisis de comunidades

- Bajo las condiciones empleadas en este estudio para la metodología de CE-SSCP, la región 28S LSU D7 presentó la mejor resolución para separar e identificar nueve especies de dinoflagelados nocivos (*A. margalefii*, *A. sanguinea*, *C. balechii*, *C. polykrikoides*, *P. minimum*, *P. rhathymum*, *P. reticulatum*, *L. polyedrum* y *G. catenatum*).
- El análisis de HRM utilizando el fragmento 28S LSU D7 presentó baja resolución para discriminar entre especies del género *Prorocentrum*, solo fue posible identificar dos grupos, cuyo agrupamiento responde principalmente al tipo de hábitos que comparten (Prorocentrales bentónicos y Prorocentrales planctónicos).
- El fragmento 28S LSU D7, podría utilizarse para aplicar la técnica de HRM con la finalidad de comparar los resultados obtenidos mediante el método de CE-SSCP, y determinar así la resolución presentada para cada técnica. Adicionalmente, se recomienda el realizar un análisis detallado de factibilidad de desarrollo y aplicación, ya que éstas técnicas presentan una complejidad operacional distinta.

9.2 Conclusión y recomendaciones para identificación especie específica.

- El punto clave para el adecuado uso del método de FISH y PCR en la identificación especie específica, está directamente relacionado con la identificación de una “verdadera” secuencia blanco, específica y única para la especie en cuestión.
- No fue posible discriminar entre las especies *P. maculosum*, *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum* utilizando los métodos como FISH y PCR, ya que tras el análisis detallado de la composición de su secuencia nucleotídica de los genes (18S SSU, ITS y 28S LSU) y del gen mitocondrial *CytB*, no se logró identificar una

secuencia blanco, que les confiriera a estas especies la resolución suficientes para ser discriminadas entre ellas, utilizando estas metodologías.

9.3 Analisis morfológicos y moleculares para las especies *Prorocentrum hoffmannianum* y *Prorocentrum belizeanum*

- Las sutiles diferencias morfológicas encontradas para *P. hoffmannianum* y *P. belizeanum*, observadas mediante microscopia de luz y microscopia electrónica de barrido, sugiere que estas especies son conespecíficas.
- Los análisis moleculares y filogenéticos de diferentes fragmentos del ADN, analizados de manera individual y concatenada, no separan en morfoespecies a *P. belizeanum* y *P. hoffmannianum*, por lo tanto consideramos que éstas forman un complejo de especies (especies crípticas), que denominamos “complejo *Prorocentrum hoffmannianum*”.
- Se encontraron cuatro clados geográficamente definidos y genéticamente distintos, los cuales pueden ser considerados como ribotipos.
- se recomienda llevar a cabo el análisis morfológico y molecular, utilizando multiples cepas de una misma región, así como incluir distintas poblaciones geográficas, antes de poder determinar con mayor certeza los límites entre estas especies.

10. LITERATURA CITADA

Adachi, M., Y. Sako, Y. Ishida. 1996. Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.* 32:1049-1052.

Alkandari, M., D. Schroeder, M. Edward, M. Yallop, P. Hayes. 2010. Is the European *Karenia mikimotoi* an alien? En: Resúmenes del 14th International Conference on Harmful algae, del 1-5 de Noviembre del 2010. Creta, Grecia.

Amann, R. I., B. M. Fuchs. 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. rev. microbial.* 6: 339-348.

Andersen, P., H. Enevoldsen, D. Anderson. 2004. Harmful algal monitoring programme and action plan. En: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella A. D. (eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology 11.* UNESCO Publishing. Paris, France. 627-647p.

Andersen, P., J. Throndsen. 2004. Estimating cell number. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.) *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Manual on harmful marine microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology 11.* UNESCO Publishing. Paris, France. 99-130p.

Anderson, D. 1995. Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. En: Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentian P. y Marcaillou C. (eds.) *Harmful marine algal Bloom.* Lavoisier Intercept Ltd. París. 103-112p.

Anderson, D., D. Kulis, B. Keafer, K. Gribble, R. Marin, C. Scholin. 2005. Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep Sea Res. II.* 52:2467-2490.

- Band-Schmidt, C. J., D. Rojas, L. Morquecho, N. Hernández. 2008. Heterogeneity of LSU rDNA sequences and morphology of *Gymnodinium catenatum* dinoflagellates strain in Bahía Concepción, Gulf of California, México. *J. plankton. Res.*, 30:755-763.
- Band-Schmidt, C., E. Lilly, D. Anderson. 2003. Identification of *Alexandrium affine* and *Alexandrium margalefii* (Dinophyceae) using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assay. *Phycologia*. 42:261-268.
- Band-Schmidt, C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, E. Núñez-Vázquez, F. E. Hernández-Sandoval. 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21(3): 381-413.
- Bolch, C., M. Salas. 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis" complex* to Australasia. *Harmful algae*. 6:465-485.
- Cho, E. S., E. Costas. 2005. Rapid monitoring for the potentially ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters using fluorescent probe tools. *J. Plankton Res.* 26:175–180.
- Chomérat, N., D.Y. Sellos, F. Zentz, E. Nézan. 2010. Morphology and molecular phylogeny of *Prorocentrum consutum* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic dinoflagellate from south Brittany (northwestern France). *J. Phycol.* 46: 183–194.
- Cohen-Fernández, E. J., F. Pedroche, M. Rodríguez-Palacios, S. Álvarez Hernández, E. Meave del Castillo. 2010. Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the Pacific Coast of Mexico based on the parsimony analysis of fragments of LSUrDNA and SSUrDNA. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2: 29-37.
- Cortés-Altamirano, R. 1998. Distribución y efecto de mareas rojas en México. En: Cortés-Altamirano, R. (ed) *Las mareas rojas*, AGT Editor, México. 33-40p.

Cortés-Altamirano, R., A. P. Sierra-Beltrán. 2003. Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae) J. Phycol. 39: 221–225.

Cortés-Altamirano, R., B. Hernandez, R. Luna. 1996. Red tide in México: a review. En: Proc. of the 7th International Conference on Toxic Phytoplankton IOC of UNESCO.

Cortés-Altamirano, R., D. U. Hernández-Becerril, R. Luna-Soria. 1996. Red tide in Mexico: A review. En: Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y. (eds.) Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC-UNESCO publishing. Sendai, Japón. 101-104p.

Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods. 9:772.

Delbes, C., R. Moletta, J. J. Gordon. 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. Environ Microbiol. 2:506-515.

Diercks, S., K. Metfies, S. Schröder, L. K. Medlin, F. Colijn. 2008. Detection of phytoplankton with nucleic acid sensors. En: Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito A. M., Passarelli, V. (eds.) Algal toxins: Nature, occurrence, effect and detection. Springer, Italy. 285-299 p.

Edvarsen, B., K. Shalchian-Tabrizi, K. Jakobsen, L.K. Medlin, E. Dahl, S. Bruba, E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. J. Phycol. 39: 395-408.

Eldredge, N., J. Cracraft. 1980. Phylogenetic patterns and the evolutionary process: Method and theory in comparative biology. Columbia University Press. New York. 349p.

Faust, M. A. 1990. Morphologic details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including two new species. J. Phycol. 26:548-558.

Faust, M. A. 1991. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. J. Phycol. 27:642–648.

Faust, M. A. 1993. *Prorocentrum belizeanum*, *Prorocentrum elegans*, and *Prorocentrum caribbaeum*, three new benthic species (Dinophyceae) from a mangrove island, Twin Cays, Belize. J. Phycol. 29:100–107.

Faust, M. A., M. W. Vandersea, S. R. Kibler, P. A. Tester, R. W. Litaker. 2008. *Prorocentrum levis*, a new benthic species (Dinophyceae) from a mangrove island, Twin Cays, Belize. J. Phycol. 44:232–240.

Faust, M. A., R. A. Gulledge. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. Smithsonian Institution Contributions U.S. Nat. Her., 42:1-144.

Ghiglione, J. F., G. Mevel, M. Pujo-Pay, L. Mousseau, P. Lebaron, M. Goutx. 2007. Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. Microb. Ecol. 54:217-31.

Ghiglione, J. F., M. Larcher, P. Lebaron. 2005. Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. Aquat. Microb. Ecol. 40:229-240.

Gómez, F. 2005. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. Acta Bot. Croat., 64:129-212.

Granados-Cifuentes, R., F. Rodríguez-Lanetty. 2010. The use of high-resolution melting analysis for genotyping *Symbiodinium* strains: a sensitive and fast approach. Mol. Ecol. Resour. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02933.x

Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycology.32:79-99.

Hallegraeff, G. M. 2004. Taxonomic principles: a global overview. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.) Intergovernmental Oceanographic Commission of

UNESCO. Manual on harmful marine microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology 11. UNESCO Publishing. Paris, France. 418-419p.

Hansen, G., N. Daugbjerg, P. Henriksen. 2000. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. J. Phycol. 36: 394–410.

Hernández-Becerril, D. U., A. Aquino-Cruz, D. A. Salas-De León, M. Signoret-Poillon, M. A. Monreal-Gómez. 2012. Studies on picophytoplankton in the southern Gulf of Mexico: pigment analysis and potential importance of the picoeukaryote Prasinophyte *Micromonas pusilla*. Mar. Biol. Res. 8:331-340.

Hernández-Becerril, D. U., R. Alonso-Rodríguez, C. Álvarez-Góngora, S.A. Barón-Campis, G. Ceballos-corona, J. Herrera-Silveira, M. E. Meave del Castillo, N. Juárez-Ruiz, F. Merino-Virgilio, A. Morales-Blake, J. L. Ochoa, E. Orellana-Cepeda, C. Ramírez-Camarena, R. Rodríguez-Salvador. 2007. Toxic and Harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. J. Environ. Sci. Heal. A. 42:1349-1363.

Hernández-Becerril, D. U., R. Cortés-Altamirano, R. Alonso-Rodríguez. 2000. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coasts of the Mexican Pacific. Hydrobiologia. 418: 111-121.

Herrera, A. 2008. Diseño de métodos moleculares para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo. Dirigida por Norma Y. Hernández Saavedra. Tesis de Maestría Inédita. La Paz, México.

Hoppenrath, M., M. Elbraechter. 2014. Prorocentrales. En: Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim, Y., Hansen, G., Hoppenrath, M., Larsen, J., Lundholm, N., Nguyen, L. N., Zingone (eds) A. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Disponible en línea: <http://www.marinespecies.org/HAB>.

Hoppenrath, M., N. Chomérat, T. Horiguchi, M. Schweikert, Y. Nagahama, S. Murray. 2013. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae)—A proposal and review. *Harmful Algae*. 27:1–28.

Hosoi-Tanabe, S., Y. Sako. 2006. Development and application of Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) method for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensense* and *Alexandrium catenella* in culture and natural seawater. *Fisheries Sci.* 72:77-82.

Hwang, U. W., W. Kim, 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasitol.* 37:215-28.

Janson, S., P. K. Hayes. 2006. Molecular taxonomy of harmful algae. En: Granéli E., Turner J.T. (eds.) *Ecology of Harmful Algae*. Ecological Studies 189. Springer. New York, EUA. 9-21p.

John, U., A. Cembella, C. Hummert, M. Elbrächter, R. Groben, L. K. Medlin. 2003. Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarensense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur J. Phycol.* 38:25-40.

John, U., L. K. Medlin, R. Groben. 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarensense* species complex. Short communication. *J. Plankton Res.* 27: 199–204.

King, S., B. R. McCord, G. Riefler. 2005. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *J. Microb. Meth.* 60:83–92.

Kourkine, I., C. Hestekin, A. Barron. 2002. Technical challenges in applying capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism for routine genetic analysis. *Electrophoresis.* 23:1375–1385.

- Kubista, M. 2008. Emerging real-time PCR applications. *Drug Discov. World.* 57-66.
- Lee, D., Y. Zo, S. Kim. 1996. Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *App. Environ. Microb.* 62:3112–3120.
- Lilly, E. M., K. M Halanych, D. M. Anderson. 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *J. Phycol.* 43:1329-1338.
- Lin, S., H. Zhang, D. Spencer, J. Norman, M. W. Gray. 2002. Widespread and extensive editing of mitochondrial mRNAs dindinoflagellates. *J. Mol. Biol.* 320:727–39.
- Lin, S., H. Zhang, N. Jiao. 2006. Potential utility of mitochondrial Cytochrome b and its mRNA editing in resolving closely related dinoflagellates: a case study of *Prorocentrum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 42:646–654.
- Lin, S., H. Zhang, Y. Hou, Y. Zhuang, L. Miranda. 2009. High level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by DNA barcoding assessment of mitochondrial *cox1* and *cob* for dinoflagellates barcoding. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1279-1290.
- Litaker, R. W., M. W. Vandersea, S. R. Kibler, K. S. Reece, N. A. Stokes, F. M. Lutzoni, B. A. Yonish, M. A. West, N. Black Megan N, P. A. Tester. 2007. Recognizing dinoflagellates species using its rDNA sequences. *J. Phycol.* 43:344–355.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, L. Meier, H. Yadhukumar, A. Buchner, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reaichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.

- Mcmanus G. B., L. A. Katz. 2009. Molecular and morphological methods for identifying plankton: what makes a successful marriage? *J. Plankton Res.* 31:1119–1129.
- Medlin, L. K., 1997. Can molecular techniques help define species limits? *Diatom* 13, 19 - 23.
- Medlin, L. K. 2009. MIDTAL microarrays for the detection of toxic algae EU-FP7-PROJECT. *Harmful algae news.* 39:10-11.
- Miller, P., C. A. Scholin. 1998. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J. Phycol.* 34:371-382.
- Mohammad-Noor, N., Ø. Moestrup, N. Daugbjerg. 2007. Light, electron microscopy and DNA sequences of the dinoflagellate *Prorocentrum concavum* (syn. *P. arabianum*) with special emphasis on the periplagellar area. *Phycologia.* 46: 549–564.
- Moretti, S., A. Wilm, D. G. Higgins, I. Xenarios, C. Notredam. 2008. R-Coffee: a web server for accurately aligning noncoding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 36:W10–W13.
- Morton, S. L., M. A. Faust, E. Fairey, P. D. R. Moeller. 2002. Morphology and toxicology of *Prorocentrum arabianum* sp. nov., (Dinophyceae) a toxic planktonic dinoflagellate from the Gulf of Oman, Arabian Sea. *Harmful Algae.* 1:393–400.
- Murray, S., C. L. C. Ip, R. Moore, Y. Nagahama, Y. Fukuyo. 2009. Are proro-centroid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes. *Protist* 160: 245–264.
- Nagahama, Y., S. Murray, A. Tomaru, Y. Fukuyo. 2011. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters. *J. Phycol.* 47:178–189.

Nataraj, A., I. Olivos-Glander, N. Kusukawa, W. Highsmith. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *J. Electrophoresis*. 20:1177–1185.

Not F., M. Latasa, D. Marie, T. Cariou, D. Vaultot, D. Simon. 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English channel. *App. Environ. Microb.* 70(7): 4064-4072.

Ochoa, J., B. Hernández, C. Lluch, V. Arredondo, V. Núñez, T. Heredia, L. Pérez, R. Alonso. 2002. Marine biotoxins and harmful algal blooms in Mexico's Pacific litoral. *Harmful Algal Blooms in the PICES region of the North Pacific*. PICES Sci. Rep., 23:119-128.

Odell, I., J. Cloud, M. Seipp, C. Wittwer. 2005. Rapid Species Identification within the *Mycobacterium chelonae*–abscessus group by High-Resolution Melting Analysis of hsp65 PCR Products. *Microb. Infec. Disease*. DOI: 10.1309/WDR082X9FFJBQQGB.

Okolodkov, Y. B., I. Gárate-Lizarraga. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Bot Mex.* 74:1-154.

Orita M., Y. Susuki, T. Sekiya, K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5:874-879.

Palumbi, S. R. 1992. Marine speciation on a small placet. *Trends Ecol. Evol.* 7:114–118.

Palumbi, S. R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 25:547–572.

Patil, J., R. Gunasekera, B. Deagle, N. Bax, S. Blackburn. 2005. Development and evaluation of a PCR based assay for detection of the toxic dinoflagellates, *Gymnodinium catenatum* (Graham) in ballast water and environmental samples. *Bio. Invasion.* 7:983-994.

Penna, A., E. Bertozzini, C. Battozzini, L. Galluzi, M. Giacobbe, M. Vila, E. Garcés, A. Luglie, M. Magnani. 2007. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods. *J. Plankton Res.* 29:19-38.

Penna, A., L. Galluzi. 2008. PCR techniques as diagnostic tools for the identification and enumeration of toxic marine phytoplankton species En: Evangelista V., Barsanti L., Gualtieri P., Frassanito A. and Passarelli V. (eds). *Algal toxins: Nature, occurrence, effect and detection*. Springer. Italy. 261-283 p.

Piganeau, G., A. Eyre-Walker, N. Grimsley, H. Moreau. 2011. How and why DNA barcodes underestimate the diversity of microbial eukaryotes. *PLoS ONE* 20, 10.1371/journal.pone.0016342.

Ren, J. 2000. High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 741:115–128.

Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, C. T. Wittwer. 1996. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Ana. Bioche.* 245:154-160.

Rodríguez, A., J. Ghiglione, P. Catala, E. Casamayor, P. Lebaron. 2009. Spatial comparison of total vs. active bacterial populations by coupling genetic fingerprinting and clone library analyses in the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:30–42.

Sako, Y., S. Hosoi-Tanabe, A. Uchida. 2004. Fluorescence *in situ* hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*. *J. Phycol.* 40:598-605.

Savin, M., J. Martin, M. LeGresley, M. Giewat, J. Rooney-Varga. 2004. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microb Ecol.* 48:51-65.

Scholin, C. A., P. Miller, K. Buck, F. Chavez, P. Harris, P. Haydock, J. Hoard, G. Cangelosi. 1997. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol Oceanogr.* 42:1265-1272.

Scholin, C. A., M. Herzog, M. Sogin, D. Anderson. 1994. Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.* 30:99-101.

Scholin, C. A., R. Marin III, P. Miller. 1999. DNA probes and receptor-binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophytaceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.* 35:1356-1367.

Sierra-Beltrán, A. P., R. Cortés-Altamirano, R. Alonso, M. Cortés. 2007. Informe de México. En: (eds) IOC regional Science planning workshop on harmful algal blooms in IOCARIBE-ANCA-IV. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Colombia. 67-71p.

Smith, J. C., P. Odense, R. Angus, S. S. Bates, C. J. Bird, P. Cormier, A. S. W. de Freitas, C. Leger, D. O'Neil, K. Pauley, J. Worms. 1990. Variation of domoic acid levels in *Nitzschia* species: implications for monitoring programs. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada.* 90:27-31.

Spooner, D. M., R. R. van Treuren, M. C. de Vicente. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 136p. <http://www.cgn.wur.nl/UK/CGN+Plant+Genetic+Resources/Research/Molecular+markers>

Stoeck, T., A. Zuendorf, H. Breiner, A. Behnke. 2007. A Molecular Approach to Identify Active Microbes in Environmental Eukaryote Clone Libraries. *Microb. Ecol.* 53:328–339

Takano, Y., K. Matsuoka. 2011. A comparative study between *Prorocentrum shikokuense* and *P. donghaiense* (Prorocentrales, Dinophyceae) based on morphology and DNA sequences. *Plankton Benthos Res.* 6:179–186.

Talmi-Frank, D., A. Nasereddin, L. F. Schnur, G. Schönian, S. O. Töz, C. L. Jaffe, G. Baneth. 2010. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2,4(1):e581.

Taylor, F. 1993. The species problem and its impact on harmful phytoplankton studies. En: Samyda T. J. and Shimizu Y. (eds.) *Toxic Phytoplankton blooms in the sea.* Elsevier Sci. Publi. New York. 81-85p.

Töbe, K., D. Tullis, M. Gladstone, D. Anderson, L. K. Medlin. 2010. Detecting intact algal cells with whole cell hybridization assays. En: Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (eds.) *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.* UNESCO publishing (IOC Manuals and Guides, no. 50). Paris. 55-66 p.

West, N., I. Oberbisterer, O. Zemb, P. Lebaron. 2008. Major differences of bacterial diversity and activity inside and outside of a natural iron-fertilized phytoplankton bloom in the Southern Ocean. *Environ. Microb.* 10:738-756.

Wu, Y., Y. Chen, C. Zhu, B. Wang, H. Yang, F. Yuan, B. Xu. 2009. Multiple PCR-capillary electrophoresis-SSCP used to identify foodborne pathogens. *Eur Food Res. technol.* 228:511-518.

Yentsch, C. M., B. Dale, J. W. Hurts. 1978. Coexistence of toxic and non-toxic dinoflagellates resembling *Gonyaulax tamarensis* in New England coastal waters (N.W. Atlantic). *J. Phycol.* 14: 330-332.

Yeung, P. K., K. F. Kong, F. T. Wong, J. T. Wong. 1996. Sequence data for two large-subunit rRNA genes from an Asian strain of *Alexandrium catenella*. *App. Environ. Microb.* 62:4199-4201.

Yokouchia, H., H. Takeyama, H. Miyashita, T. Maruyama, T. Matsunaga. 2003. *In situ* identification of symbiotic dinoflagellates, the genus *Symbiodinium* with fluorescence-labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. *J. Microb. Meth.* 53:327–334.

Zinger, L., J. Gury, F. Giraud, S. Krivobok, L. Gielly, P. Taberlet, R.A. Geremia. 2007. Improvements of PCR and CE-SSCP method, in microbial ecology: towards a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb. Ecol.* 54:203-216.

Zumstein, E., R. Moletta, J. J. Godon. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microb.* 2:69–78.

11.0 ANEXOS

Anexo 1. Cebadores utilizados en este estudio para las distintas aproximaciones metodológicas (AFD, CE-SSCP, HRM e IES).

Región	Cebador	Aplicación	Secuencia	Longitud (bases)	Tamaño (pb)	Referencia
SSU	HAB SSU 1F	AFD	5'-AACCTGGTTGATCCTCCCAGT-3'	20	1800	Medlin <i>et al.</i> (1988)
	HAB SSU 1528R		5'-TGATCCTTCTCCAGGTTCACTAC-3'	24		Medlin <i>et al.</i> (1988)
V1 SSU	HAB SSU 1F	IES	5'-AACCTGGTTGATCCTCCCAGT-3'	20	250	Medlin <i>et al.</i> (1988)
	ProbePbel		5'-TCACCGAAGGGCCAGGCA-3')	18		Este estudio
V4 SSU	528F	CE-SSCP, HRM	5'-CGGTAATTCAGCTCC-3'	16	350	Elwood <i>et al.</i> (1985)
	690R		5'-AGAATTTACCTCTG-3'	15		Elwood <i>et al.</i> (1985)
ITS/ SSU	HAB ITS 1400F	AFD	5'-TG(C/T)ACACACCGCCCGTC -3'	17	1400	Elwood <i>et al.</i> (1985)
	HAB LSU DICR		5'-ACTCTCTTTCAAAGTCCTT-3'	20		Elwood <i>et al.</i> (1985)
ITS1	HI 80F	HRM	5'-GTGAACCTGCGGAAGGATC-3'	19	320	Herrera (2008)
	HI 400R		5'-CACAATGCWTATCGCAYTTG-3'	21		Herrera (2008)
ITS2	HI 400F	HRM	5'-CGAARTGCGATAWGCATTGTG-3'	21	380	Herrera (2008)
	HI 780R		5'-CTTACTTATATGCTTAAATTCAGC-3'	24		Herrera (2008)
LSU D1D2	HAB LSU D1RF	AFD	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA -3'	20	669	Scholin <i>et al.</i> (1996)
	HAB LSU D2CR		5'-CCTTGGTCCGTGTTCAAGA -3'	20		Scholin <i>et al.</i> (1996)
LSU D5-D8	HAB LSU1239F	AFD	5'-GCTCGCTCATCAGATAC-3'	17	1161	Herrera (2008)
	HAB LSU 2400R		5'-ATGCCAAGCCGTTCC-3'	16		Herrera (2008)
D2 LSU	D1/D2 dinos F	CE-SSCP, HRM	5'-ATCGAGACCGATAGCA-3'	16	389	Este trabajo
	639 R		5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGGG -3'	20		Scholin <i>et al.</i> (1996)
D5 LSU	HAB LSU 79F	HRM	5'-CCSAAAATGGATGGCGCT-3'	18	138	Herrera (2008)
	HAB LSU 217R		5'-TACTACCACCAAGATSTGC-3'	19		Herrera 2008
D7 LSU	HAB LSU 450F	CE-SSCP, HRM	5'-GGKAARCKTTGTCTTYCT-3'	19	180	Herrera (2008)
	HAB LSU 630R		5'-GGCTGCTAAC CTTGGAG-3'	17		Herrera 2008
COB	DinoCob4Fb	AFD	5'-AGCATTATGGGTTATGNTTACCTTT-3'	27	450	Zhang <i>et al.</i> (2007)
	DinoCob3Rb		5'-AGCTTCTANDGMATTATCTGGATG-3'	24		Zhang <i>et al.</i> (2007)

***Nota:** **AFD**, Amplificación de Fragmentos Discretos; **CE-SSCP**, Polimorfismo conformacional de cadena sencilla acoplado a electroforesis capilar; **HRM**: Análisis de disociación de alta resolución e **IES**: Identificación especie-específica

Anexo 2. Programas de PCR utilizados para: AFD, CE-SSCP, HRM e IES

Amplificación de Fragmentos Discretos			
Gen	Segmento	T/t (°C/min)	Ciclos
SSU-LSU; LSU D1D2	Desnaturalización inicial	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/1	35
	Alineamiento	52 °C/1	
	Extensión	72 °C/ 2	
	Extensión final	72 °C/7	1
SSU	Desnaturalización inicial	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/1	35
	Alineamiento	52 °C/1	
	Extensión	72 °C/2	
	Extensión final	72 °C/10	1
LSU D5-D8	Desnaturalización inicial	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/1	40
	Alineamiento	50°C/ 1	
	Extensión	72 °C/1.5	
	Extensión final	72 °C/10	1
COB	Desnaturalización inicial	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/0.5	35
	Alineamiento	50 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/0.5	
	Extensión final	72 °C/7	1
CE-SSCP			
Gen	Segmento	T/t (°C/s)	Ciclos
18S SSU V4, 28S LSU D2 y D7	Desnaturalización inicial	94 °C/6'	1
	Desnaturalización	94 °C/0.5'	5
	Alineamiento	40 °C/0.5'	
	Extensión	72 °C/1'	
	Desnaturalización	94 °C/0.5'	30
	Alineamiento	50 °C/1'	
	Extensión	72 °C/1'	
	Extensión final	72 °C/10'	1

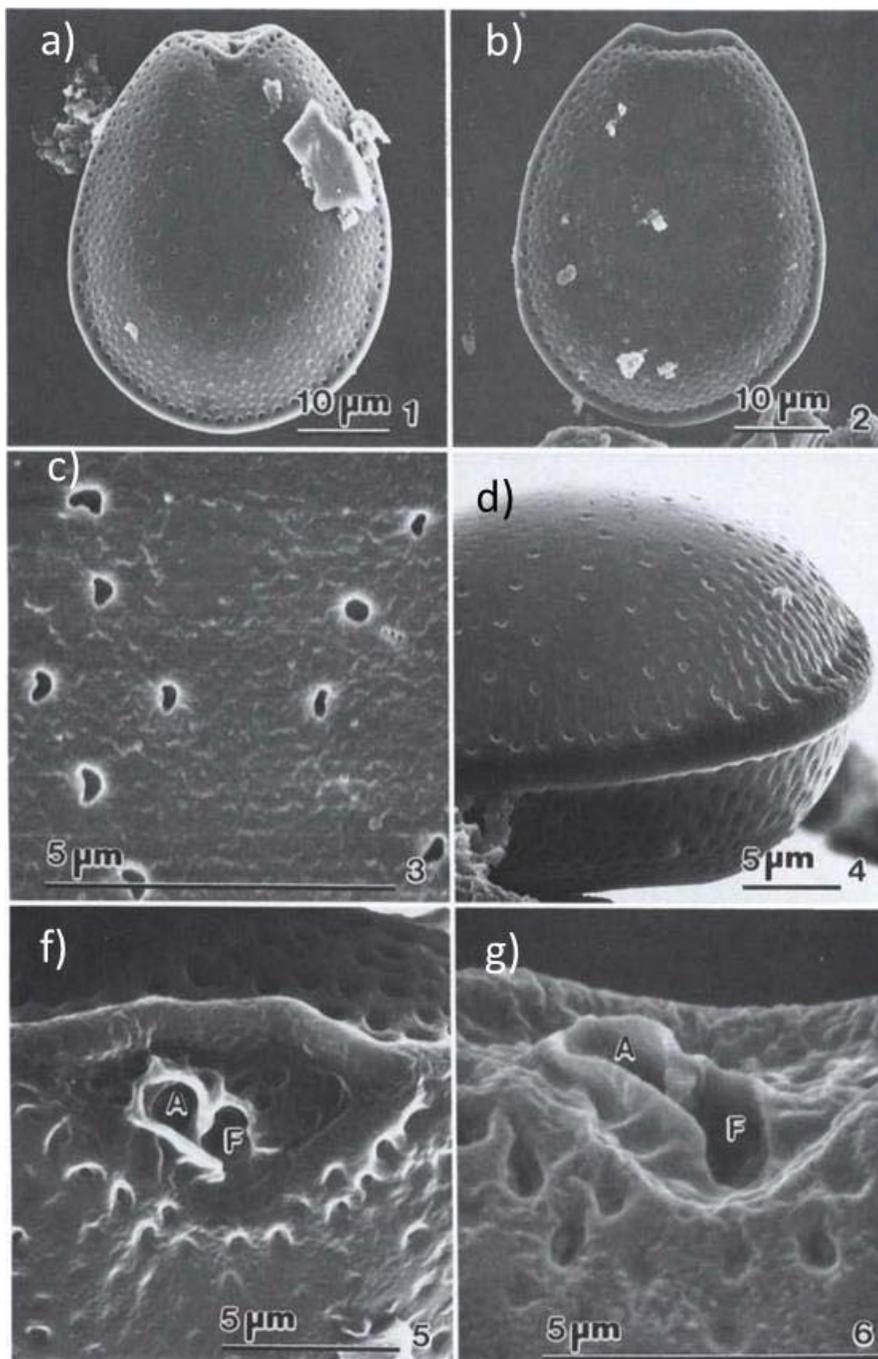
Continuación anexo 2

HRM			
Gen	Segmento	T/t (°C/min)	Ciclos
18S SSU V4, 28S LSU D2	Desnaturalización inicial	94 °C/5	1
	Desnaturalización	94 °C/0.5	30
	Alineamiento	50 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/ 1	
28S LSU D5 Y 28S LSU D7	Desnaturalización	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/2	35
	Alineamiento	52 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/1.0	
ITS 1	Desnaturalización	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/2	35
	Alineamiento	54 y 57 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/1	
ITS 2	Desnaturalización	95 °C/5	1
	Desnaturalización	95 °C/2	35
	Alineamiento	57 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/1	
IES PCR			
Gen	Segmento	T/t (°C/min)	Ciclos
18S SSU V1	Desnaturalización	94 °C/5	1
	Desnaturalización	94 °C/0.5	30
	Alineamiento	50 °C/0.5	
	Extensión	72 °C/ 1	
	Extension final	72°C/ 5	1

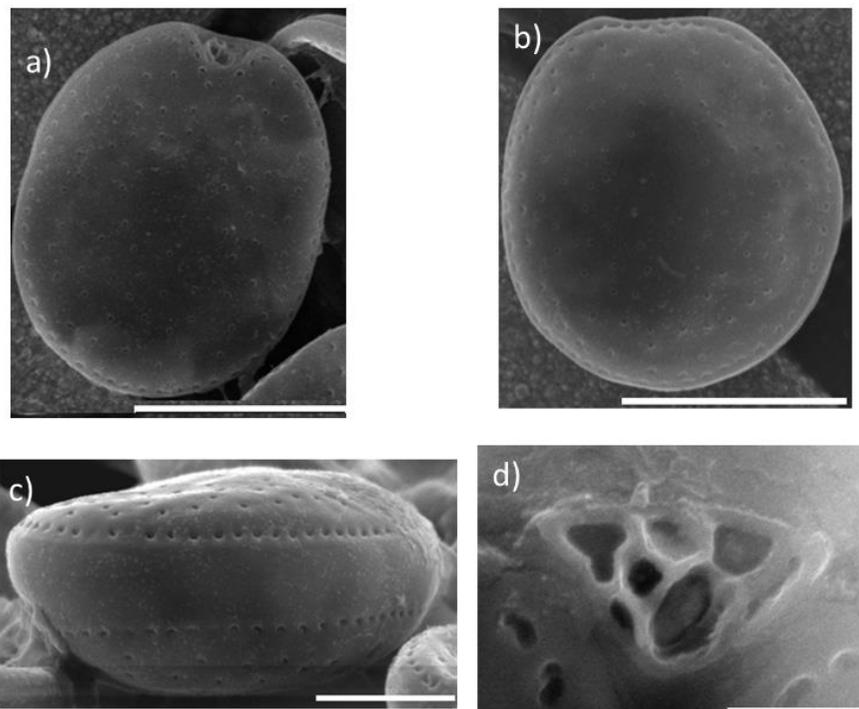
Anexo 3. Secuencias de Prorocentrales bentónicos utilizados en análisis filogenéticos.

Especie	ITS			LSU rDNA		
	Localidad	Cepa	No. de Acceso	Localidad	Cepa	No. de Acceso
<i>Prorocentrum belizeanum</i>	Belice	CCMP2633	DQ238042	Belice	CCMP2633	DQ238042
			KF885226		CCMP2633	KF885226
	Habana, Cuba	PBHV-1	JQ638934.1	Habana, Cuba	PBHV-1	JQ638934.1
	No determinado	CCMP1633	EU927556	La Reunión, Océano Índico	PBMA_01	AJ567460.1
<i>Prorocentrum hoffmannianum</i>				La Reunión, Océano Índico	PHSE_01	AJ567461.1
					PHSE_01_2	AJ567462.1
					PHGE_02	AJ567463.1
					PBGLO1	JX912180
	Florida, EUA	CCMP683	KF885225	Florida EUA	CCMP683	KF885225
			EU927553			EU165315
	Florida, EUA	CCMP2804	KF885224	Florida EUA	CCMP2804	KF885224
			EU927552			KC622311.2
			Australia	SM33	EU196415.1	
			Australia	PHHI01	AY259171.1	
<i>Prorocentrum lima</i>		Tahiti	AB189742		Sorrento 1	DQ336189.1
		CRLMN-4	AB189743		NMNO7	EF566748.1
		USSP-F11	AB189746	México	PL6	*JQ616837
		USSP-F12	AB189747	La Reunión, Océano Índico	PLRN_02	AJ567457.1
		CCMP1370	EU927507		PLMA_01	AJ567458.1
		CCMP2589	EU927513		CCMP1746	DQ336186.1
		CCMP2584	EU927517		SM24	DQ336182
		IP297	EU927492		PL1-11	DQ336188.1
		PQ2	EU927489			
		CCMP1743	EU927508			
		AR3	EU927501			
		CCMP684	EU927503			
<i>Prorocentrum arenarium</i>	España Tenerife	VGO776	EU244470		K-0625	EF566747.1

				La Reunión, Océano Índico	PAEU_01	AJ567456.1
<i>Prorocentrum compressum</i>		CCMP1768	EU927558			
<i>Prorocentrum bimaculatum</i>					IFR10-171	HQ890883
<i>Prorocentrum borbonicum</i>				Golfo de Arabia	PBoRN_02	AJ567467.1
					PBoRN_01	AJ567466.1
<i>Prorocentrum concavum</i>					NMN08	EF566751.1
					PCRN_01	AJ567464.1
<i>Prorocentrum consutum</i>				La Reunión, Océano Índico	IFR454	FJ842378.1
<i>Prorocentrum emarginatum</i>				South Brittany	PES401	EF566750.1
					PERN_05	AJ567465.1
<i>Prorocentrum fukuyoi</i>				Reunion	SM39	EU196416.1
<i>Prorocentrum faustiae</i>				Japón	NMN013	EF566744.1
<i>Prorocentrum levis</i>					IRTA001	FJ160589.1
					KC3	FJ489619.1
<i>Prorocentrum sculpitile</i>					NMN011	EF566749.1
<i>Prorocentrum sigmoides</i>				Viet Nam		EF566746
<i>Toxoplasma gondii</i>						X75430

Anexo 4. Analisis morfológico de *Prorocentrum maculosum*

Micrografías de MEB de la especie *Prorocentrum maculosum*. (tomado de Faust, 1993)



Micrografías de la cepa PMHV-1. a) Valva derecha, b) valva izquierda, c) banda intercalar y d) área periflagelar.

P. maculosum strain PMHV-1

Cells size of *P. maculosum* was variable. The valve length was 33.02 - 48.60 μm (mean $35.88 \pm 1.23 \mu\text{m}$) and width 25.77 - 42.40 μm (mean 30.22 ± 1.34). Cells shape was broad in the middle region tapering toward the anterior region and round in the posterior margin. Variation in valve shape expressed as the L/W ratio varies from 1.09 and 1.44 (mean 1.2 ± 0.09). The valve shape was variable from oval to ovoid; the most common shape was ovoid.

The valve surface was smooth with scattered surface pores, these varied from 43 – 56 (mean 50 ± 5.24 , $n = 6$); the center was devoid of pores and presents a row of marginal pores at the cell periphery, 53-68 pores (mean 59 ± 11.22 , $n = 6$). The intercalary band was smooth in all the cells observed. The right valve has an indentation where periflagellar platelets are fitted in.

The periflagellar area of *P. maculosum* is wide V-shape. There was some variation in the width of the apical region. No obvious ornamentation such as spine or thick flange is visible, except for a small periflagellar collar surrounding the flagellar and auxiliary pore. The left valve margin exhibit a thin apical collar flat to slightly concave. The periflagellar area is composed of eight platelets and it is penetrate by the flagellar and the auxiliary pore. The flagellar pore is larger than the auxiliary pore. For comparison, the platelets have been labeled according to Taylor's scheme (Taylor, 1980). Four platelets (a, d, f and h) border the apical ridge. The auxiliary pore is surrounded by four platelets (b, c, d, and e), while the flagellar pore is surrounded by five platelets (c, d, e, f, and g) in general, but rarely platelet h joined in the flagellar pore. The pores are separated from each other by only one platelet (platelet c).

The cell has a pyrenoid in the central area and a posterior nucleus is located adjacent to the pyrenoid.

Under the previews strain description, we considered that the pore patter in both right and left valve as well as the architecture of the periflagellar area, they are different to the original description of *P. maculosum* proposed by Faust (1993), and the morphology observed are similar to the species *P. lima*.

Anexo 5. Glosario taxonómico

Antapical/anterior: En desmocontes, se refiere a la parte superior de la célula.

Área periflagelar: Conjunto de placas situadas en la zona anterior las cuales se encuentran rodeando los poros flagelares, uno de estos poros es el poro flagelar. Estas placas típicamente se encuentran excavadas en la valva derecha. El área periflagelar puede presentar varias formas como son: arco, forma de V (V-shape), forma de V estrecha y profunda (narrow and deep V-shape) y linear

Areolado/Ornamentación: características del patrón de poros que se encuentra presente en las tecas de dinoflagelados tecados.

Banda Intercalar: Zona de crecimiento marginal que se encuentra entre dos placas (valvas) en el caso de organismos desmocontes.

Bentónico: Que ocurre en el fondo de la columna de agua

Borde engrosado (Thick flange): Parte protuberante de la valva derecha principalmente observada en el borde la excavación del área periflagelas

Cepa: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Collar periflagelar (Inglés: platelet list): Un listón soportada por lo bordes de algunas placas, las cuales rodean a los poros flagelares.

Collar: Característica topográfica de algunos procoentroides (desmocontes). Es una extensión de la banda intercalar presente en la valva izquierda a lo largo del margen anterior, rodeando el área periflagelar. Este puede presentar forma curva, ensanchada (frared), redondeada o aplanada.

Desmoconte. Un tipo de célula de dinoflagelados, la cuál, dos flagelos distintos emergen de la parte anterior de la célula, ejemplo *Prorocentrum* spp.

Excavación/indentación: Espacio ahuecado, cavidad. En desmocontes, se refiere a la apertura en la que se encuentra el área periflagelar.

Flagelado: Son flageladas las células que tienen flagelos

Flagelo longitudinal: Flagelo que provee dirección

Flagelo transversal: Flagelo que provee de propulsión

Flagelos: Estructura en forma de látigo que emerge de la célula y es responsable del propulsar a las células en fluidos líquidos.

Listón (inglés "list): Extensión membranosa de la teca presente en dinoflagelados tecados.

Pirenoide: Estructura citoplasmática principalmente proteica incluida en los cloroplastos de la mayoría de organismos fitoflagelados. Se encuentran asociados con la formación y almacenamiento de reservas (almidón).

Placa: Cada una de las pequeñas piezas que unidas por sus bordes, a manera de mosaico. Su superficie puede hallarse esculpida y sus suturas revestir grados diversos de complejidad.

Poroides (porelike): Pequeña apertura en forma de poro, generalmente son características de ornamentación accesoria.

Poros periflagelares: En dinoflagelados desmocontes, son poros grandes situados en el área periflagelar: conocidos como poro auxiliar (ap) y o poro flagelar.

Posterior: En desmocontes, se refiere a la parte inferior de la célula.

Poros: aperturas reales presentes en la teca

Teca: Complejo de membranas múltiples con vesículas, algunas especies con escamas. Conocida como anphiesma, célula cobertora o pared celular. Todos los dinoflagelados poseen un sistema de membrana que envuelve toda la célula la cuál consiste en un complejo de 3 a 6 membranas. Diferentes autores usan diferentes términos para este complejo basado en sus propias preferencias. El uso de término teca hace el uso de epiteca e hipoteca más práctico.

Tecado: Los dinoflagelados tecados, además de diferenciarse de los atecados por la presencia de placas, también lo hacen porque generalmente la epiteca e hipoteca presentan prolongaciones denominadas cuernos. La epiteca se prolonga en un cuerno apical, y la hipoteca en dos cuerpos antapicales, los cuales en algunas especies corresponden a espinas. El grupo de los tecados también se caracteriza por la presencia de estructuras accesorias: aleta o expansiones aliformes, espinas, etc.

Valva: En los Prorocentrales, se refiere a dos mitades opuestas de la teca. La valva derecha se encuentra excavada por las placas periflagelares.

Anexo 6. Glosario términos utilizados en biología molecular

Ácido desoxiribonucleico (ADN): Ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina (desoxiribonucleótidos). Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucarióticas está confinada en la caja fuerte del núcleo.

Ácido ribonucleico (ARN): ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es ribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, uracilo, citosina y guanina (ribonucleótidos). Actúa como intermediario y complemento de las instrucciones genéticas codificadas en el ADN. Existen varios tipos diferentes de ARN, relacionados con la síntesis de proteínas. Así, existe ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y un ARN heterogéneo nuclear (ARN Hn). El ARN es normalmente el producto de la transcripción de un molde de ADN, aunque en los retrovirus el ARN actúa de plantilla y el ADN de copia.

Ácido Nucleico: Grandes polímeros formados por la repetición de monómeros denominados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos ADN y ARN.

Alineamiento de secuencias: Un alineamiento de secuencias en bioinformática es una forma de representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados.

Árbol filogenético: Un árbol filogenético es un árbol que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común.

Base Nitrogenada (o base) (base): Molécula que forma parte de los ácidos nucleicos (adenina, guanina, citosina, timina y uracilo) y tiene una estructura de anillo heterocíclico compuesto de átomos de carbono y nitrógeno.

Base nucleotídica: Bases nitrogenadas que forma parte de un nucleótido (subunidad que constituye los ácidos nucleicos).

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

Cebador: Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

CE-SSCP: Método de SSCP acoplado a un sistema de electroforesis capilar.

Curva de disociación de Alta resolución (HRM). Técnica que mide el decremento de la fluorescencia del colorante intercalado en el proceso de disociación de la doble cadena de DNA (dsDNA) durante la PCR.

Distancia genética: Medida de la diferencia del material genético entre distintas especies o individuos de la misma especie.

Estructura secundaria del ARN: A diferencia del ADN, las moléculas de ARN son de cadena simple y no suelen formar dobles hélices extensas. No obstante, sí se pliega como resultado de la presencia de regiones cortas con apareamiento intramolecular de bases, es decir, pares de bases formados por secuencias complementarias más o menos distantes dentro de la misma hebra.

Fenotipo: las características observables de un organismo que son reflejo del genotipo y el efecto ambiental.

Gen: Unidad de herencia física y funcional, portadora de información de una generación a la siguiente. Es un segmento de DNA que contiene los elementos necesarios para su función que es la producción de un RNA o una proteína (o polipéptido).

Genbank: Base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN. Realiza una puesta al día cada dos meses.

Genoma: Conjunto de material genético (DNA) de una célula, individuo o especie.

Genotipo: Composición alélica específica de una célula o individuo, bien para todos sus genes o, más comúnmente, para uno o pocos genes.

Hibridación de ácidos nucleicos (ADN o ARN): Proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias en una única molécula de doble cadena.

Hibridación fluorescente *in situ*, células completas (WC-FISH): Técnica que involucra el uso de sondas marcadas con moléculas que emiten una señal de fluorescencia al unirse con una molécula complementaria (hibrida) conocidas con las que comparte un alto grado de similitud y que podemos observar con un microscopio óptico de fluorescencia.

Homología: En biología molecular y en genética, se refiere a la situación en la que las secuencias de dos o más proteínas o ácidos nucleicos son similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo.

Inferencia bayesiana (Bayesian Inference BI). En filogenia, genera la probabilidad posterior de un parámetro, un árbol filogenético y/o un modelo evolutivo, basada en la probabilidad anterior de ese parámetro y la función de verosimilitud de los datos. La aplicación del análisis bayesiano en la inferencia filogenética presenta varias ventajas en comparación con otros métodos de inferencia, como la fácil interpretación de los resultados, la posibilidad de usar información apriorística y algunas ventajas computacionales

Marcador molecular: Fragmentos específicos de ADN que pueden ser identificados en todo el genoma. Los marcadores moleculares están situados en lugares específicos del genoma. Se usan para “marcar” la posición de un gen en concreto o la herencia de una característica particular.

Microarreglo: Matriz de ADN. Distribución ordenada de cientos a miles de moléculas de ADN de secuencia conocida generalmente las sondas o *probes*— sobre un soporte sólido, generalmente vidrio. Estas sondas se hibridan con una solución de ácidos nucleicos desconocidos —las dianas o *targets*— que han sido marcados de antemano mediante algún procedimiento específico.

Nucleótido: Unidad básica que compone los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Cada uno está compuesto a su vez por una base nitrogenada (A; T; C; G) un azúcar y un grupo fosfato.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica para copiar una secuencia de DNA hasta obtener la cantidad deseada (normalmente una cantidad que permite su estudio y caracterización).

Secuenciación de ADN: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Sonda molecular: Fragmento de ADN (o raramente ARN) de pequeño tamaño (normalmente entre 100 y 1000 bases) usado en biología molecular como herramienta para detectar la presencia de ADN o ARN de secuencia complementaria parecida o igual. Nos referimos a segmentos de ácido nucleico de cadena simple utilizados como anzuelos para detectar una pieza de ADN fija en un soporte o suelta dentro de una sopa de moléculas

SSCP: Proceso donde los productos de PCR son desnaturalizados en cadena simples de ADN, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de Poliacrilamida. Con esto, la estructura de cada hebra de ADN de un amplicón adoptará una conformación dada, dependiente de la secuencia nucleotídica, que afectará su migración en el gel. Así dos productos de PCR con diferencias puntuales en su secuencias presentaran distintos patrones electroforéticos de los fragmentos de ADN monocatenarios.

Topología: Aspecto de un árbol filogenético.