



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S. C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Diseño de métodos moleculares para el  
análisis de fitoplancton tóxico y nocivo**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales**

**(Orientación en Biotecnología)**

**Presenta**

**Angélica Herrera Sepúlveda**

**La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2008**

## **ACTA DE LIBERACION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 20 del Mes de Noviembre del 2008, 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:

**"Diseño de métodos moleculares para el análisis de de fitoplancton tóxico y nocivo"**

Presentada por el alumno:

**Angélica Herrera Sepúlveda**

---

Aspirante al Grado de MAESTRO 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. Thelma R. Castellanos Cervantes**  
CO-TUTOR

---

**Dra. M. Lourdes Morquecho Escamilla**  
REVISOR

---

**DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,**  
**DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **Conformación de Comités**

La presente tesis fue dirigida por

Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra

CIBNOR

### **Comité tutorial**

Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra

CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

CIBNOR

M. en C. Roberto Cortes Altamirano

ICML

### **Comité revisor**

Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra

CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

CIBNOR

Dra. M. Lourdes Morquecho Escamilla

CIBNOR

### **Miembros del jurado del examen de tesis**

Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra

CIBNOR

Dra. Thelma R. Castellanos Cervantes

CIBNOR

Dra. M. Lourdes Morquecho Escamilla

CIBNOR

Dr. Felipe J. Ascencio Valle

CIBNOR

(Suplente)

## RESUMEN

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. Dentro de este contexto, se han enfocado esfuerzos al establecimiento de sistemas de monitoreo ambiental y biológico en diferentes países, tanto para estudiar las relaciones entre variabilidad ambiental y la presencia y peligrosidad de eventos, como para desarrollar una capacidad predictiva que permita la toma oportuna de medidas preventivas y correctivas. Aún cuando la frecuencia con que se presentan estos eventos en aguas mexicanas va en aumento, en nuestro país los estudios para eficientar el monitoreo biológico y ambiental no ha sido adecuadamente atendido.

El método clásico para la detección y enumeración de especies formadoras de FAN, es la observación directa de material vivo o fijado, mediante microscopia de luz. Sin embargo, este proceso es tedioso y lento, y requiere de taxónomos expertos. Para resolver estos problemas, en los últimos años se ha incrementado la atención de la comunidad científica en el uso y desarrollo de técnicas moleculares basadas principalmente en el ADN ribosomal.

Como primera fase, se obtuvieron secuencias nucleótidas de 12 especies de dinoflagelados pertenecientes a los órdenes Gonyaulacales (*Alexandrium affine*, *Alexandrium margaleffi*, *Gonyaulax spinifera*, *G. turbiney* y *Lingulodinium polyedrum*, Prorocentrales (*Prorocentrum mexicanum*, *P. minimum* y *P. lima*) y Gymnodiniales (*Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum* -2 variedades- y *Cochlodinium polykrikoides*); empleando cebadores para dos niveles de especificidad taxonomica (dominio Eukarya y clase Dynophyceae), que flanquean regiones codificantes (Subunidad pequeña SSU, Subunidad grande LSU y 5.8S) y no codificantes (Secuencias intertranscritas ITS1 e ITS2) del ADNr. Las secuencias obtenidas, se confrontaron con las bases de datos mundiales mediante, para determinar, excluir o confirmar la especie, según el caso. Con los cebadores que flanquean la región SSU-ITS-LSU, se confirmó 1 especie (*C. polykrikoides*), mientras que se generaron 54 nuevos registros, para *Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum* -2 variedades-, *A. margaleffi*, *A. affine*, *G. spinifera*, *G. turbiney*, *L. polyedrum*, *P. lima*, *P. minimum*, y *P. mexicanum*.

Como segunda fase, se utilizaron las secuencias obtenidas para llevar a cabo el diseño de sondas de ADN especie-específicas y cebadores aplicables a la técnica polimorfismo conformacional en hebra simple (SSCP). Se realizaron análisis de alineamiento (programa DNAMAN) para ubicar tanto las regiones variables como las conservadas de las diversas regiones génicas analizadas. Finalmente como tercera fase, se diseñaron 3 parejas de nuevos cebadores, aplicables al formato de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o blotting y dos aplicables al formato de SSCP.

**Palabras Clave:** Fitoplancton toxico y nocivo, métodos moleculares, ADNr.

Vo.Bo. Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra  
Director de Tesis

## ABSTRACT

The relevance of Harmful algae blooms (HAB) study is that one of the most important aspect in the phytoplanktonic study, derives of the increasing number and frequency of this events through the coastal ocean. In this context, it has focus in the establishment of biological and environmental monitoring programs in different countries, the objective is generate information about the relation between environmental parameters and the present and danger of this events, and to develop a predictive capacity, that permits to take preventive and corrective actions. Although the increasing in the frequency of this event presents in Mexican waters, at the time, in our country the studies to improve the biological and environmental monitoring program have been inadequate.

The classical approach for detecting and enumerating phytoplankton species is the direct observation by light microscopy of live or preserved material, however, it is considered to be tedious, time-consuming and requiring an appropriate level of experience/expertise in phytoplankton identification. To solve these problems, attention has increasingly focused on molecular techniques that use genetic markers like ribosomal DNA.

In this study, we obtained nucleotide sequence of twelve culture species of dinoflagellates which belong to the order Gonyaulacales (*Alexandrium affine*, *Alexandrium margaleffi*, *Gonyaulax spinifera*, *G. turbiney* y *Lingulodinium polyedrum*, Prorocentrales (*Prorocentrum mexicanum*, *P. minimum* y *P. lima*) y Gymnodiniales (*Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum* -2 variety- y *Cochlodinium polykrikoides*); with universal primers for two levels of taxonomic specificity (domain Eukarya and class Dynophyceae), targeting coding (Small SSU 18S, partial large subunit LSU, 5.8S) and noncoding (Internal transcribed spacer ITS1 and ITS2) parts of the rDNA. The nucleotide sequence, were submitted in worldwide bases, to determine, exclude o confirm the species. With the primers which target SSU-ITS-LSU region, we confirm one specie (*C. polykrikoides*), 54 new sequences were generated in the case of *Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum* -2 varieties, *A. margaleffi*, *A. affine*, *G. spinifera*, *G. turbiney*, *L. polyedrum*, *P. lima*, *P. minimum*, y *P. mexicanum*.

In the second part of the study, the sequences generated were used to design specie-specific DNA probes and primer for Single Strand conformation polymorphism (SSCP). The alignment analysis was carrying out using the program DNAMAN to find variable and conserved regions in the different genetic regions analyzed. Finally as the third part, three pairs of new primers were designs, applicable at the format Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) or blotting and two applicable at the format SSCP.

Vo.Bo. Dra. Norma Y. Hernandez Saavedra  
Director de Tesis

## DEDICATORIA

*A mis padres, porque soy quien soy gracias a ustedes...*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (205502) la cual financio el desarrollo de esta investigación.

A mi comité tutorial, por su adecuada orientación para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Genética Molecular, porque más halla de un equipo de trabajo se convirtieron en mis amigos y familia.

A la Dra. Norma, gracias por sus consejos, guía, orientación y paciencia, los cuales me dieron las herramientas necesarias para culminar esta etapa académica y sobretodo por sembrar en mí el interés por la ciencia.

Al Personal de posgrado y Computo (Dra. Thelma, Osvelia, Lety, Claudia, Betty, Horacio, Manuel). Por las facilidades y amabilidad que me brindaron durante el desarrollo de mis estudios de maestría.

A Ana Maria y Tony, por recibirme siempre con una cálida sonrisa.

A mis Amigas (Getzabeth, Yssel, Nadia, Paulina, Arlett, Vero, Tania, Rossy, Yareli) y Amigos (Jorge, Adán, Octavio, Raúl, Leiberth) por ser como mis hermanitos; por darnos apoyo aun en los momentos difíciles, por reír, llorar y maldecir juntos (☺); y en especial, por enseñarme a ver al mundo de una forma diferente.

A Hugo Palafox C. por todo el amor, apoyo, comprensión durante esta etapa, por ser mi compañero y amigo, por creer en los moñitos a pesar de los tontos charcos, por no dejarme caer y ayudarme a seguir adelante(ILUSM malmalian...!!).

A mi familia, por brindarme confianza, apoyo y cariño incondicional, por creer en mí y por permitirme alcanzar mis sueños.

## ÍNDICE

Contenido	Páginas
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Los dinoflagelados	4
1.1.1 Morfología	5
1.1.2 Características celulares y ciclo de vida	7
1.1.3 Toxicidad	9
1.1.4. Taxonomía	11
1.1.4.1 Taxonomía molecular	11
1.1.4.1.1 Marcadores moleculares	12
1.1.4.1.2 Técnicas moleculares empleadas para la identificación de especies formadoras de FAN y análisis de comunidades fitoplanctónicas	15
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>	21
2.1 Situación del litoral mexicano	21
2.2 Impactos: económico y en la vida marina	22
2.3 Programas de monitoreo	24
2.3.1 Métodos de monitoreo	26
2.3.1.1 Imágenes de satélite	26
2.3.1.2 Robots	27
<b>3. HIPÓTESIS</b>	29
<b>4. OBJETIVOS</b>	29
4.1 OBJETIVO GENERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
5.1 Organismos de estudio	31
5.1.1 Mantenimiento de cepas y colecta de biomasa	31
5.2 Extracción de DNA	31
5.2.1 Disrupción celular	32
5.2.2 Purificación	33
5.2.3 Digestión del ARN	33
5.2.4 Cuantificación y análisis de la integridad	33
5.3 Amplificación fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
5.4 Secuenciación	36
5.5 Análisis de secuencia	37
5.6 Métodos de hibridación	37
5.6.1 Dot Blot-Dig	37
5.6.1.1 Marcado de sonda	37
5.6.1.2 Pre-hibridación	39
5.6.1.3 Hibridación	39

5.6.1.4 Detección Inmunológica	39
<b>6. RESULTADOS</b>	40
6.1 Extracción de ADN	40
6.2 Amplificación de fragmentos discretos del ADNr	40
6.3 Secuenciación y análisis de alineamiento	42
6.3.1 Orden Gymnodiniales	43
6.3.1.1 <i>Akashiwo sanguinea</i> , ASCV-1.	43
6.3.1.2 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> , CPPV-1	44
6.3.1.3 <i>Gymnodinium catenatum</i> , GCCV-1 y GCMV-1	46
6.3.2 Orden Gonyaulacales	48
6.3.2.1 <i>Alexandrium affine</i> , AACQ-1	49
6.3.2.2 <i>Alexandrium margalefii</i> , AMCQ-1	51
6.3.2.3 <i>Gonyaulax spinifera</i> , GSCQ-1	53
6.3.2.3 <i>Gonyaulax turbiney</i> , GTCQ-1	55
6.3.2.3 <i>Lingulodinium polyedrum</i> , LPCQ-1	56
6.3.3 Orden Prorocentrales	57
6.3.3.1 <i>Prorocentrum lima</i> , PLPV-1	57
6.3.3.2 <i>Prorocentrum minimum</i> , PIPV-1	58
6.3.3.3 <i>Prorocentrum mexicanum</i> , PXPV-1	60
6.4 Variabilidad intraespecífica	61
6.5 Diseño de cebadores	66
6.6. Pruebas de Hibridación	72
<b>7. DISCUSIÓN</b>	74
7.1 Obtención de ADN	74
7.2 Amplificación por PCR	75
7.3 Análisis de alineamiento	77
7.4 Diseño de cebadores	78
7.5 Variabilidad intraespecífica	83
7.6 Pruebas de hibridación	85
7.7 Taxonomía molecular	87
<b>8. CONCLUSIONES</b>	88
<b>9. RECOMENDACIONES</b>	90
<b>9. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	91
<b>10. ANEXOS</b>	104
1. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Gymnodiniales	104
2. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Gonyaulacales	106
3. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Prorocentrales	109
<b>11. GLOSARIO</b>	111

## INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura 1.</b> Guía gráfica de los procesos que controlan las HABs de acuerdo al GEOHAB Science Plan (2001).	3
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de dinoflagelados desmocontes ( <i>Prorocentrum</i> , panel A) y dinocontes ( <i>Peridinium</i> , panel B).	6
<b>Figura 3.</b> Microfotografía de un dinoflagelado dinoconte atecado ( <i>Cochlodinium polykrikoides</i> ).	6
<b>Figura 4.</b> Estructura de un dinoflagelado tecado tipo.	7
<b>Figura 5.</b> Ciclo vital de un dinoflagelado tipo.	9
<b>Figura 6.</b> Mapa de localización de Estados de la Republica Mexicana afectados por los eventos FAN.	21
<b>Figura 7.</b> Modelo de un fragmento de ADN ribosomal.	35
<b>Figura 8.</b> Esquema del diseño experimental para la determinación de la sensibilidad y límite de detección de ADN de las sondas AMCQ, LPCQ Y GSCQ marcadas con Digoxigenina.	38
<b>Figura 9.</b> Esquema del diseño experimental para determinar la especificidad de las sondas AMCQ, LPCQ Y GSCQ marcadas con Digoxigenina.	38
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de TBE/agarosa-synergel al 1% de ADN total de varias especies de dinoflagelados.	40
<b>Figura 11.</b> Ejemplos de amplicones obtenidos usando las diversas combinaciones de cebadores dirigidos a diversas regiones del ADNr.	41
<b>Figura 12.</b> Concentrado de características de la secuencia y modelo gráfico del fragmento del ADNr de <i>A. sanguinea</i> .	44
<b>Figura 13.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>C. polykrikoides</i> (CPPV-1).	45
<b>Figura 14.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>G. catenatum</i> (GCCV-1 y GCMV-1).	46
<b>Figura 15.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>A. affine</i> (AACQ-1).	50
<b>Figura 16.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>A. margaleffi</i> (AMCQ-1).	52
<b>Figura 17.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>G. spinifera</i> (GSCQ-1).	54
<b>Figura 18.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>G. turbiney</i> (GTCQ-1).	55
<b>Figura 19.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>L. polyedrum</i> (LPCQ-1).	56
<b>Figura 20.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos de ADNr de <i>P. lima</i> (PLHV-1).	58

<b>Figura 21.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>P. minimum</i> (PIPV-1).	59
<b>Figura 22.</b> Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de <i>P. mexicanum</i> (PXPV-1).	60
<b>Figura 23.</b> Representación gráfica del análisis de alineamiento de la secuencia consenso del extremo 5' de los amplicones de tipo III (cebador 1, HAB ITS SSU 1F cebador 6, HAB LSU 1R).	67
<b>Figura 24.</b> Representación gráfica del análisis de alineamiento del extremo 5' de los amplicones de tipo I (cebador 3, HAB SSU 1F).	69
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica del análisis de alineamiento de la secuencia consenso del extremo 5' del amplicón de tipo IV (cebador 5, HAB LSU 1F y 7 HAB LSU 2R).	70
<b>Figura 26.</b> Representación gráfica del análisis de alineamiento del extremo 5' del amplicón de tipo V (cebador 8, HAB LSU 2F).	71
<b>Figura 27.</b> Pruebas preliminares de sensibilidad y de límite de detección de ADN total no marcado de: a) <i>A. margaleffi</i> ; b) <i>G. spinifera</i> ; c) <i>L. polyedrum</i> .	72
<b>Figura 28.</b> Pruebas preliminares de hibridación cruzada a diferentes temperaturas.	73

## INDICE DE TABLAS

Contenido	Páginas
<b>Tabla I.</b> Toxinas producidas por organismos formadores de FAN y síndromes asociados.	10
<b>Tabla II.</b> Ubicación taxonómica de los dinoflagelados según el sistema de nomenclatura propuesto por Steidinger y Tangen (1997).	11
<b>Tabla III.</b> Regiones del ADNr empleadas para la identificación y caracterización de organismos formadores de FAN.	14
<b>Tabla IV.</b> Eventos asociados con FAN en Golfo de California y Costas de B. C. Sur.	23
<b>Tabla V.</b> Información general de las cepas utilizadas.	32
<b>Tabla VI.</b> Condiciones de amplificación para las combinaciones de cebadores utilizadas (ITS/SSU, SSU y LSU).	34
<b>Tabla VII.</b> Listado de cebadores utilizados.	36
<b>Tabla VIII.</b> Resumen de amplicones obtenidos para las especies en estudio usando las diferentes combinaciones de cebadores.	42
<b>Tabla IX.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>A. sanguinea</i> (tax ID: 143672) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	44
<b>Tabla X.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>C. polykrikoides</i> (tax ID:77300) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	47
<b>Tabla XI.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>G. catenatum</i> (tax ID:39447) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	49
<b>Tabla XII.</b> Principales secuencias de nucleótidos de <i>A. affine</i> (tax ID: 39453) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	51
<b>Tabla XIII.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>A. margalefii</i> (tax ID: 109239) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	53
<b>Tabla XIV.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>G. spinifera</i> (tax ID: 66791) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	55
<b>Tabla XV.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>L. polyedrumi</i> (tax ID: 160621,2913) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	57
<b>Tabla XVI.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>P. lima</i> (tax ID:39448) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	62
<b>Tabla XVII.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>P.minimum</i> (tax ID:39449) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	63

<b>Tabla XVIII.</b> Secuencias de nucleótidos de <i>P. mexicanum</i> (tax ID: 7267) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).	64
<b>Tabla XIX.</b> Resumen de modificaciones nucleotídicas observadas en las secuencias obtenidas, por especie y/o cepa, en comparación con las secuencias homologas del GenBank.	65
<b>Tabla XX.</b> Listado de cebadores diseñados para generación de sondas de hibridación y análisis SSCP.	66

## 1. INTRODUCCIÓN

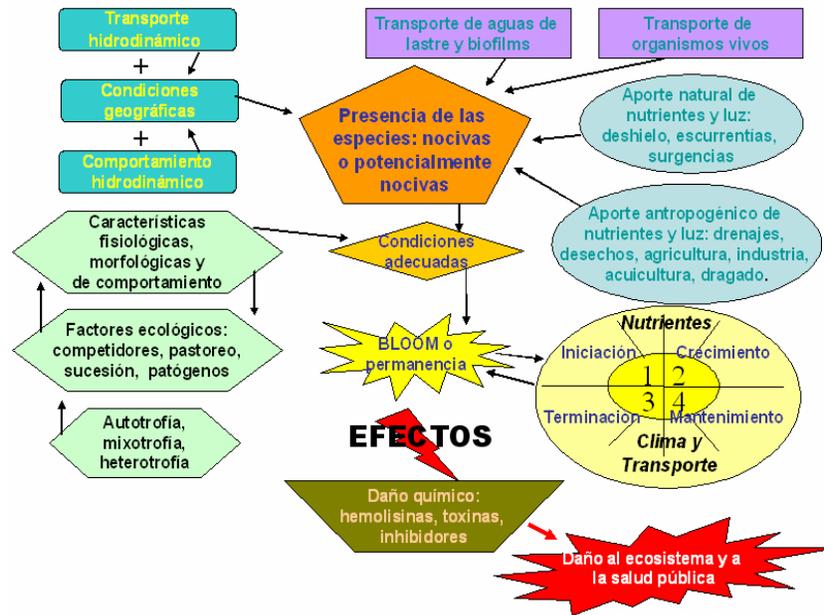
La materia orgánica particulada suspendida en los océanos que es incapaz de presentar oposición al movimiento de los cuerpos del agua se conoce como *plancton*. El plancton, puede ser dividido en dos grandes fracciones: a) la fracción animal denominada *zooplancton*, que esta compuesta principalmente por rotíferos, copépodos y larvas de peces y de invertebrados, y b) la fracción vegetal, el *fitoplancton*, que esta compuesta por diatomeas, dinoflagelados, coccolitofóridos, silicoflagelados, algas verdeazules, algas verdes y pardas, y euglenoides.

Se denomina fitoplancton a la comunidad de organismos con capacidad de locomoción restringida o nula, que flota libremente o es arrastrada por los movimientos del agua, pero que sedimenta lentamente por tener una densidad ligeramente superior que la del agua (Tomas, 1997). Los organismos fitoplanctónicos son en su mayoría son autótrofos, es decir, fijan la energía solar mediante la fotosíntesis utilizando dióxido de carbono, nutrientes y metales traza para generar oxígeno y materia orgánica. Pero mas allá de convertir carbono inorgánico en carbono orgánico, los organismos fitoplanctónicos utilizan el nitrógeno inorgánico para producir además de aminoácidos algunas vitaminas (B<sub>12</sub>, biotina y tiamina) (Steidinger y Curt, 1973).

Por esta razón, la enorme productividad de los océanos se basa en el fitoplancton, ya que son responsables de la producción de más del 90% de las sustancias orgánicas marinas y proveen el oxígeno esencial que sustenta la vida en el planeta (Granéli y Turner, 2006). Debido a lo anterior, al fitoplancton coloquialmente se le conoce como el pasto del mar, ya que es el primer eslabón de la cadena trófica, por ser el principal alimento natural para moluscos bivalvos filtradores, ciertos peces herbívoros filtradores (sardinas y anchovetas) y larvas de diferentes organismos marinos (peces, moluscos y crustáceos), que

a su vez son alimento marino esencial para los seres humanos (Hallegraeff, 1991; Van den Hoek *et al.*, 1995).

De las 5,000 especies de microalgas marinas descritas (Andersen, 1996), aproximadamente 300 pueden presentarse en cantidades tan elevadas (floraciones) que cambian el color de la superficie del mar, generando los fenómenos que conocemos ordinariamente como mareas rojas (Hallegraeff, 1995; Smayda, 1997; Lindahl, 1998). Las mareas rojas o floraciones algales nocivas (FAN y en inglés "Harmful Algal Blooms o HABs"), son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de mecanismos físicos, químicos y biológicos, como son: las surgencias, la influencia de vientos y corrientes, la estratificación de la columna de agua, los frentes de contacto entre dos masas de agua de diferente densidad, la luz, la disponibilidad de nutrientes ( $N_2$ ,  $O_2$ , P) y elementos traza (Fe y vitaminas), la salinidad y/o la temperatura, historia natural de vida (pastoreo, forma de obtención de energía (autótrofo, heterótrofo), capacidad de formación de quistes) ó por alteraciones de origen antropogénico (Samyda, 1997; Alonso y Ochoa, 2004; Suárez y Guzmán, 1998). Steindinger (1975) propuso una hipótesis de la secuencia de eventos necesaria para lograr el desarrollo de los fenómenos FAN: 1) iniciación, 2) crecimiento, 3) mantenimiento y 4) terminación. Sin embargo, esta hipótesis ha sido modificada bajo la perspectiva del modelo propuesto por GEOHAB (2001), que establece que los procesos biológicos y físicos deben considerarse en escalas de tiempo y espacio, y bajo una perspectiva multidisciplinaria (y no en forma aislada). Esta propuesta se basa en el hecho de que algunas interacciones físico-biológicas son dominadas por procesos físicos de gran escala, como el transporte y la advección, mientras que en otros casos, los factores biológicos de comportamiento, como son la agregación y el nado, son los factores que afectan la distribución de las floraciones algales nocivas (GEOHAB 2001; figura 1).



**Figura 1.** Guía gráfica de los procesos que controlan las FAN de acuerdo al Global (GEOHAB) Science Plan (2001). Cortesía: Arturo P. Sierra-Beltrán.

El término “Floraciones Algas Nocivas” o FAN ha sido acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) para designar las apariciones de un grupo heterogéneo de microorganismos, que son percibidas por el hombre como dañinas, debido a sus efectos adversos en el ambiente. Este tipo de eventos es causado por diversos microorganismos (microalgas, cianobacterias), siendo nocivas algunas especies aún a bajas densidades, es decir, sin llegar a formar “blooms” ó cambios de coloración aparente en las masas de agua (Anderson, 2003; Van Egmond *et al.*, 2005). Estos eventos pueden presentarse como rojo, verde, ocre o amarillo, dependiendo de las especies que lo compongan así como el pigmento, el tamaño y la densidad de los organismos, entre otros factores (Van Egmond *et al.*, 2005). En general, en los episodios de FAN suele predominar una sola especie, es decir son eventos unialgales, lo que esta relacionado con fenómenos de predación, exclusión inhibitoria y/o sucesión de especies, entre otros (Steidinger y Haddad 1981; Smayda, 1997).

Los eventos FAN se pueden clasificar en tres tipos principales: inocuos, nocivos y tóxicos. Las floraciones algales *inocuas*, son aquellas en las que se presentan especies de microalgas que producen cambios en la coloración en

las masas de agua siendo totalmente inofensivas, de hecho, en muchas ocasiones son benéficas y responsables de la elevada productividad primaria de ciertas regiones de los océanos. Las floraciones algales *nocivas*, son aquellas en las que las especies pueden florecer tan densamente (del orden de  $10^6$  céls./L) que matan indiscriminadamente peces e invertebrados (especialmente en sistemas de cultivo intensivo) al agotar el oxígeno, y obstruyendo y dañando sus branquias. Finalmente, las floraciones algales *tóxicas*, son aquellas en las que las especies formadoras, generalmente dinoflagelados, producen toxinas no proteicas de bajo peso molecular y que se incorporan rápidamente en las tramas tróficas; estas floraciones no necesariamente están asociadas a cambios evidentes en la coloración de los cuerpos de agua (Steindinger, 1975; Sournia, 1995; Reguera (2002). Se han descrito alrededor de 75 especies de microalgas capaces de producir toxinas que se transfieren a través de la cadena alimenticia (moluscos, crustáceos y peces de escama) para ser consumidas finalmente por el hombre, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas (Hallegraeff, 1995; Reguera, 2002; Wang *et al.*, 2005); además de tener serias repercusiones en las actividades de acuicultura, recreación, turismo y en las poblaciones naturales de organismos marinos de las zonas costeras (Reguera, 2002).

### **1.1 Los dinoflagelados**

Dinoflagellata o Pyrrhophyta (del griego "pyrrhos" que significa llamacoloreada y phyta que significa planta), son términos que comprenden una gran variedad de especies con formas y tamaños diversos. Los dinoflagelados son un grupo extenso de organismos eucarióticos, unicelulares, constituido de 1555 especies (excluyendo Phytodiniales Christensen ex Loeblich III), representadas en más de 117 géneros (Gómez, 2005). Las poblaciones de dinoflagelados se distribuyen en función de la temperatura, la salinidad y la profundidad.

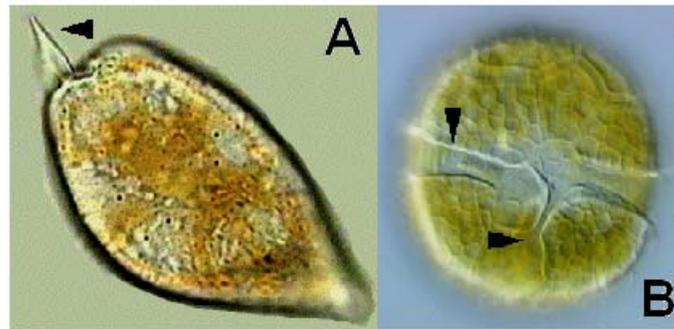
La mitad de los dinoflagelados poseen cloroplastos, son especies fotosintéticas y constituyen el grupo más grande de algas eucariontes además

de las diatomeas. Ciertas especies fotosintéticas, como las zooxantelas, son endosimbiontes de animales (corales, anémonas y almejas) y protozoos marinos, desempeñando un papel importante en la biología de los arrecifes coralinos (Fensome *et al.*, 1993). El resto (que no presentan cloroplastos) incorporan materia orgánica en suspensión o fagocitan bacterias u otros flagelados (Suárez y Guzmán, 1998) como vía de obtención de energía.

### **1.1.1 Morfología**

Es claro que los dinoflagelados poseen estructuras únicas, que permiten, en gran medida, hacer una adecuada identificación de los mismos. Sin embargo, no existe un rasgo común que clasifique a todos los dinoflagelados, aunque la característica morfológica más común entre ellos es la presencia de dos flagelos disimilares localizados en ranuras o depresiones (Tomas, 1997). De acuerdo al arreglo de los flagelos estos pueden dividirse en dos tipos: 1) *desmocontes*, como en el género *Prorocentrum*, que posee dos flagelos disímiles que emergen de la parte anterior de la célula (figura 2A), y 2) *dinocontes*, como en el género *Peridinium* en donde uno de los flagelos forma un círculo lateral y se denomina flagelo transversal, mientras que el otro se extiende hacia abajo y se denomina flagelo longitudinal (figura 2B). El flagelo transversal proporciona la mayor parte de la fuerza que propulsa a la célula e imparte a menudo un movimiento giratorio distintivo; el flagelo longitudinal funciona principalmente como timón, aunque también produce una cierta fuerza propulsora (Taylor, 1987). Los dinoflagelados tienen una cubierta celular compleja llamada anfiesma integrada por vesículas planas denominadas alvéolos. En algunas especies, éstas se apoyan en placas de celulosa entrelazadas que componen una especie de armadura llamada teca (Dodge, 1982).

Otra forma de clasificar a los dinoflagelados en dos grandes subgrupos bien definidos, es según estos tengan el cuerpo cubierto o no por una teca; estos grupos son designados: *tecados* y *atecados* (o desnudos).



**Figura 2.** Ejemplos de dinoflagelados desmocontes (*Prorocentrum*, panel A) y dinocontes (*Peridinium*, panel B); las flechas muestran la posición de los flagelos. Tomado de: <http://www.smhi.se/oceanografi/oce> y <http://silicasecchidisk.conncoll.edu>, respectivamente.

Los primeros tienen la célula encerrada en una teca formada por placas separables de estructuras carbohidratadas y calcáreas (figura 3). En el segundo grupo, el organismo está cubierto de una membrana resistente y carece de placas; estas características y la morfología de la célula son importantes para su clasificación (La Barbera, 1993).

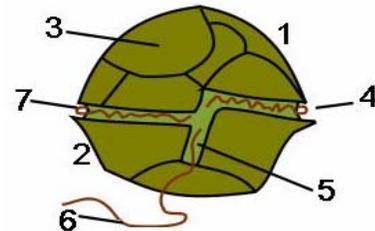
*1.1.1.1 Dinoflagelados atecados:* la morfología de este grupo de dinoflagelados es difícil, ya que su condición de organismos desnudos hace difícil su preservación, con la formalina se destruyen o pierden su forma original. Un buen agente para este grupo es la solución de lugol con la que se fijan las muestras para recuento. Por convención la estructura celular de los atecados se divide en dos regiones una superior o *epicono* (epiteca) y una inferior o *hipocono* (hipoteca), ambas separadas por el *cingulum*, que corresponde a un surco transversal que rodea a toda la célula y que aloja al flagelo transversal. En el hipocono, y en posición ventral, se encuentra el *sulcus*, el cual corresponde a un surco longitudinal que aloja al flagelo longitudinal



**Figura 3.** Microfotografía de un dinoflagelado dinoconte atecado (*Cochlodinium polykrikoides*). Tomado de: <http://www.cearac-project.org>.

1.1.1.2 *Dinoflagelados tecados*: este tipo de microorganismos, tienen la pared dividida en placas arregladas en series específicas. La estructura básica de la teca consiste en una membrana externa continua la cual enlaza los flagelos y cubre completamente la superficie celular excepto cuando esta tiene poros. El arreglo celular de este grupo se basa también en dos regiones denominadas epiteca la superior, e hipoteca la inferior (figura 4). Al igual que en los atecados, ambas se encuentran separadas por el cingulum y el sulcus. Los dinoflagelados tecados, además de diferenciarse de los atecados por la presencia de placas, también lo hacen porque en ocasiones, la epiteca e hipoteca presentan prolongaciones denominadas cuernos. La epiteca se prolonga en un cuerno apical, y la hipoteca en dos cuernos antapicales, los cuales en algunas especies corresponden a espinas. El grupo de los tecados también se caracteriza por la presencia de estructuras accesorias como aletas o expansiones aliformes. Las placas de naturaleza celulósica que forman parte de la pared de estos organismos, son consideradas como la característica taxonómica más importante, ya que su forma, número y posición es propia de cada especie.

**Figura 4.** Estructura de un dinoflagelado tecado tipo. 1, Epiteca; 2, Hipoteca; 3, Placa de la teca; 4, Cíngulo; 5, Sulcus; 6, Flagelo longitudinal; 7. Flagelo transversal.



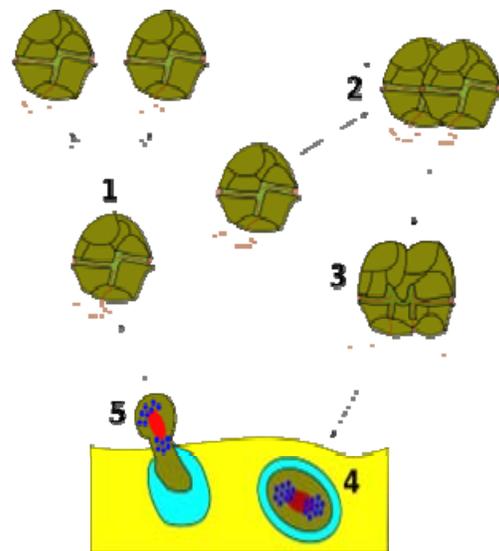
### **1.1.2 Características celulares y ciclo de vida**

Los dinoflagelados, presentan cloroplastos en forma de discos o varillas con clorofilas "a" y "c",  $\beta$ -caroteno y algunas xantofilas específicas tales como la peridininina, neoperidininina, dinoxantina, diadinioxantina y neodinoxantina (Spector, 1984). Las distintas combinaciones de pigmentos les proporcionan una coloración amarilla, pardo-amarillenta, parda, verde azul, etc. Los dinoflagelados presentan la capacidad de almacenar almidones y grasas, siendo los *pirenoides*, los organelos encargados de esta función. Los cloroplastos de la mayoría de los dinoflagelados fotosintéticos están rodeados

por tres membranas, lo que sugiere que proceden probablemente de la ingestión de algún alga. Sin embargo, algunos tienen cloroplastos con diferente pigmentación y estructura, algunos de los cuales conservan un núcleo. Esto sugiere que los cloroplastos fueron incorporados por varios acontecimientos endosimbióticos que implicaron la participación de formas coloreadas o secundariamente descoloridas (Gibbs, 1982). La célula de los dinoflagelados contiene los organelos característicos de las células eucarióticas: retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, gránulos de lípidos y almidón, y vacuolas endoplasmáticas; además, se han encontrado algunos organelos sensibles a la luz que les permiten determinar la dirección e intensidad de la luz. Muchas especies poseen organelos complejos como los tricostios, las púsculas, nematocistos, pistones y oceloides (Spector, 1984). Los dinoflagelados tienen un núcleo de forma peculiar, denominado *dinocarión*, en el que los cromosomas se fijan a la membrana nuclear y permanecen condensados, carecen de histonas y nucleosomas (Rizzo 1987, Rizzo, 2003), presentan grandes cantidades de 5-hidroximetiluracil y carecen de una verdadera interfase. Otra característica del núcleo de los dinoflagelados es que contienen grandes cantidades de ADN en comparación con otras algas unicelulares, por ejemplo en el caso de *Amphidinium carterae* este contiene 3 pg/cél, mientras que para *Lingulodinium polyedrum*, se reportó un contenido de 200pg/cél. El núcleo dinocarión, alguna vez fue considerado como la forma intermedia entre el nucleoide (procarionte) y los núcleos verdaderos (eucarionte), denominándose *mesocarión* (Dodge, 1965), sin embargo, ahora se considera una forma avanzada más que primitiva (Rizzo 1987, Rizzo, 2003).

En la mayoría de los dinoflagelados, el núcleo es dinocarión durante todo el ciclo de vida. Son generalmente haploides y se reproducen sobre todo por fisión binaria (figura 5-1), pero la reproducción sexual también ocurre (figura 5-2) (Pfiester y Anderson, 1987). Esta tiene lugar por la fusión de dos individuos para formar un cigoto, que puede seguir siendo móvil a la manera típica del dinoflagelado, o formar un quiste inmóvil, que experimenta más adelante una meiosis para producir nuevas células haploides.

Cuando las condiciones llegan a ser críticas, generalmente por falta de alimento o por inexistencia de luz, dos dinoflagelados se fusionarán formando un planozigoto. Este continúa su movilidad hasta que después de unos días pierde sus flagelos. A continuación viene una etapa no muy diferente de la hibernación llamada hipnozigoto. La membrana se expande abriendo la teca, el protoplasma se contrae y se forma una nueva teca más dura. Algunas



**Figura 5.** Ciclo vital de un dinoflagelado tipo. 1, fisión binaria; 2, reproducción sexual; 3, planozigoto; 4, hipnozigoto y 5, planomeiocito.

veces se forman incluso espinas. El quiste recién formado se deposita en el fondo marino. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, rompe su teca, pasa por una etapa temporal denominada planomeiocito y después retorna rápidamente a la forma móvil/vegetativa de principio del ciclo. El tiempo de dormancia de los quistes varía entre especies, pero se han encontrado quistes que son viables después de 16.5 años (Steidinger y Haddan, 1981).

### **1.1.3 Toxicidad**

Se estima que aproximadamente 80 especies de dinoflagelados son capaces de producir toxinas (Hallegraeff, 2003). Las toxinas producidas por este grupo de microorganismos (tabla I) son de diversa naturaleza química y tienen como característica común ejercer un efecto nocivo en ciertos organismos (humanos, mamíferos marinos, aves, peces, y otros componentes de la cadena trófica marina), que en determinado momento entran en contacto con ellas (Cortés, 1998; Suárez y Guzmán, 1998).

Dada la problemática vinculada al peligro que representan para la salud humana y las pérdidas económicas asociadas a actividades como la

acuicultura, pesquerías y turismo (Cortés y Sierra., 2008), estos fenómenos ha adquirido gran relevancia a nivel internacional.

**Tabla I. Toxinas producidas por organismos formadores de FAN y síndromes asociados.**

Síndrome	Organismo causante	Toxina	Ruta de adquisición	Manifestación clínica
Intoxicación por ciguatera	<i>Gambierdiscus toxicus</i> (béntico) <i>Ostreopsis siamensis</i> , etc.	Ciguatoxina (CFP)	Transferencia a través de la cadena trófica; consumo de peces carnívoros	Gastroenteritis aguda, síntomas neurológicos como parestesias
Intoxicación paralizante	<i>Alexandrium catenella</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. tamarensis</i> , <i>A. ostenfeldii</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> var <i>compressum</i> , etc.	Familia de saxitoxinas (PSP)	Consumo de mariscos cultivados o de vida libre en las áreas afectadas	Parestesia y otras manifestaciones neurológicas, parálisis muscular, problemas respiratorios y muerte
Intoxicación neurotóxica	<i>Karenia brevis</i> , <i>G. brevisulcatum</i> , etc.	Brevetoxinas (NSP)	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas; aerosoles de las toxinas por efecto de las olas	Síntomas neurológicos y gastrointestinales, dificultad para en la respiración e irritación de ojos
Intoxicación diarreica	<i>Dinophysis acuta</i> , <i>D. acuminata</i> , <i>D. fortii</i> , <i>Prorocentrum lima</i>	Ácido okadáico y dinofisistoxinas (DSP)	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Gastroenteritis aguda
Intoxicación por Azaspirácidos	<i>Protoperdinium crassipes</i>	Azaspirácidos (AZA)	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Efectos neurotóxicos con daño severo en intestino, hígado
Intoxicación amnésica	<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. australis</i> , etc.	Ácido domóico y sus isómeros (ASP)	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Manifestaciones gastrointestinales, neurológicas, generando amnesia en casos severos coma y muerte

Adaptado de Anderson *et al.*, (2001).

#### **1.1.4. Taxonomía**

De acuerdo al sistema de nomenclatura propuesto Steidinger y Tangen (1997), los dinoflagelados se clasifican dentro de la división *Dinophyta* y están

agrupados en una sola clase, Dinophyceae. Esta clase agrupa 5 órdenes que a su vez incluyen 9 familias, como se muestra en la tabla II.

**Tabla II. Ubicación taxonómica de los dinoflagelados según el sistema de nomenclatura propuesto Steidinger y Tangen (1997).**

		Orden	Familia	Ejemplo de Género	Ejemplo de Especie*
<b>División Dinophyta</b>	<b>Clase: Dynophyceae</b>	Prorocentrales (Lemmermann 1910)	Prorocentraceae (Stein 1883)	<i>Prorocentrum</i>	<i>P. lima</i> <i>P. mexicanum</i> <i>P. minimum</i>
		Dinophysiales (Lindermann 1928)	Dinophysaceae (Stein 1883)	<i>Dinophysis</i> <i>Phalacroma</i>	
		Gonyaulacales (Taylor 1980)	Goniodomataceae (Lindermann 1928)	<i>Alexandrium</i> <i>Pyrodinium</i>	<i>A. margaleffi</i>
			Gonyaulaceae (Lindermann 1928)	<i>Gonyaulax</i> <i>Lingulodinium</i>	<i>G. spinifera</i> , <i>G. turbiney</i> <i>L. polyedrum</i>
		Gymnodiniales (Lemmermann 1910)	Gymnodinaceae (Lankester 1885)	<i>Cochlodinium</i>  <i>Gymnodinium</i>  <i>Gyrodinium</i>	<i>C. polikrikoides</i>  <i>G. catenatum</i>
Peridinales (Haeckel 1894)	Kolkwitzellaceae (Lindermann 1928)	<i>Diploptela</i> <i>Oblea</i>			
	Peridiniaceae (Ehrenberg 1828)	<i>Peridinium</i>			
	Proto-peridiniaceae (Taylor 1987)	<i>Protoperidinium</i>			
	Podolampaceae (Lindermann 1928)	<i>Blepharocysta</i>			

\* Especies consideradas en el presente estudio.

**1.1.4.1 Taxonomía molecular.** Esta disciplina comprende el estudio de la clasificación de los seres vivos a escala molecular, y se basa en el uso de la información elemental de proteínas y genes (secuencias de aminoácidos y nucleótidos) para inferir relaciones evolutivas, lo que permite dilucidar la relación entre los morfotipos únicos y la división a nivel especie. El uso de la taxonomía molecular esta creciendo rápidamente, lo que se atribuye

básicamente a dos razones: 1) la secuencia de nucleótidos de algunos genes es una excelente herramienta para la resolución de problemas taxonómicos, y 2) gracias a los avances tecnológicos es posible obtener de una manera más rápida, las secuencias de los organismos de interés (Janson y Hayes, 2006). Las ventajas que presentan este tipo de metodologías son: requerir menos tiempo para su ejecución y análisis, alta especificidad y, finalmente, que la investigación se centra en el genoma (genotipo) en lugar del fenotipo. De esta forma, se han podido generar marcadores moleculares que permiten identificar con una alta sensibilidad a diferentes organismos, ya que se basan en secuencias únicas de nucleótidos, propias del ácido desoxiribonucleico (ADN) de los organismos, generando así herramientas complementarias a la morfotaxonomía, que se basa en el estudio de la expresión del genotipo, que puede estar fuertemente influenciada por las condiciones ambientales (Manhart y McCourt, 1992).

1.1.4.1.1 Marcadores moleculares. Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. En la actualidad, se encuentran disponibles diversas técnicas de biología molecular para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Picca *et al.*, 2004). La ventaja de los marcadores moleculares es que permiten utilizar información sobre eventos naturales y mutaciones fenotípicamente neutrales dentro de las poblaciones. La mayoría de las poblaciones tiene relativamente altas frecuencias de polimorfismos debidos a pequeños cambios en el ADN (sustitución de bases, inserciones, deleciones y translocaciones); la tecnología molecular ha permitido la detección de esos polimorfismos, con lo que se puede hacer una eficiente discriminación entre individuos. Un marcador molecular ideal deberá tener: suficiente variación para resolver el problema bajo estudio, ser seguro y simple de generar e

interpretar. Desafortunadamente, no existe un marcador ideal que pueda usarse en todos los estudios, sino que una técnica o técnicas deberán ser adecuadas para una amplia gama de investigaciones (Robinson y Harris, 1999).

El ADN ribosomal (ADNr) es uno de los marcadores moleculares mas ampliamente utilizado, ya que su secuencia no depende ni del estado fisiológico del organismo ni de la expresión sincronizada de otros genes. Además, algunas regiones del ADNr evolucionan más rápidamente que otras, creando así dominios que pueden ser altamente variables o altamente conservados entre los organismos. Tanto los elementos conservados como los variables son valiosos en estudios taxonómicos y filogenéticos a escala amplia o fina; además, estas regiones altamente conservadas, han permitido diseñar cebadores “universales” que pueden ser utilizados para varias especies.

El ribosoma, esta compuesto de dos subunidades principales: 1) la subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés) que esta conformada por 33 subunidades proteicas y por el transcrito del gen 18S, y 2) la subunidad grande (LSU, por sus siglas en inglés) que esa compuesta por 50 subunidades proteicas y los transcritos de tres genes: 5S (sitio teórico de unión al FTIIIA), 5.8S (relacionado con el proceso de traslocación) y 24S. Además, en eucariotas existen dos regiones que aparentemente no codifican genes ribosomales, pero son transcritas junto con los genes que codifican el ARNr: las secuencias intertranscritas ITS1 e ITS2.

El ADNr de la SSU ha sido extensamente estudiado, debido a que se ha encontrado que el gen 18S evoluciona con mayor lentitud (comparado con los genes del LSU), permitiendo así responder preguntas sobre eventos evolutivos. Por otra parte, los genes que codifican el ARNr de la subunidad grande, contienen regiones que evolucionan con mayor rapidez, sin embargo, también contienen regiones que evolucionan a la misma tasa que el ADNr que codifica al SSU. Así, las secuencias de los genes del LSU pueden usarse exitosamente para inferir relaciones filogenéticas entre organismos cercanamente

relacionados. Los ITSs, son regiones menos conservadas, lo que permite tener una mejor resolución entre especies cercanas o diferentes cepas de una misma especie (Hills y Dixon, 1991; Janson y Hayes, 2006).

El examen detallado de la morfología celular, estudios electroforéticos de enzimas y la comparación de la composición de toxinas han sido utilizadas para establecer el parentesco entre diversos aislamientos de dinoflagelados colectados de diversas localidades del mundo (Scholin *et al.*, 1993). Sin embargo, en los últimos 10 años se han planteado como métodos alternativos el análisis de los genes del ADNr (tabla III), dándose así pauta para el uso de la taxonomía molecular como herramienta de identificación. A la fecha no existe un estándar para integrar los resultados de la caracterización molecular con las descripciones morfológicas aceptadas, sin embargo, se espera que en el corto plazo, estos datos puedan integrarse a las descripciones taxonómicas convencionales (Costas *et al.*, 1995; Scholin, 1998).

**Tabla III. Regiones del ADNr empleadas para la identificación y caracterización de organismos formadores de FAN.**

Región del ADNr	Especie	País	Formato
LSU	<i>Peridinium</i> sp <sup>1</sup> ; <i>Alexandrium. tamarense</i> , <i>A. catenella</i> <sup>2,6</sup> ; <i>A. fundyense</i> <sup>5,10</sup> ; <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> , <i>P. multiseriales</i> , <i>P. australis</i> , <i>P. heimii</i> , <i>P. fraudulenta</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. delicatissima</i> y <i>P. americana</i> <sup>3</sup>	Corea, EUA, Japón y Alemania	Secuenciación de ADN, Hibridación (FISH y sandwich) anticuerpos monoclonales
ITS y SSU	<i>Peridinium</i> sp <sup>1</sup> ; <i>A. catenella</i> <sup>4,12</sup> ; <i>A. tamarense</i> <sup>4</sup> ; <i>A. affine</i> , <i>A. insuetum</i> , <i>Pseudogonyaulax</i> sp., <i>A. fraterculus</i> , <i>A. lusitanicum</i> <sup>13</sup> , <i>Gymnodinium mikimotoi</i> , <i>Prorocentrum micans</i> , <i>Amphidinium carterae</i> , <i>Heterocapsa triquetra</i> , <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Chattonela antique</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Microcystis</i> <sup>7</sup> ; diversidad de la comunidad del plancton <sup>8,9</sup> ; <i>Dinophysis</i> <sup>11</sup> ; <i>Cochodinium polykrikoides</i> <sup>12</sup>	Corea, EUA, Japón, China, España y Portugal	PCR-DGGE, Hibridación FISH, RFLP, PCR, secuenciación ADN

Notas: <sup>1</sup>Ki y Han, 2005; <sup>2</sup>Tanabe y Sako, 2006; <sup>3</sup>Scholin *et al.*, 1996; <sup>4</sup>Adachi *et al.*, 1996a, b; <sup>5</sup>Anderson *et al.*, 1999; <sup>6</sup>Sako *et al.*, 2004; <sup>7</sup>Saker *et al.*, 2007; <sup>8</sup>Yan *et al.*, 2007; <sup>9</sup>Savin *et al.*, 2004; <sup>10</sup>Anderson *et al.*, 2005; <sup>11</sup>Takahashi *et al.*, 2005; <sup>12</sup>Ki *et al.*, 2005a; <sup>13</sup>Walsh *et al.*, 1998.

1.1.4.1.2 Técnicas moleculares empleadas para la identificación de especies formadoras de FAN y análisis de comunidades fitoplanctónicas. Actualmente la biología molecular provee a los ficólogos de un paquete de herramientas

valiosas para el estudio de las relaciones genéticas de las cepas, poblaciones o niveles taxonómicos mayores. Sin embargo, la aplicación de herramientas moleculares para resolver preguntas científicas específicas no es directa, ya que existe un gran número de técnicas disponibles, entre las que se pueden mencionar:

**Aloenzimas.** La primera técnica molecular disponible para estudios de investigación genética en fitoplancton es la electroforesis de aloenzimas (o, en su caso isoenzimas). Las enzimas son proteínas que pueden separarse con base en su carga, tamaño y forma. Las isoenzimas son enzimas que difieren en su secuencia de aminoácidos y son codificadas por genes homólogos, mientras que las aloenzimas representan enzimas de diferentes alelos de un mismo gen ubicados en diferentes *locus*. Los primeros estudios realizados en fitoplancton para investigar las similitudes genéticas se realizaron con *Thalassiosira pseudonana* y *T. fluviatilis* (Murphy y Guillard, 1976). Posteriormente, Gallagher (1980) realizó estudios genéticos en poblaciones en *Skeletonema costatum* con la misma técnica y en 1997, Chinain *et al.* trataron de correlacionar, sin éxito, la producción de toxinas con la variación de isoenzimas en *Gambierdiscus toxicus*. Desde estos primeros estudios a la fecha, se ha encontrado que la resolución de la técnica no es alta a nivel intrapoblacional, ya que se puede encontrar variación entre-, pero no dentro- de poblaciones, por lo que esta técnica puede desestimar el nivel de variación genética, si se compara con otras técnicas moleculares disponibles.

**RFPL, RAPDS y AFLP.** El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) fue una de las primeras técnicas moleculares usadas en estudios de fitoplancton que, combinada con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), resulta ser más simple y rápida en la obtención de resultados (Bruin *et al.*, 2003). Esta técnica se basa en el uso de endonucleasas de restricción, enzimas que cortan el ADN al reconocer secuencias nucleotídicas específicas, generando fragmentos de ADN, que pueden ser separados electroforéticamente y

visualizadas por diversos mecanismos. Partiendo de esta premisa, se espera que al existir diferentes genotipos dentro de una población causados por mutaciones puntuales en el ADN (como deleciones, sustituciones, inserciones), se generarán nuevos (o se eliminarán) sitios de restricción y, por lo tanto, produciendo fragmentos de longitud diferentes. La técnica RFLP-PCR ha sido usada para la identificación de marcadores genéticos específicos de grupo y/o cepa en organismos del genero *Alexandrium* aislados de todo el mundo (Judge *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1994; Scholin y Anderson, 1994), usando los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA, por sus siglas en inglés). Mediante esta metodología se han generando marcadores taxonómicos y biogeográficos útiles para rastrear la dispersión regional o global de poblaciones particulares. Con estas técnicas (RFLP y PCR-RFLP) es posible encontrar numerosos polimorfismos entre cepas, tanto en regiones codificantes como no codificantes, pero demanda mayor experiencia técnica y tiempo para el desarrollo de un número suficiente de marcadores polimórficos que otras técnicas basadas en la PCR como el Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar (RAPD, por sus siglas en inglés) y el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Amplificación (AFLP, por sus siglas en inglés).

Los RAPDs se basan en el uso de cebadores cortos, únicos (8-10 bases), con una secuencia aleatoria, para la amplificación de un promedio de 3 a 10 regiones de ADN de forma simultánea, analizándose el resultado con base en la presencia-ausencia de fragmentos amplificados de un tamaño específico. Esta técnica, cuyo costo y requerimientos técnicos y de infraestructura son mínimos, ha sido ampliamente utilizada para el estudio de poblaciones de diatomeas como *Fragilaria capuchina* (Lewis *et al.*, 1997), de cianobacterias de los géneros *Nodularia* y *Anabaena* (Bolch *et al.*, 1999a) y de dinoflagelados tóxicos como *Gymnodinium catenatum* (Bolch *et al.*, 1999b) encontrando, en todos los casos, altos niveles de variabilidad entre las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la desventaja de este método es su baja reproducibilidad y la dominancia de los marcadores, por lo que no pueden calcularse frecuencias alélicas. Debido a lo anterior, esta metodología ha sido reemplazada por otras

técnicas como AFLP, que al igual que el RFLP involucra la digestión parcial del ADN genómico utilizando enzimas de restricción, seguido de la ligación o unión de adaptadores complementarios a los sitios de restricción y amplificación selectiva mediante PCR de los fragmentos con los adaptadores. Los fragmentos amplificados se visualizan posteriormente a la separación en un gel desnaturizante de poliacrilamida o por fluorescencia.

**DGGE y SSCP.** Las técnicas de Electroforesis Desnaturizante en Gel de Gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés) y de Polimorfismo Conformacional de Hebra Simple (SSCP, por sus siglas en inglés) pueden detectar el polimorfismo que no es detectable mediante RFLP en pequeños fragmentos producidos mediante la digestión de ADN genómico y/o amplificación de segmentos específicos por PCR. En DGGE, los fragmentos de ADN genómico son digeridos o amplificados mediante PCR, generándose fragmentos de la misma longitud pero diferente secuencia nucleotídica, por lo que en un gel de electroforesis migrarán de acuerdo a su peso molecular. Mientras los fragmentos de ADN migran hacia regiones en donde las condiciones desnaturizantes son más altas, cada uno de ellos alcanza un punto en el que se detiene su migración; este punto en particular depende directamente de la secuencia nucleotídica. En el 2001 estas técnicas fueron aplicadas al estudio de la variabilidad genética (espacial y temporal) del dinoflagelado tóxico *Pfiesteria piscicida* en aguas costeras y de estuario (Coyne *et al.*, 2001).

Por otra parte, en SSCP los fragmentos producidos por la acción de endonucleasas de restricción o amplificación mediante PCR se desnaturizan para obtener una cadena sencilla de ADN. El método básicamente consiste en la separación electroforética de esta cadena sencilla de ácido nucleico, basado en la diferencia de bases en su secuencia, cuyo efecto es una diferencia en estructura secundaria detectable en su movilidad en el gel. Incluso, el cambio en una sola base en la secuencia puede afectar la estructura secundaria y por lo tanto la movilidad en el gel. Aunque la resolución de estas técnicas es alta,

ambas presentan la desventaja de requerir de equipo especializado de alto costo y, a diferencia de los RAPDS, se requiere de información de la secuencia de nucleótidos de las regiones flanqueantes a los segmentos de interés.

**Sondas moleculares.** Las 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. Los formatos de detección aplicables a sondas de ADN pueden dividirse en dos categorías dependiendo de la forma de presentación del ADN blanco: 1) Hibridación en sándwich-SH y Dot Blot (ADN en solución y su posterior inmovilización) y 2) Whole Cell Hibridization-WCH (hibridación de células completas).

En el formato WCH (método basado en el procesamiento de muestras a través de filtración) la visualización se realiza mediante observaciones al microscopio (epifluorescencia) ya que las células blanco marcadas, después del proceso de hibridación, exhiben fluorescencia. Por otro lado, el formato de SH, que consiste en la captura e inmovilización de fragmentos del LSU en un soporte sólido (con oligonucleótidos acoplados) y su hibridación con una sonda señal específica de ADN, se detecta por colorimetría. En formatos de WCH y SH se han usado oligonucleótidos dirigidos a fragmentos específicos del LSU-ARNr para identificar y enumerar especies de los géneros *Alexandrium* y *Pseudo-nitzschia*, obtenidos de cultivos puros y poblaciones naturales (Scholin *et al.*, 1994; Miller y Scholin, 1998). El formato SH tiene posibilidades de semi-automatizarse; por lo que esta técnica ofrece potencialmente un modo más simple y rápido para la enumeración de especies, cuando se analizan un gran número de muestras tomadas directamente del medio natural.

Scholin *et al.* (1997; 1999), estudiando especies del genero *Pseudo-nitzschia* obtenidas de muestras de campo, encontraron que la especificidad de los métodos de detección basados en sondas de ARN marcadas puede arrojar

resultados imprecisos o contrastantes. Mientras que el formato WCH detecta específicamente organismos de la especie blanco, en la SH pueden presentarse reacciones inespecíficas debido a la contaminación de muestras ambientales, no siendo posible complementar el uso de los dos métodos debido a que los ensayos están referenciados bajo diferentes estándares: moléculas intracelulares vs. moléculas libres en solución.

**Single cell PCR y PCR en tiempo real.** Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método simplificado (para la identificación de FANs) que se basa en la secuenciación de ADNr (subunidad pequeña) e integra procedimientos de extracción de ADN y PCR en un solo tubo, seguido de secuenciación directa de los productos sin purificar (Ki *et al.*, 2005a), con el que se resolvieron las ambigüedades taxonómicas de especies de microalgas estrechamente relacionadas como *Cochlodinium polykrikoides* y *Alexandrium catenella* (Ki *et al.*, 2005b).

Para el estudio de poblaciones de microalgas tóxicas, una de las tendencias metodológicas más recientes es el uso de PCR en tiempo real, aplicable a la detección de especies de interés tanto en cultivos como en muestras de campo (Bowers *et al.*, 2000; 2001), obteniéndose resultados rápidos, altamente sensibles y específicos. La PCR en tiempo real, es una modificación a la técnica de PCR, en la que no se realiza electroforesis, de tal forma que los resultados se obtienen simultáneamente con la amplificación de los productos. Se realiza utilizando un marcador que produce fluorescencia al unirse al ADN de cadena doble, esto se monitorea con un equipo que la detecta al tiempo que genera una curva de la intensidad de la fluorescencia contra la temperatura de cada ciclo. El primer incremento significativo en la cantidad de productos de PCR se correlaciona con la cantidad total de templado de ADN disponible originalmente. Sin embargo, las desventajas del PCR en tiempo real radican en el costo del equipo y la necesidad de desarrollo de sondas y cebadores especializados y costosos por el requerimiento de la marca fluorescente.

Finalmente, cada técnica molecular se basa en una serie de suposiciones teóricas tales como los criterios de homología, independencia del marcador, equilibrio de Hardy-Weinberg, etc. Además, las diferentes técnicas tienen sus propias fortalezas y debilidades en aspectos metodológicos tales como la resolución, el costo, la instrumentación y la experiencia técnica requerida. Por otra parte, las especies difieren en su variación genética en *loci* específicos; de aquí que una técnica que revela un alto nivel de polimorfismo en una especie no necesariamente revela el mismo nivel de polimorfismo en otras.

## 2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

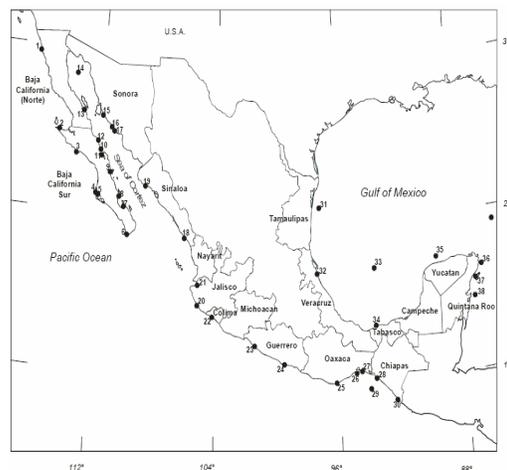
### 2.1 Situación del litoral mexicano

En México, en la mayoría de los casos, los organismos causantes de FAN han sido escasamente estudiados (Cortés *et al.*, 1998). En la figura 6, se presentan algunos de los puntos del litoral mexicano que han sido fuerte y frecuentemente afectados por eventos FAN.

Okolodkov y Gárate (2006), presentan una lista de aproximadamente 605 especies (91 géneros) y taxones infraespecíficos de dinoflagelados (Dinophyceae), principalmente de vida libre, que han sido reportados para el Pacífico Mexicano. Los géneros más importantes: *Protoperidinium* (111 especies), *Ceratium* (63), *Dinophysis* (41), *Gonyaulax* (25), *Oxytoxum* (22), *Gymnodinium* (22), *Prorocentrum* (21),

*Alexandrium* (17), *Ornithocercus* (12) y *Amphidinium* (12). Durante 1980-1992 Gómez (1998) realizó estudios planctológicos tanto en las costas del Pacífico Mexicano como en el Golfo de México y en el Mar Caribe. Analizó 40 mareas rojas, de las que 30 fueron observadas durante el periodo de 1987-1992, y trece de ellas fueron tóxicas o nocivas, producidas principalmente por: *Pyrodinium bahamense* (2), *Gymnodinium catenatum* (3), *Scrippsiella trochoidea* (2), *Protoperidinium* sp., *Gonyaulax triacantha*, *Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium* sp. y *Gonyaulax* spp., *Karenia brevis* y *Prorocentrum minimum*. Las otras 27 FAN fueron inocuas, producidas por organismos de los géneros: *Myrionecta* (15), *Noctiluca* (4), *Ceratium* (6), *Prorocentrum* y *Akashiwo*.

En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de California, es común que estacionalmente se



**Figura 6.** Mapa de localización de Estados de la República Mexicana afectados por los eventos FAN (tomado de Ochoa *et al.*, 2002).

presenten eventos FAN que impactan seriamente la vida marina y las actividades económicas de los Estados que conforman el Golfo (tabla IV). Entre las localidades mas afectadas se pueden mencionar: las bahías de Guaymas (BG), Kino (BK), Yavaros (BY), Mazatlán (BM), Topolobampo (BT), La Paz (BP), Concepción (BC), Magdalena (BMg) y Banderas (BB), así como las Islas Cerralvo (IC) y Ángel de la Guarda (IAG); las Lagunas Ojo de Liebre (LOL) y San Ignacio (LSI); así como las costas de Cabo San Lucas (CCSL), Loreto (CL) y Canal de San Lorenzo (CSL), entre otros (Cortés *et al.*, 1996; Gárate *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 1997). Específicamente, en la región de Baja California Sur las especies que han sido reportadas con mayor frecuencia son: *Gymnodinium catenatum*, *Akashiwo sanguinea*, *Noctiluca scintillans*, *Gonyaulax polyedra*, *Prorocentrum dentatum*, *Prorocentrum minimum* y *Pseudo-nitzschia australis* (Cortés *et al.*, 1996).

## **2.2 Impactos: económico y en la vida marina**

El impacto económico de las FAN es quizá un aspecto de vital relevancia a nivel gubernamental e industrial, y presenta dificultad para su adecuado cálculo. Esto se debe a que no se reconocen o reportan adecuadamente los costos que conllevan estos fenómenos en la salud pública, la industria de los alimentos y el turismo.

De acuerdo a Anderson *et al.* (2000) los costos económicos se encuentran asociados a: 1) pérdida de la producción de granjas acuícolas, prohibición de las capturas comerciales en bancos naturales y depresión del mercado de mariscos por desconfianza del consumidor aun cuando la amenaza haya pasado (efecto halo); 2) oferta de servicios de salud pública; 3) clausura de actividades de recreación y turismo al no poderse asegurar el desarrollo de estas actividades sin riesgos, y 4) limpieza y disposición final de flora y fauna acuática percedera presente en playas y costas. Estos mismos autores estimaron el impacto económico anual por FAN en Estados Unidos durante el periodo 1987-1992, y se encontró que el promedio del impacto capitalizado a 15 años fue superior a \$449 millones de dlls/año; atribuyéndose, el 45% a

servicios de salud pública, el 37% a pesquerías y pérdidas, el 13% a recreación y turismo y el 4% a monitoreo y mantenimiento.

**Tabla IV. Eventos asociados con FAN en Golfo de California y Costas de B. C. Sur.**

Localidad	Fecha (mes/periodo)	Principales especies	Impacto
BP y GC <sup>1</sup>	04/1992	<i>Oscillatoria erythraea</i>	No reportado
BP y GC <sup>1</sup>	05/1993–06/1994	<i>Mesodinium rubrum</i>	
BP <sup>2</sup>	04/1992	<i>Prorocentrum mexicanum</i>	
BC <sup>2</sup>	12/1992	<i>Noctiluca scintillans</i>	Muerte de medusas, peces y aves marinas
CSL <sup>2</sup>	03/1994	<i>N. scintillans</i>	
BP <sup>2</sup>	04/1995	<i>Myrionecta rubra</i>	
CCSL <sup>1</sup>	01/1996	<i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	Muerte de >150 pelicanos café
Atil, Sonora <sup>1</sup>	01/1996	<i>Microcystis LPPB</i>	Pérdida de peces ( <i>Oreochromis sp.</i> )
CL <sup>1</sup>	02/1996	<i>N. scintillans, Pseudo-nitzschia</i>	No reportado
CCSL <sup>1</sup>	03/1996	<i>Cyanobacteria LPPB, Chattonella sp.</i>	Pérdida de peces bentónicos y corales
IC <sup>2</sup>	06/1996	<i>M. rubrum</i>	
LOL <sup>2</sup>	09/1996	<i>Cylindrotheca closterium</i>	
LSI <sup>2</sup>	09/1996	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	Muerte de peces, medusas y aves marinas
BP <sup>2</sup>	05/1997	<i>M. rubrum</i>	
BMg <sup>2</sup>	12/1998	<i>M. rubrum</i>	
BP <sup>2</sup>	11/1998	<i>S. trochoidea</i>	
GC <sup>3</sup>	12/1998	<i>M. rubrum</i>	No reportado
BP <sup>2</sup>	04/1999	<i>S. trochoidea</i>	Muerte de peces, aves y medusas
CSL <sup>4</sup>	06/2001	<i>Rhizosolenia debyana</i>	
BM <sup>5</sup>	03/1999-2000	<i>P. mexicanum</i>	No reportado
BM <sup>6</sup>	01/2000	<i>G. catenatum, N. scintillan</i>	
BP y GC <sup>7</sup>	09/2000	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	180 peces
BB y GC <sup>5</sup>	07-12/2000	<i>C. catenatum</i>	13 especies de peces afectadas
BP <sup>7</sup>	03/2001	<i>M. rubrum</i>	
CSL <sup>4</sup>	06/2001	<i>R. debyana</i>	No reportado
BP y GC <sup>8</sup>	12/2001, 2003	<i>A. affine, C. furca, G. catenatum, Gonyaulax digitalis, G. spinifera, P. micans, P. rathymum, P. minimum, S. trochoidea, C. polykrikoides.</i>	Acumulación de PSP en moluscos
BP y GC <sup>9</sup>	04/2004–05/2005	<i>Chattonella marina</i>	
IES <sup>10</sup>	10/2004	<i>Gonyaulax polygramma</i>	No reportado

Nota: <sup>1</sup>Ochoa *et al.*, 1997; <sup>2</sup>Gárate *et al.*, 2001; <sup>3</sup>Gárate *et al.*, 2002; <sup>4</sup>Gárate *et al.*, 2003; <sup>5</sup>Cortés *et al.*, 2003; <sup>6</sup>Alonso *et al.*, 2005; <sup>7</sup>Gárate *et al.*, 2004a; <sup>8</sup>Gárate *et al.*, 2004b; <sup>9</sup>Band *et al.*, 2005; <sup>10</sup>Gárate *et al.*, 2006.

Para tener una idea del impacto que tienen las FAN en los ecosistemas marinos, tan solo en el Estado de B.C.S. y Golfo de California, se han registrados mortandades masivas principalmente de lobos marinos, pelícanos, moluscos, langostas y peces. En el caso de mamíferos y aves marinas, la muerte ha sido consecuencia de cuadros de intoxicación, mientras que en los casos de peces ha sido promovida por intoxicación o cianosis, debida al abatimiento del O<sub>2</sub> por las altas densidades de microalgas (SEMARNAT y PROFEPA 1997; Sierra-Beltrán *et al.*, 1997; 1998; 2005; Gallo *et al.*, 2004). Por ejemplo, la marea roja desarrollada por el dinoflagelado *Akashiwo sanguinea*, ocurrida durante Agosto-Septiembre del 2007, en la zona de Punta Abreojos, tuvo un impacto significativo en los principales recursos pesqueros y acuícolas de importancia comercial, entre los que se pueden mencionar: abulón, langosta, caracol, almeja pismo y ostión de cultivo, además de una gran variedad de especies de escama. Los estudios del Instituto Nacional de La Pesca a través del Centro Regional de Investigación Pesquera de La Paz (CRIP La Paz) realizados en septiembre de 2007, demuestran una disminución del 40 % en la abundancia de abulón (respecto al promedio de los últimos tres años), y de un 80 % en el caracol. En el caso de la langosta, se observó una disminución cercana al 65% (en la abundancia relativa) sugiriendo una posible disminución de más del 50% de la captura en la temporada 2007-2008. Además, se observó un 95 % de mortalidad en los cultivos de ostión ubicados en la región (com. pers. Arturo Sierra-Beltrán).

### **2.3 Programas de monitoreo**

Con el propósito de reducir el daño ocasionado por las FAN, se requiere de estudios básicos para establecer las causas probables que las originan así como sus efectos en los ecosistemas. Al mismo tiempo, el desarrollo de un programa de vigilancia y/o monitoreo, es un elemento operacional necesario para el manejo y disminución de los efectos de las FAN, con la finalidad de efectuar una detección temprana de la generación de un florecimiento. Llevando un registro de estos fenómenos, se puede establecer su periodicidad

y/o correlacionar con algunos otros eventos naturales, permitiendo dar un paso adelante en su predicción (Sellner *et al.*, 2003).

Los objetivos a los que se apegan los programas de monitoreo son los siguientes: 1) protección a la salud pública; 2) protección a los recursos explotados y su mercado (de vital relevancia debido a que la acuicultura es una de las principales actividades económicas a nivel mundial); 3) aplicación de planes de contingencia y mitigación (v. gr. cosecha anticipada, salvaguarda de reproductores, traslado de jaulas, etcétera) y 4) adquirir capacidad de predicción de eventos FAN (Reguera, 2002). Sin embargo, el establecimiento real de los programas de monitoreo, presenta una fuerte problemática, relacionada con la insuficiencia de equipo y personal capacitado, aunada al inadecuado monitoreo de los parámetros ambientales.

Con la finalidad de establecer un ejercicio de monitoreo a nivel nacional, la Unidad de Educación en Ciencia y Tecnología del Mar de la Secretaría de Educación Pública (hoy Dirección General) DGECyTM-SEP, inicio un Programa Nacional de Investigación en Microalgas Nocivas y Biotoxinas Marinas, en colaboración entre los planteles educativos dependientes de la UECyTM-SEP, el cual operó bajo la coordinación del CIBNOR de 1998 hasta el 2002, en que la SEP tomó la responsabilidad de continuar con el Programa (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Sierra-Beltrán y Cortés 1999). En B. C. S., desde 1992 el CIBNOR inició por cuenta propia actividades de monitoreo, cubriendo algunos puntos de las costas del Golfo y del Pacífico (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Ochoa *et al.*, 1997). A los pocos años, el costo de los recorridos para la obtención de las muestras a analizar, hizo imposible la continuidad de esta actividad de manera permanente, sin embargo, se continua trabajando mediante muestras de oportunidad y asistiendo, en colaboración con otras dependencias oficiales (Secretarías de Salud, de Marina y de Pesca, PROFEPA, SAGARPA, etc) a todos los eventos que ocurren en el estado.

### **2.3.1 Métodos de monitoreo**

Hoy en día, en el desarrollo de actividades de monitoreo la herramienta más ampliamente utilizada es la microscopia de luz. Esta técnica provee una confirmación visual de la presencia de especies en las muestras de agua y genera un estimado de la abundancia de las células. Esta metodología ha sido probada como adecuada para la detección de algas tóxicas (Scholin y Anderson, 1998), sin embargo, frecuentemente requiere de taxónomos expertos, presenta un elevado consumo de tiempo y, desafortunadamente, no presenta suficiente resolución para la identificación a nivel especie de todos los organismos formadores de FAN, lo que dificulta un rápido análisis (Miller y Scholin, 1998). La baja resolución del método se debe a que muchas características taxonómicas son reveladas mediante microscopia electrónica, como tamaño y forma de la célula, posición de cloroplastos, arreglo de las placas y complejos de poros apicales (Hallegraeff, 1993). Por lo tanto, ha sido necesario desarrollar nuevas herramientas de caracterización para resolver problemas asociados con la descripción adecuada de las especies, siendo los métodos moleculares (sección 1.1.4.1.1) una valiosa herramienta para la rápida identificación y enumeración de organismos fitoplactónicos, especialmente aquellos responsables de eventos FAN.

#### **2.3.1.1 Imágenes de satélite**

En algunos casos, se pueden usar con éxito el análisis de imágenes de satélite, como parte de un programa de monitoreo pro-activo. Por ejemplo, los movimientos de la Corriente del Golfo de México y el aumento de la temperatura del agua cumplen una función clave en los brotes de *Karenia brevis*; el monitoreo de las aguas a través de un sensor remoto de radiación infrarroja puede brindar información sobre la probabilidad de un brote (Hungerford y Wekell, 1993).

También el monitoreo del color del océano, mediante imágenes satelitales, se usa actualmente en el Golfo de México para detectar y dar seguimiento a los FAN de *K. brevis*. Gracias a ello, se distribuye un boletín pronóstico a los estados afectados por parte del NOAA (National Ocean Service Center for Coastal Monitoring and Assessment). Este boletín ([http://coastwatch.noaa.gov/hab/bulletins\\_ms.htm](http://coastwatch.noaa.gov/hab/bulletins_ms.htm)) se basa en la integración de datos como: análisis de imágenes del color del océano, datos sobre corrientes (obtenidos de estaciones meteorológicas), observaciones de campo de floraciones locales en los estados de Texas y Florida, y pronósticos del tiempo proporcionadas por el servicio meteorológico nacional.

### **2.3.1.2 Robots**

La tendencia actual y futura es hacia la automatización para la toma y procesamiento de muestras ambientales *in situ*, con la finalidad de detectar la presencia de las firmas moleculares de especies formadoras de FAN. Para ello, en el Instituto de Investigación del Acuario de la Bahía Monterey, CA (MBARI, por sus siglas en inglés) se ha desarrollado el Procesador de Muestras Ambientales de primera generación (1G ESP, por sus siglas en inglés), que es un sistema electromecánico/instrumento fluido, diseñado para la colecta de muestras discretas de agua de la superficie de los océanos, la concentración de microorganismos y la aplicación automática de sondas moleculares para la identificación de microorganismos (basado en el análisis de ARNr (Scholin *et al.*, 1998). Además, el 1G ESP almacena muestras discretas para análisis de ácidos nucleicos, microscopía y otros procedimientos analíticos después del que el instrumento se recupera del campo. En la actualidad, existe una nueva generación del ESP, el 2G ESP, que básicamente tiene mejoras de diseño: sistema instrumental modular, de fácil re-configuración, para adaptarse a una variedad de condiciones o escenarios. Adicionalmente, se ha disminuido el consumo de energía (para el uso de baterías recargables durante 6-12 meses), se ha reducido el tamaño para permitir su recuperación por embarcaciones pequeñas, y se han incorporado mejoras sustantivas en mantenimiento,

confiabilidad y flexibilidad del sistema mecánico y software (<http://www.mbari.org/microbial/esp/>).

De acuerdo a lo anterior, existe un extenso abanico de opciones para llevar a cabo la identificación de especies formadoras de FANs, elemento clave para ejecutar adecuada y eficientemente un programa de monitoreo. Para hacer una selección adecuada de un método o aplicación, es necesario hacer las siguientes consideraciones: 1) el tipo de información que se desee obtener, 2) la sensibilidad requerida, 3) la disponibilidad de equipo y personal capacitado, y 5) el costo.

### **3. HIPÓTESIS**

Si se detectan regiones polimórficas específicas en el ADN ribosomal de diversas especies de fitoplancton reportadas como formadoras de FANs, entonces su uso mediante métodos moleculares (sondas moleculares y/o SSCP) proveerá suficiente especificidad y resolución para la rápida identificación y enumeración de organismos.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Diseñar herramientas para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo como propuesta para el monitoreo de floraciones algales nocivas en las costas del estado de Baja California Sur.

#### **4.2 Objetivos particulares**

1. Implementar un método de extracción de ADN total para diferentes especies de dinoflagelados.
2. Establecer las condiciones de amplificación de diversas regiones del ADNr correspondientes a los genes SSU, ITS's y LSU mediante PCR, utilizando cebadores diseñados en el laboratorio o aquellos reportados en la literatura.
3. Secuenciar productos de PCR para la detección de secuencias únicas, primordiales, para el diseño de sondas moleculares y análisis de polimorfismo SSCP en dinoflagelados.

4. Diseñar nuevos oligonucleótidos para la producción de:
  - Sondas de hibridación especie-específicas para la rápida detección de fitoplancton
  - Amplificación de regiones especie-específicas aplicables a la técnica SSCP, para el análisis y diferenciación de muestras multi-específicas de comunidades de fitoplancton.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Organismos de estudio**

Las especies y cepas utilizadas para el desarrollo de este estudio forman parte de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR (CODIMAR). Sus características generales y condiciones de cultivo se presentan en la tabla V.

#### **5.1.1 Mantenimiento de cepas y colecta de biomasa**

Los cultivos se mantuvieron en recipientes desechables para cultivo de tejidos con fondo plano (50 mL) siguiendo las condiciones mencionadas en la tabla 4. Las resiembras se realizaron cada 4 semanas o, dependiendo de cada cultivo, cuando la densidad celular alcanzó las  $5 \times 10^3$  céls./mL.

De cada cultivo se tomaron 25 mL y se colocaron en tubos cónicos de 50 mL. La biomasa se concentró mediante centrifugación (10 min., 1000 x g, 4° C), descartándose el sobrenadante. El paquete celular obtenido se resuspendió (con micropipeta) en ~1 mL del medio remanente. De esta suspensión celular se tomaron 250 µL que se transfirieron a un tubo de plástico de 2 mL para la extracción de los ácidos nucleicos totales; el resto de las células se almacenó en tubos de plástico de 2mL a – 20° C.

### **5.2 Extracción de DNA**

Para la extracción del ADN, se utilizó el método desarrollado por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones; las muestras se procesaron de acuerdo al siguiente procedimiento:

Tabla V. Información general de las cepas utilizadas.

Especie	Clave	Localidad	Aislado por	Cualidades	Cultivo
<i>Akashiwo sanguinea</i>	ASCV-1	BACO	C. Band	Clonal, Unialgal	Medio f/2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CPPV-1	BAPAZ	L. Morquecho	Clonal, unialgal	Medio GSe, 25±3°C, ciclos L/O 12 h.
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCV-1	BACO	D. Góngora	Clonal, unialgal	Medio GSe, 20±3°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 h.
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCMV-1	BAMAZ	D. Góngora	Clonal, unialgal	Medio GSe, 20±3°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 h.
<i>Alexandrium affine</i>	AACQ-1	BACO	L. Morquecho	Unialgal	Medio f/2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Alexandrium margalefii</i>	AMCQ-1	BACO	L. Morquecho	Unialgal	Medio f/2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Gonyaulax turbiney</i>	GTPV-1	BAPAZ	L. Morquecho	No Clonal?	Medios f2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Gonyaulax spinifera</i>	GSCQ-1	BACO	Morquecho L.	Unialgal	Medios f2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	LPCQ-1	BACO	L. Morquecho C. Band	Unialgal Clonal	Medio GSe y f/2 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12h.
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	PXPV-1	BAPAZ	D. Góngora	Unialgal Clonal	Medio f/2 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Prorocentrum minimum</i>	PIPV-1	BAPAZ	L. Morquecho	Unialgal Clonal	Medio GSe 20± 3°C; ciclos L/O de 12 h.
<i>Prorocentrum lima</i>	PLHV-1	Cuba	A. Reyes	Epifitas de macroalgas	Medios f/2 y GSe 20 ± 3°C; ciclos L/O de 12 h.

BACO=Bahía Concepción, B. C. S.; BAPAZ= Bahía de La Paz B. C. S.; BAMAZ= Bahía Mazatlán, Sin. Fuente: (<http://www.cibnor.gob.mx/eplant1.php?pagID=coleccion/codimar/codimar>).

### 5.2.1 Disrupción celular

A cada 250 µL de suspensión celular se le agregaron 500 µL del amortiguador de lisis (2% hexadeciltrimetilbromuro de amonio [CTAB: Sigma H-5882], 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-β mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8.0). La mezcla de células-amortiguador se incubó en Baño Maria (180 Series Water Bath, Precision) a 60° C por 15 min. Posteriormente, se agregaron 200

$\mu\text{L}$  de perlas de vidrio y cada muestra se homogenizó en un Mini Bead-beater (Biospec Products Inc.) durante 40 seg. Los homogenados se incubaron 1 hr a  $60^\circ\text{C}$ , con intervalos de homogenización cada 20 min.

### **5.2.2 Purificación**

Se agregaron  $800\ \mu\text{L}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v:v) mezclando por inversión; se centrifugó a  $6000\ \times\ g$  durante 10 min. a temperatura ambiente. La fase superior se transfirió a un tubo cónico de plástico de 1.5 mL y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto pre-enfriado a  $-20^\circ\text{C}$ , se mezcló y se dejó precipitar durante toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ . Los tubos con el ADN precipitado se centrifugaron a  $10,000\ \times\ g$ , 15 min a  $4^\circ\text{C}$ ; el sobrenadante se descartó. Finalmente se realizaron 2 lavados consecutivos al botón de ADN con  $250\ \mu\text{L}$  de etanol al 70 %; una vez eliminado el sobrenadante, el ADN se dejó secar a temperatura ambiente.

### **5.2.3 Digestión del ARN**

Para eliminar el ARN de las preparaciones el botón de ácidos nucleicos se resuspendió en  $50\ \mu\text{L}$  de amortiguador TE pH 8.0 (1M Tris, pH 8.0, 0.5M EDTA, pH 8.0) y se agregó  $1\ \mu\text{L}$  de ARNasa (10mg/mL). Se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hr. El ADN limpio se cuantificó y se analizó su integridad y pureza.

### **5.2.4 Cuantificación y análisis de la integridad**

Para determinar el rendimiento de ADN extraído ( $\text{Abs}_{260}$ ) y su pureza ( $\text{Abs}_{260/280}$ ) se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (BioRad, Smartspect TM 3000) usando el método de Warburg-Christian (1941). La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa/TBE 1X preteñidos con bromuro de etidio, llevándose a cabo la electroforesis en una cámara horizontal (Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) a 70 V durante 20 min. a temperatura ambiente. Los geles se observaron bajo luz UV

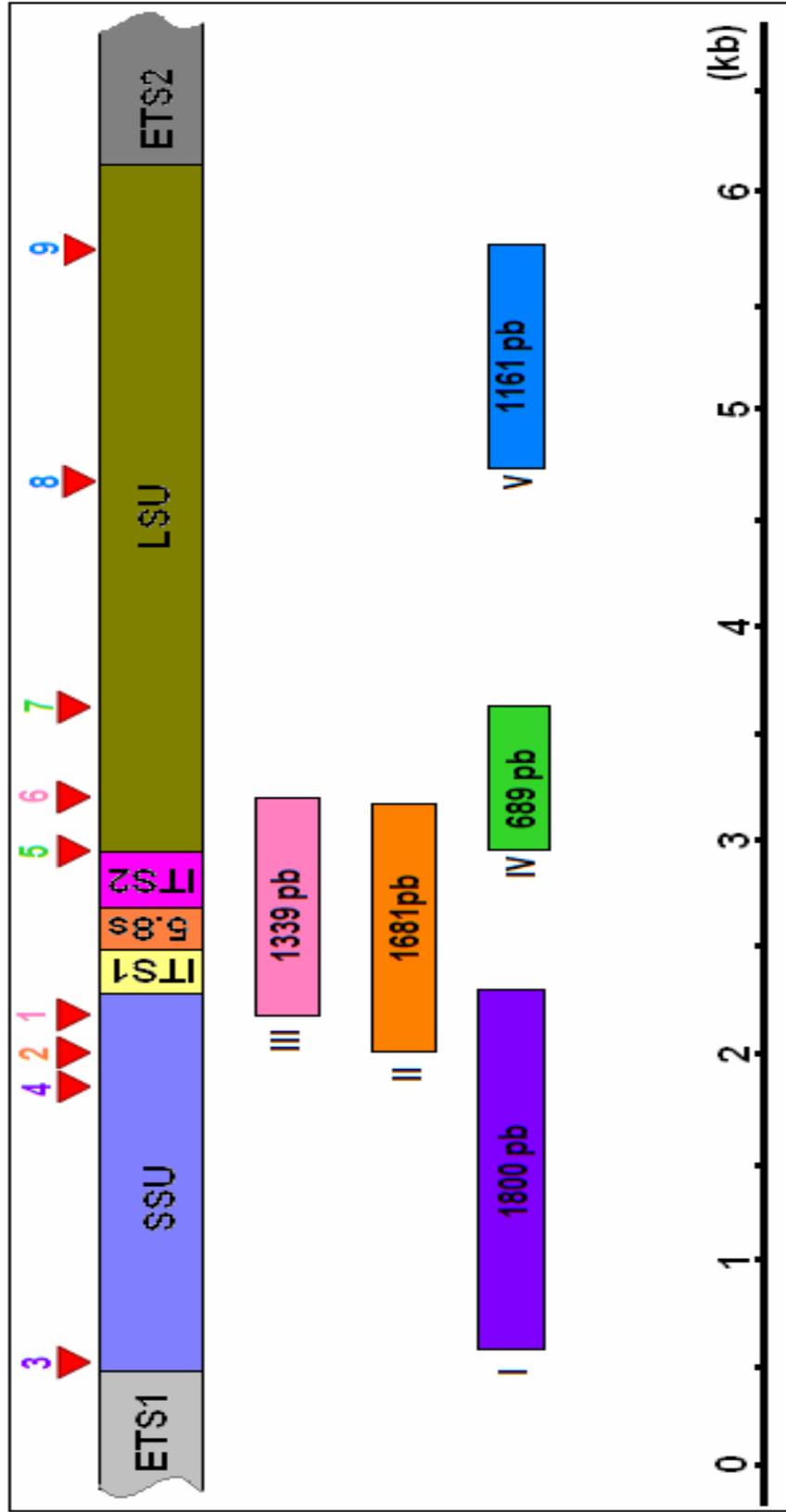
y se documentaron fotográficamente mediante el sistema UVIDoc (UVP, England).

### 5.3 Amplificación fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADN genómico obtenido fue usado como templado para la amplificación de fragmentos específicos correspondientes a las regiones ribosomales SSU, ITS y LSU, mostradas en la figura 7. La mezcla de reacción contenía: 1 µL de ADN (100 ng/µL), 2.5 µl de cada oligo (10 pM), 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5 µL de amortiguador PCR 10X, 5 µL de DMSO (10%), 1 µL de dNTP's (10 mM), 1U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen) y 33.8 µL de agua ultra-pura estéril (mili-Q). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Techne (GENIUS), de acuerdo a los programas mostrados en la tabla VI.

**Tabla VI.** Condiciones de amplificación para las combinaciones de cebadores utilizadas (ITS/SSU, SSU y LSU).

Gen	Paso	T/t (°C/seg)	Ciclos	Combinación
ITS-SSU	Desnaturalización inicial	95° C/5'	1	II, III y IV
	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	I
	Desnaturalización	95° C/1'	35	
	Alineamiento	52° C/1'		
	Extensión	72° C/ 2'		
	Extensión final	72° C/ 10'	1	
LSU	Desnaturalización inicial	95°C/5'	1	V
	Desnaturalización	94°C/2'	5	
	Alineamiento	45°C/2'		
	Extensión	72°C/ 3'		
	Desnaturalización	95°C /1'	35	
	Alineamiento	50°C/ 2'		
	Extensión	72°C/ 1.5'		
Extensión final	72°C/ 10'	1		



**Figura. 7.** Modelo de un fragmento de ADN ribosomal. Los triángulos rojos indican la región en la cual se anclan los cebadores. En bloques de colores se denota el amplicón obtenido con las parejas de cebadores referidos en la tabla 5.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los reportados por Edvardsen et al. (2003), Elwood et al. (1985), Medlin et al. (1988) y Scholin et al. (1996) así como los cebadores HAB LSU 2F y HAB LSU 3R, diseñados en el laboratorio (Hernández, 2007, comp. Pers.), con base en la secuencia reportada para el LSU de *Prorocentrum micans* (ID X16108). En la figura 4 se muestra la ubicación relativa (en el ADNr) de cada uno de los cebadores usados, así como la posición y tamaño de los amplicones esperados (identificados con colores y números romanos). En la tabla VII, se presentan las características de los cebadores, así como las combinaciones de los mismos que se usaron para generar los diferentes amplicones (I a V en números romanos).

**Tabla VII.** Listado de cebadores utilizados.

Gen	No.	Nombre	Longitud (pb)	Tm (°C)	Combinación	Referencia
ITS/ SSU	1	HAB ITS SSU 1F	17	57	III	Elwood <i>et al.</i> (1985)
	2	HAB ITS SSU 2F	15	52	II	Elwood <i>et al.</i> (1985)
SSU	3	HAB SSU 1F	20	62	I	Medlin <i>et al.</i> (1988)
	4	HAB SSU 1R	24	71	I	Medlin <i>et al.</i> (1988)
LSU	5	HAB LSU 1F	20	56	IV	Scholin <i>et al.</i> (1996)
	6	HAB LSU 1R	20	54	III	Elwood <i>et al.</i> (1985)
	7	HAB LSU 2R	20	60	IV	Scholin <i>et al.</i> (1996)
	8	HAB LSU 2F	17	52	V	Hernández, 2007 (com.pers.)
	9	HAB LSU 3R	16	52	V	Hernández (2007)

#### 5.4 Secuenciación

Los productos de PCR fueron purificados por el método de sílica gel (Davies, *et al.* 1986) y la secuencia de nucleótidos se determinó en ambas cadenas, usando los cebadores F y R, correspondientes a cada combinación, por el método de Ausubel (1996). El servicio de purificación y secuenciación de amplicones fue realizado por la compañía MacroGen (Seul, Korea; <http://www.macrogen.com>).

## 5.5 Análisis de secuencia

Se realizaron análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas para cada región del ADN ribosomal, usando el programa DNAMAN. Adicionalmente, se realizaron análisis de alineamiento entre las secuencias obtenidas con aquellas reportadas en el banco de datos del Nacional Center for Biotechnology Information usando el algoritmo Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 5.6 Métodos de hibridación

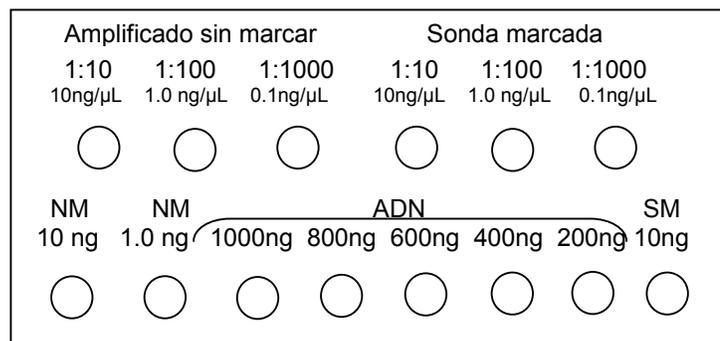
Se realizaron pruebas preliminares de hibridación utilizando el formato de hibridación de marcaje con digoxigenina (Dig), el cual se describe brevemente a continuación:

### **5.6.1 Dot Blot-Dig**

*5.6.1.1 Marcado de sonda.* Se utilizaron como sondas para la hibridación los amplicones que presentaron mayor grado de polimorfismo entre las especies blanco; se marcaron con digoxigenina utilizando el PCR DIG Probe Synthesis kit (Boehringer Mannheim®). Los productos marcados (5 µL de cada reacción) se analizaron mediante electroforesis submarina en geles de TBE/agarosa-synergel al 1 %, preteñidos con bromuro de etidio; los resultados fueron documentados como se mencionó anteriormente (punto 5.2). Finalmente, las sondas se purificaron mediante el uso del Rapid PCR Purification System (Life Technologies®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

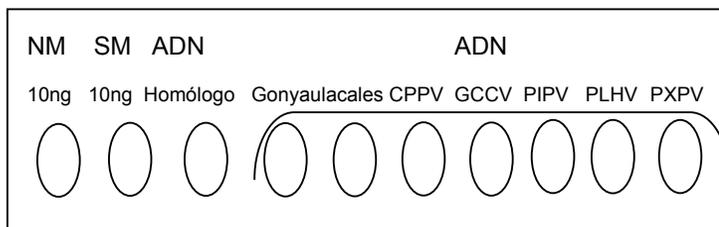
Para determinar la sensibilidad de las sondas se realizaron diluciones en serie 1:10 – 1:10 000, partiendo de una concentración de ADN total de 10 ng/µL en un volumen de 200 a 500 µL. Para determinar el límite de detección de ADN se utilizaron diferentes concentraciones de ADN genómico (1 µg, 800

ng, 600 ng, 400 ng y 200 ng) y a cada concentración se le agregó NaOH, 1 M y EDTA, 200 mM pH 8.2 para obtener una concentración de 0.4 M NaOH/10 mM EDTA. Las diluciones se desnaturalizaron durante 10 min a 95° C y se enfriaron inmediatamente en hielo. Posteriormente, se les agregó 1 volumen de 6X SSC y se inmovilizaron en una membrana de nylon utilizando el sistema manifold (BioRad) de acuerdo al esquema mostrado en la figura 8. En la primera hilera se colocaron las diluciones del amplificado sin marcar (control de hibridación) y las diluciones con la sonda marcada (control de revelado). En la segunda hilera se colocaron las muestras de ADN a diferentes concentraciones; finalmente, los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana con luz ultravioleta en un HibryLinker HL 2000® (UVP).



**Figura 8.** Esquema del diseño experimental para la determinación de la sensibilidad y límite de detección de ADN de las sondas AMCQ, LPCQ Y GSCQ marcadas con Dig. Controles: NM, sonda no marcada; SM, sonda marcada.

Para establecer la especificidad de las sondas, se hicieron pruebas de hibridación cruzadas, es decir, se utilizó ADN genómico (500 ng) de los distintos cultivos de dinoflagelados. Se les dio el mismo tratamiento de desnaturalización antes mencionado y se fijaron en membrana de Nylon. La finalidad de hacer esta prueba fue verificar que la sonda marcada con Dig reconozca únicamente a la especie para la cual fue diseñada; el diseño experimental de esta prueba se ejemplifica en la figura 9.



**Figura 9.** Esquema del diseño experimental para determinar la especificidad de las sondas AMCQ, LPCQ Y GSCQ marcadas con Dig. Controles: NM, sonda no marcada; SM, sonda marcada.

*5.6.1.2 Pre-hibridación.* Las membranas se colocaron en botellas de hibridación adicionando 5 mL de solución de pre-hibridación (5X SSC, 1 % reactivo de bloqueo [ROCHE], 0.1 % sarcosil, 0.1 % NaCl, 0.02% SDS) por cada 10 cm<sup>2</sup> de membrana; la pre-hibridación se llevó a cabo en un horno de hibridación (HibryLinker HL 2000<sup>®</sup>, UVP) a 40° C durante tres horas.

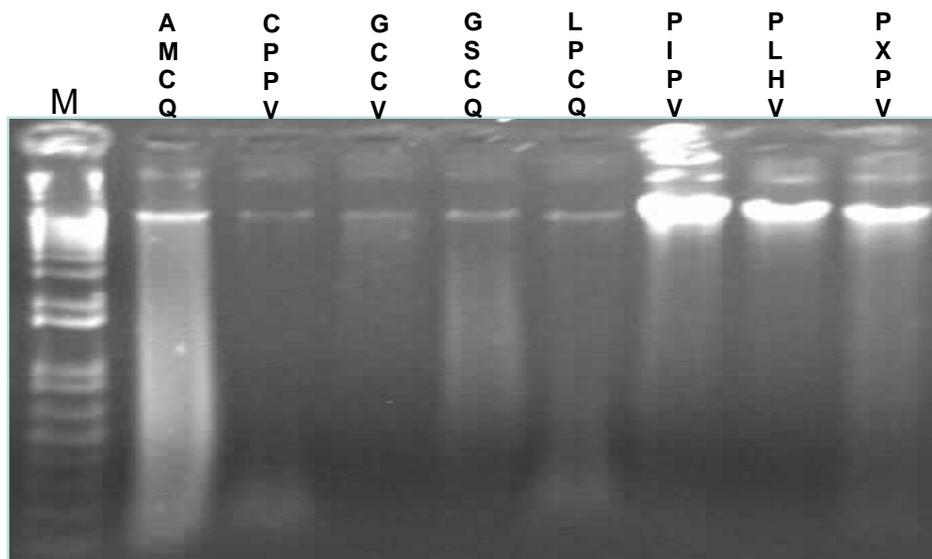
*5.6.1.3 Hibridación.* La sonda marcada con DIG se desnaturalizó por ebullición durante 10 min., e inmediatamente después se enfrió en baño de hielo y se agregó en solución de pre-hibridación nueva (pre-equilibrada a 40 °C). La hibridación se lleva a cabo a 40° C durante 16 hr. Transcurrida la hibridación, la solución de hibridación se recuperó y la membrana se lavó dos veces durante 5 min. con 5 mL de solución de lavado (2X SSC, 0.1% SDS) a temperatura ambiente.

*5.6.1.4 Detección Inmunológica.* A cada membrana se le adicionaron 5 mL de solución de bloqueo (1 % reactivo de bloqueo) y el anticuerpo anti-Dig conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>) a una dilución 1:1000; se incubó durante 1 hr. a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se retiró la solución y la membrana se lavó dos veces con 5 mL de solución de lavado (0.1 M ác. maleico, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3 % Tween 20) durante 15 min. Posteriormente, la membrana se equilibró en amortiguador de detección (Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M; NaCl 0.1 mM; MgCl<sub>2</sub> 0.5 M) durante dos minutos. Se retiró la solución y se agregaron 5 mL de amortiguador de detección con el sustrato cromogénico (45 µL de nitroazul de tetrazolium - NBT 75 mg/mL- y 35 µL de 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato p-toluidina -BCIP 50 mg/mL-). La membrana se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta el desarrollo del color. Una vez que se observó la marca deseada, la membrana se lavó con agua destilada para detener la reacción. Finalmente, la membrana se secó entre dos hojas de papel 3M y se documentó con un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc<sup>®</sup>).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Extracción de ADN

De las once especies consideradas en el estudio, se obtuvo ADN total de buena calidad como consecuencia de las modificaciones realizadas al procedimiento original, desarrollado por Doyle y Doyle (1990). Con el método modificado se redujo la pérdida del ADN por manejo y dilución, lo que repercutió directamente en la mejora de la eficiencia de amplificación; algunos ejemplos de los resultados finales pueden observarse en la figura 10.



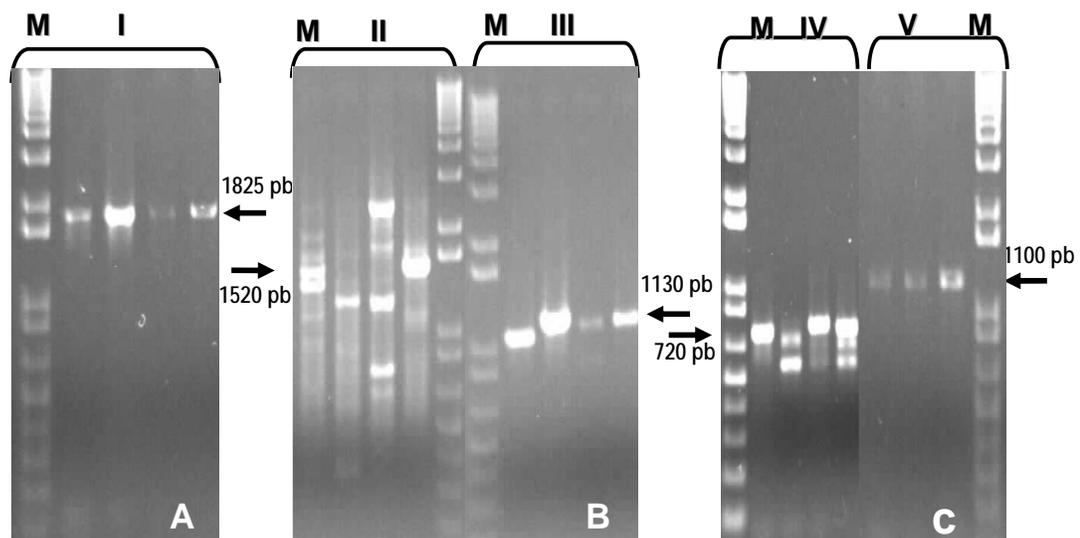
**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa-TBE al 1% de ADN total de dinoflagelados. Líneas: AMCQ, *Alexandrium margalefii*; CPPV, *Cochlodinium polykrikoides*; GCCV, *Gymnodinium catenatum*; GSCQ, *Gonyaulax spinifera*; LPCQ, *Lingulodinium polyedrum*; PIPV, *Prorocentrum minimum*; PLHV, *Prorocentrum lima*; PXPV, *Prorocentrum mexicanum*. M: M, escalera de 1 kb (Invitrogen). Técnica de tinción: EtBr.

### 6.2 Amplificación de fragmentos discretos del ADNr

El ADN total obtenido se utilizó como templado para la amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa, de algunas regiones específicas de los genes del ADNr. Para la obtención de fragmentos del SSU de alrededor de 1.8 kb, se usó la combinación I de cebadores. Para asegurar la

obtención de la región correspondiente a los ITSs (1 y 2) y gen 5.8S (que esta reportada como hipervariable) se probaron las combinaciones de cebadores II y III, que generaron fragmentos de ~ 1.5 y 1.1 Kb, respectivamente. Finalmente, para la amplificación específica de regiones del LSU se usaron las combinaciones de cebadores IV y V, que generaron fragmentos aproximados de 0.7 y 1.1Kb, respectivamente. Algunos ejemplos de los productos de amplificación generados, se muestran en la figura 11.

Como se observa en la figura 11, los productos de PCR fueron obtenidos exitosamente, obteniéndose básicamente dos tipos de resultados: 1) patrones específicos, es decir, un solo amplicón y 2) patrones compuestos, en los que como productos de la amplificación se obtuvieron al menos dos amplicones. El primer tipo de patrones (específicos) se obtuvo con las combinaciones I, III y V, mientras que los patrones compuestos se obtuvieron con las combinaciones II y IV. Para fines prácticos, y como las combinaciones II y III amplifican la misma región (ITSs y 5.8S), se optó por trabajar con la combinación III. En la tabla VIII, se presenta un resumen de los productos de PCR obtenidos.



**Figura 11.** Amplicones obtenidos usando diversas combinaciones de cebadores dirigidos al ADNr. Paneles: A) combinación I, gen SSU (1.8 kb); B) combinaciones II y III, gen 5.8S e ITSs (1.5 y 1.1 kb); C) combinaciones IV y V, gen LSU (0.7 y 1.1 kb); M, escalera de 1 kb (Invitrogen). Nota: Gel de TBE/agarosa- synergel al 1%; técnica de tinción EtBr.

**Tabla VIII.** Resumen de amplicones obtenidos para las especies en estudio usando las diferentes combinaciones de cebadores.

ESPECIE	COMBINACIÓN DE CEBADORES				
	I	II	III	IV	V
<i>A. sanguinea</i>					
<i>C. polykrikoides</i>					
<i>G. catenatum CV</i>					
<i>G. catenatum MV</i>					
<i>A. affine</i>					
<i>A. margaleffi</i>					
<i>G. turbiney</i>					
<i>G. spinifera</i>					
<i>L. polyedrum</i>					
<i>P. minimum</i>					
<i>P. lima</i>					
<i>P. mexicanum</i>					

### 6.3 Secuenciación y análisis de alineamiento

Las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de los productos de PCR, empleando los cebadores listados en la tabla 7, fueron comparadas con las bases de datos más redundantes mediante el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para excluir o confirmar la especie, según el caso (anexos 1, 2 y 3). Después de un análisis preliminar (realizado para confirmar la identidad de los genes blanco), el análisis de alineamiento completo se realizó solo con aquellas secuencias que presentaron similitud (con los respectivos genes homólogos) con registros del GenBank. Para la presentación de resultados, las secuencias se agruparon por especie, mostrándose a continuación en formato de tabla y gráfico en las figuras 12-19. Mientras que en la parte de la tabla se presentan las características principales de los amplicones secuenciados y de las secuencias obtenidas, en la parte gráfica, se muestran tanto el número y tamaño de las secuencias obtenidas y caracterizadas, así como su posición relativa como resultado de la comparación y alineamiento con los registros completos del ADNr de dinoflagelados en el GenBank.

### 6.3.1 Orden Gymnodiniales

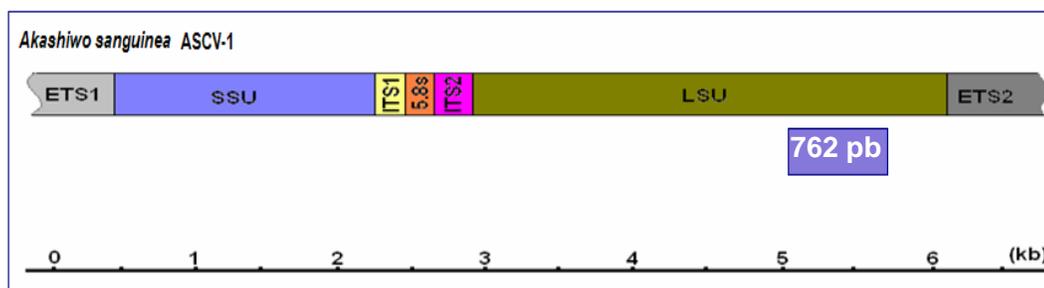
Los Gymnodiniales, en este estudio representados por las especies de los generos *Akashiwo*, *Cochlodinium* y *Gymnodinium*, fue un grupo en el que se obtuvieron resultados heterogeneos en relación al éxito de amplificación del ADN blanco. Por un lado para *A. sanguinea* se obtuvo solo una secuencia, mientras que para *G. catenatum* se obtuvo alrededor del 50% de la información blanco y, finalmente, para *C. polykrikoides*, alrededor del 75% mediante el uso de los cebadores universales propuestos (fragmentos específicos de los genes SSU, tandem SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU y LSU).

#### 6.3.1.1 *Akashiwo sanguinea* (ASCV-1).

Solo se obtuvo una secuencia de nucleótidos que corresponde al fragmento V del LSU (figura 12), consiguiéndose únicamente 762 pb (en un solo sentido, +) que representan el 50% de la longitud total del amplicón (pb), y únicamente el 12.27% del total de bases perseguidas en el estudio (en todas las especies estudiadas se uso la misma referencia -AY831408- para el cálculo del porcentaje de cobertura de secuencias).

Se confirmó la especie observándose un 92% de identidad con la especie homóloga reportada en el GenBank (AY831412), entre homologías menores con otras especies (anexo 1). Para *A. sanguinea* los registros preexistentes en el GenBank son mayores a la secuencia obtenida en este estudio (tabla IX), ya que en el banco de datos se incluyen los registros completos del SSU, ITSs y LSU, así como registros parciales para la subunidades pequeña y grande.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplificación (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
A. sanguinea	ASCV-1	LSU	1100	V	8	07_E17_PSA11- 1239_F	762	+



**Figura 12.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *A. sanguinea* (ASCV-1).

**Tabla IX.** Secuencias de nucleótidos de *A. sanguinea* (tax ID: 143672) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

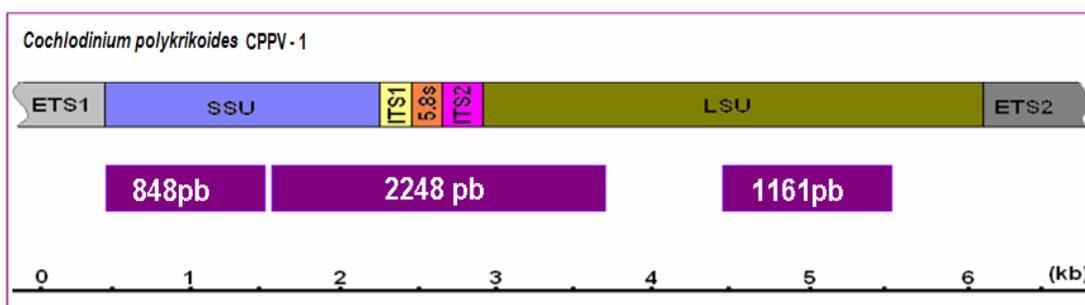
Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
CCMP 1321	AY831412	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, completo	6,332	ADN	22/07/2008
GnSg03	AY831411	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, completo	6,382	ADN	22/07/2008
GnSg02	AY831410	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, completo	6,187	ADN	22/07/2008
CCMP1740	EF492486	SSU, parcial	1,791	ADN	31/03/2008
GT6	DQ156229	LSU, parcial	1,344	ADN	01/07/2006

### 6.3.1.2 *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1)

Para *C. polykrikoides* se obtuvieron 10 secuencias de los tres genes ribosomales considerados, obteniendo un total de 4,257 pb (figura 13) que corresponden a fragmentos del SSU (848 pb), tandem SSU-ITSs-LSU (2, 248 pb) y LSU (1,161 pb), que en conjunto representan el 74.26% del ADNr blanco. Se confirmó la especie, observándose el mayor porcentaje de identidad (98%) con la especie homóloga del GenBank (DQ779986 para el SSU y SSU-ITS-

LSU; y EF506627 y AB295048 para el LSU) entre otras cepas de la misma especie (anexo 1).

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
<i>C. polykrikoides</i>	CPPV-1	SSU-LSU	1,130	III	1	CPITS ITS 1400F	885	+
			1,130	III	6	CP ITS LSU DIC R	853	-
			1,520	II	2	CP10 ITS 1055F	851	+
			1,520	II	6	CP ITS LSU DIC R	848	-
		SSU	1,800	I	3	CPSSU SSU 1F	848	+
			1,800	I	4	CP SSU SSU 1528R	849	-
		LSU	720	IV	5	CPD1D2 LSU DIR F	715	+
			720	IV	7	CPD1D2 LSU D2C R	843	-
			1,100	V	8	CP LSU 1239F	843	+
			1,100	V	9	CP LSU 2400R	845	-



**Figura 13.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *C. polykrikoides* (CPPV-1).

En la tabla X, pueden observarse algunos de los registros existentes en el GenBank para la especie, 4 registros completos para las regiones amplificadas en este trabajo y, en su mayoría, el resto de los fragmentos corresponden al gen LSU, con secuencias  $\leq$  a 2, 248 pb.

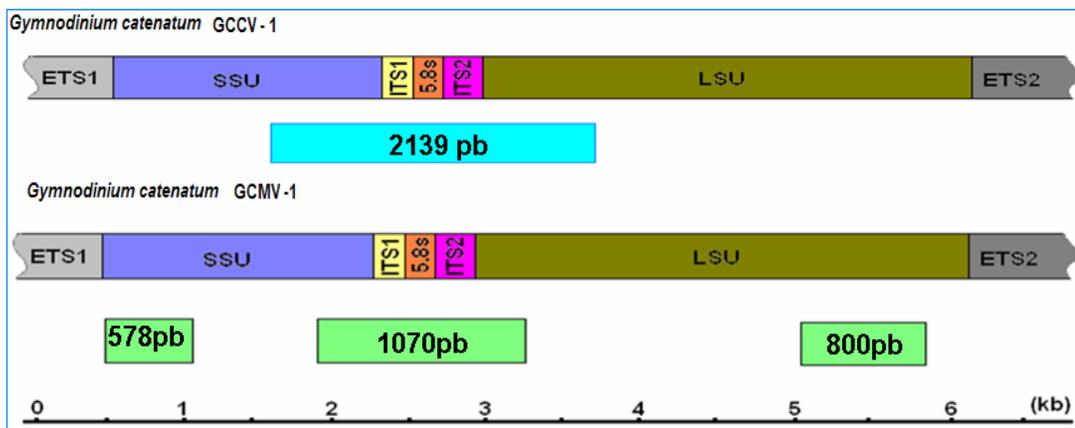
Para la región de los SSU-ITS y gen 5.8S del ARNr, se encuentran registradas 8 secuencias de 1,175 pb, y para el SSU, hay 31 registros completos y parciales. Los reportes preexistente en el GenBank para *C. polykrikoides* CPPV-1 (EF506627 y EF506628, en negritas) corresponden a la región de los dominios D1 - D3 y D4 - D6 (963 y 956 pb, respectivamente, ubicadas en el primer y segundo cuarto del gen LSU), e incluye los registros

obtenidos con la secuenciación de los amplicones IV y V. Esto nos permite confirmar la integridad y fidelidad de nuestra secuencia (2, 248 pb) ya que esta incluida en los registros completos preexistentes en el GenBank, al igual que el fragmento de 848 pb (que corresponde al extremo 5' del SSU).

### 6.3.1.3 *Gymnodinium catenatum* (GCCV-1 y GCMV-1)

De la cepa GCCV-1 (aislada de Bahía Concepción, B.C.S.) se obtuvieron 5 secuencias de los tres genes ribosomales considerados, obteniendo un total de 2,139 pb (figura 14), que corresponden a los fragmentos SSU-ITSs-LSU, que representan en su conjunto el 37.31% del ADNr blanco.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
<i>G. catenatum</i>	GCCV-1 / GCMV-1	SSU	1,130	III	1	GCMV ITS ITS 1400F	849	+
			1,130	III	6	GCMV ITS LSU DICR	844	-
			1,130	III	1	GCV ITS ITS 1400F	852	+
			1,130	III	6	GCV ITS LSU DIC R	844	-
		SSU	1,800	I	3	GCMV SSU SSU 1F	722	+
			1,800	I	4	GCVSSUSSU1528R	818	-
		LSU	1,100	V	9	GCMV LSU 2400R	795	-
			720	IV	5	GCND1D2 LSUDIRF	602	+
			720	IV	7	GCNDID2LSUD2CR	710	-



**Figura 14.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *G. catenatum* (GCCV-1 y GCMV-1).

**Tabla X.** Secuencias de nucleótidos de *C. polykrikoides* (tax ID:77300) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha
GD1590bp39	EU418971	SSU, parcial	1,590	ADN	18/02/2008
GD1589bp49	EU418965	SSU, parcial	1,589	ADN	18/02/2008
GD1589bp46	EU418964	SSU, parcial	1,589	ADN	18/02/2008
GD1589bp45	EU418963	SSU, parcial	1,589	ADN	18/02/2008
GD1138bp24	EU418952	SSU, parcial	1,138	ADN	18/02/2008
GD1025bp48	EU418949	SSU, parcial	1,025	ADN	18/02/2008
ND	EU418946	SSU, parcial	1,589	ADN	18/02/2008
clone 9	EU418945	SSU, parcial	454	ADN	18/02/2008
BSW0109	AY421779	SSU, parcial	1,789	ADN	15/03/2007
CP0	AY421780	SSU, parcial	1,789	ADN	15/03/2007
CP-PP4	AY421781	SSU, parcial	1,789	ADN	15/03/2007
YS2004	DQ887495	SSU, parcial	510	ADN	30/09/2006
CcPk05	DQ779986	SSU TS1, 5.8S, ITS2, LSU	6,823	ADN	21/07/2008
CcPk03	DQ779985	SSU TS1, 5.8S, ITS2, LSU	6,823	ADN	21/07/2008
CcPk02	DQ779984	SSU TS1, 5.8S, ITS2, LSU	6,823	ADN	21/07/2008
NFFCPO2	EU418934	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2 parcial	1,175	ADN	02/03/2008
NFFCPO5	EU418935	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2 parcial	1,176	ADN	02/03/2008
NFFCPO1	EU418933	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2 parcial	974	ADN	02/03/2008
CP-1	AF208248	ITS1, 5.8; ITS2, parcial	595	ADN	27/ 2000
CPPV-1	EF506627	LSU, parcial	963	ADN	30/09/2007
CPPV-1	EF506628	LSU, parcial	956	ADN	30/09/2007
CPCB10	EF506625	LSU, parcial	968	ADN	30/09/2007
HK	EF506623	LSU, parcial	953	ADN	30/09/2007
CP2002-1	EF506622	LSU, parcial	953	ADN	30/09/2007
CPCB10	EF506626	LSU, parcial	956	ADN	30/09/2007
PP-3	EF506617	LSU, parcial	957	ADN	30/09/2007
C. poly	EF506615	LSU, parcial	957	ADN	30/09/2007
PR107	AB295050	LSU, parcial	2,448	ADN	29/08/2007
cp2	AB295049	LSU, parcial	1,975	ADN	29/08/2007
cp1	AB295048	LSU, parcial	2,448	ADN	29/08/2007
OM7-ND59	AB295047	LSU, parcial	1,514	ADN	29/08/2007
USUKA	AB288386	LSU, parcial	1,508	ADN	04/09/2007
KG8-ND14	AB288385	LSU, parcial	1,502	ADN	04/09/2007
OB7-ND3	AB288384	LSU, parcial	1,508	ADN	04/09/2007
ND	AY725423	LSU, parcial	1,012	ADN	04/09/2007
CpFB-06-1/2	EF110557	LSU, parcial	890	ADN	13/12/2006
CpFB-06-1/2	EF110556	LSU, parcial	856	ADN	13/12/2006
ND	AF067861	LSU, parcial	734	ADN	11/06/1998

Se confirmó la especie, observándose el 100% de identidad con la especie homóloga del GenBank (EU418954 para SSU y SSU-ITS-LSU DQ785883), entre otras cepas (anexo 1).

Para *G. catenatum* GCMV-1 (aislada de Mazatlán, Sinaloa) se obtuvieron 4 secuencias, lo que hace un total de 2,248 pb (figura 14) que corresponden a fragmentos de los genes ribosomales SSU (578), tandem SSU-ITSs-LSU (1,070 pb) y LSU (800 pb), que en conjunto representan el 42.7% del ADNr blanco. La especie se confirmó, observándose una identidad del 98% con la especie homóloga del GenBank (DQ785883 para SSU, SSU-ITS-LSU y LSU), entre otras cepas (anexo 1).

En la tabla XI, se muestran algunos de los registros del GenBank para la especie: 4 registros completos para las regiones amplificadas en este trabajo. El resto de las secuencias, corresponden a registros del LSU, no mayores a 1,013 pb. Para la región de los ITS y gen 5.8S del ARNr, se encuentran registradas 20 secuencias,  $\leq$  576 pb, y para el SSU, hay 10 registros que consisten de registros completos y parciales para esta subunidad. El registro del GenBank para la cepa CCMP414 (5,771 pb) incluye todo el ADNr (ETS1, SSU, ITSs 1 y 2 y el gen 5.8S, LSU y ETS2), y dentro de este fragmento están incluidas las secuencias de los amplicones I, III, IV y V.

### **6.3.2 Orden Gonyaulacales**

Los Gonyaulacales, en este estudio representados por las especies de los generos *Alexandrium*, *Gonyaulax* y *Lingulodinium*, fue el grupo de dinoflagelados en el que se observó un mayor porcentaje de éxito en la amplificación de las regiones de interés (fragmentos específicos de los genes SSU, tandem SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU y LSU) mediante el uso de los cebadores universales propuestos, observándose un margen de éxito superior al 55%.

**Tabla XI.** Secuencias de nucleótidos de *G. catenatum* (tax ID:39447) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

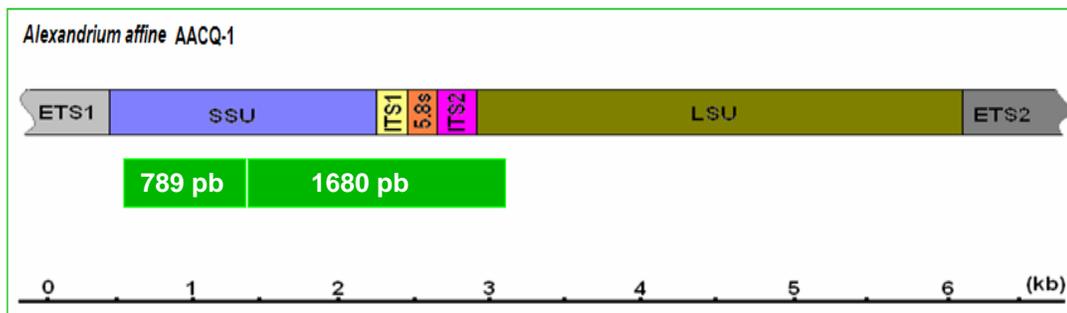
Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha
GCCW991	DQ779989	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	5,089	ADN	04/08/2008
CCMP414	DQ779990	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	5,771	ADN	04/08/2008
GD1591bp1	EU418973	SSU, parcial	1,591	ADN	18/02/2008
CCMP1940	DQ785883	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	5,961	ADN	01/07/2007
GnCt01	DQ785882	SSU, TS1, 5.8S, ITS2, LSU	6,457	ADN	01/07/2007
JHW9910	EF613352	LSU, parcial	1,016	ADN	18/06/2007
DC99A44	AY421784	SSU, parcial	1,791	ADN	15/03/2007
ND	AB265966	LSU, parcial	669	ADN	27/12/2006
ND	AB265962	SSU, parcial	1,756	ADN	27/12/2006
ND	DQ887512	SSU, parcial	507	ADN	30/09/2006
GC21V	AB196486	LSU, parcial	720	ADN	13/06/2006
GCPT03	AY916536	LSU, parcial	592	ADN	20/12/2005
GC	DQ286734	LSU, parcial	1,013	ADN	07/12/2005
GCNZ	DQ286733	LSU, parcial	999	ADN	07/12/2005
CCVIEO GC56AM	AY506592	ITS1, 5.8S, ITS2, parcial	524	ADN	18/01/2004
CCVIEO GC51AM	AY506590	ITS1, 5.8S, ITS2, parcial	524	ADN	18/01/2004
DC99A44	AY036127	LSU, parcial	697	ADN	11/12/2002
GC49AM	AF375860	SSU, parcial	347	ADN	21/05/2001
GC49AM	AF375858	LSU, parcial	907	ADN	21/05/2001
GC36AM	AF375857	LSU, parcial	907	ADN	21/05/2001
GCSP03	AY036077	LSU, parcial	697	ADN	16/08/2001
GCPTL01-4	AY036075	LSU, parcial	697	ADN	16/08/2001
GC19V	AF208247	ITS1, 5.8S, ITS2, parcial	576	ADN	27/12/2000
ND	AF200672	LSU, parcial	973	ADN	02/08/2000
Gc19V	L38628	LSU, parcial	330	ADN	21/11/1995
Gc19V	L38627	LSU, parcial	687	ADN	21/11/1995
MUCC273	AF022193	18S SSU	1,804	ADN	28/01/1998

### 6.3.2.1 *Alexandrium affine* (AACQ-1)

Se obtuvieron 4 secuencias de dos bloques de genes ribosomales, haciendo un total de 2,539 pb (figura 15), distribuidas en dos fragmentos que corresponden a la primera sección del SSU (789 pb), y a la secuencia concenso del SSU-ITSs-LSU (1,680 pb), que en su conjunto representan el 43.07% del ADNr blanco.

Para *A. affine* (tax ID: 39453), existen 56 secuencias de nucleótidos registradas en el GenBank, de las que solo el 50% corresponden a genes ribosomales, algunos de los cuales están enlistados en la tabla XII. La confirmación de especie de la cepa AACQ-1 no fue muy clara, ya que se observa el mismo nivel de identidad con otras especies del genero (anexo 1), observándose una homología de entre el 74 al 86 % (secuencias forward y reverse del SSU, respectivamente) en el caso del gen SSU (AJ535375). Por otra parte, la región del tandem SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU, muestra alrededor del 71% de identidad con la especie homóloga (anexo 1). Aunque existen registros para la cepa AACQ-1 (AY152706, en negritas), este corresponde a la región 5' del LSU (dominios D1-D2) reportada por Band *et al.* (2003), que no se obtuvo en este trabajo (amplicón IV). En términos generales, pareciera ser que existe mayor identidad con otras especies, como *A. margalefii* y/o *A. ostenfeldii*, por lo que es recomendable confirmar los resultados secuenciando otros amplicones de las mismas regiones, ya que se confirmó con la curadora de la colección (CODIMAR) la identidad de la especie en términos de taxonomía convencional.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
Alexandrium	AACQ-1	SSU-LSU	1,340	III	1	07A11PAF14ITS1400F	762	+
			1,340	III	6	07C11PAF14LSUDICR	828	-
		SSU	1,800	I	3	07M13 PAF15SSU1F	789	+
			1,800	I	4	07O13PAF15SSU1528	835	-



**Figura 15.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *A. affine* (AACQ-1).

**Tabla XII.** Principales secuencias de nucleótidos de *A. affine* (tax ID: 39453) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
CCMP 112	AY831409	ETS1,SSU,ITS1,5.8S,ITS2, LSU, ETS2	6,625	DNA	21/07/2008
JH0210	AY775286	SSU	1,789	RNA	12/09/2007
AAF37	AB088282	SSU	1,820	DNA	12/04/2007
CCMP112	AJ535375	SSU	1,807	DNA	14/08/2003
IEO-PA8V	AJ632095	ITS1,5.8S,ITS2	523	DNA	17/07/2006
IEO-PA4V	AJ632094	ITS1,5.8S,ITS2	525	DNA	17/07/2006
ND	EF579793	ITS1,5.8S,ITS2	525	DNA	27/05/2007
AC-1	DQ176665	ITS1,5.8S,ITS2	525	DNA	17/09/2005
AS-1	DQ176664	ITS1,5.8S,ITS2	525	DNA	17/09/2005
AaMS01	AY566190	LSU, parcial	662	DNA	30/07/2007
AAKT13	EF178150	LSU, parcial	682	RNA	18/04/2007
AFF37	AB088228	LSU, parcial	711	DNA	14/04/2007
AFF37	AB088227	LSU, parcial	711	RNA	14/04/2007
JHW0210	AY438015	LSU, parcial	989	DNA	15/04/2007
AABCV-1	AY152706	LSU, parcial	671	DNA	31/12/2003
AABB01	AY916552	LSU, parcial	565	DNA	20/12/2005
A10	DQ287852	LSU, parcial	971	DNA	10/12/2005

### 6.3.2.2 *Alexandrium margalefii* (AMCQ-1)

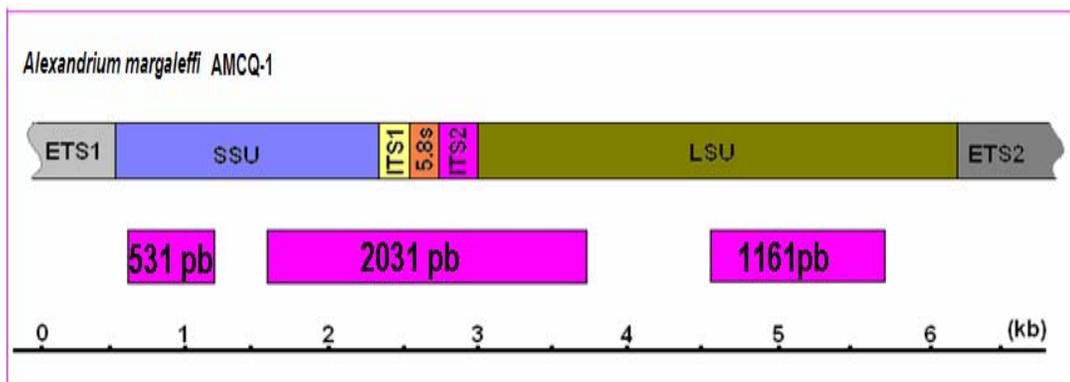
Para esta especie se obtuvieron 10 secuencias de los tres genes ribosomales considerados en el estudio, haciendo un total de 3,732 pb (figura 16), distribuidas en tres fragmentos concenso que corresponden a los: SSU (531 pb), tandem SSU-ITSs-LSU (2,031 pb) y LSU (1,161 pb), que en su conjunto representan el 65.1 % del ADNr blanco. Se confirmó la especie, observándose el mayor porcentaje de identidad (> 96 %) con la especie homóloga en el GenBank (U27498 para el SSU e ITSs y AF318230 para el LSU), entre otras especies del mismo género (anexo 2).

Como puede observarse en la tabla XIII, los registros en el GenBank para la especie, son en su mayoría fragmentos del LSU, no mayores de 1,359 pb. Para la región de los ITSs y gen 5.8S del ARNr, están registradas solo 2 secuencias de 481 pb, y para el SSU, hay un solo registro de la subunidad completa.

El reporte preexistente para la especie y cepa en el GenBank (AY152708, negritas, realizado por Band *et. al.* (2003), corresponde a la región de los dominios D1 y D2 (674 pb, ubicadas en el primer cuarto del gen LSU).

La secuencia de 2,030 pb generada en este estudio, no solo incluye la región completa reportada por Band *et. al.* (2003), sino que además incluye un fragmento del SSU, ITSs 1 y 2 y el gen 5.8S.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
A. margaleffi	AMCQ-1	SSU-LSU	1,130	III	1	AMITSITS1400F	852	+
			1,130	III	6	AM ITS LSU DIC R	847	-
			1,520	II	2	AMITS 10 ITS 1055F	835	+
			1,520	II	6	AM ITS LSU DIC R	825	-
		SSU	1,800	I	3	AM SSU SSU 1F	766	+
			1,800	I	4	AM SSU SSU 1528R	843	-
		LSU	720	IV	5	AMD1D2 LSU DIR F	849	+
			720	IV	7	AMD1D2LSU D2CR	812	-
			1,100	V	8	PMA 11 1239 F	668	+
			1,100	V	9	PMA 11 2400 R	716	-



**Figura 16.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *A. margaleffi* (AMCQ-1).

Los fragmentos de 481 pb (AM237339 y AJ251208) del GenBank incluyen los ITSs y gen 5.8S, sin embargo, los registros generados en este estudio son más completos ya que las regiones secuenciadas están ancladas en los genes SSU

y LSU; la secuencia de nucleótidos del amplicón V, que corresponde al tercer cuarto del LSU, es un reporte nuevo para la especie.

**Tabla XIII.** Secuencias de nucleótidos de *A. margalefii* (tax ID: 109239) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
ND	AMU27498	SSU	1,798	DNA	01/11/1995
IEO-VGO661	AM237339	ITS1, 5.8S, ITS2	481	RNA	26/06/2008
AM-1	AJ251208	ITS1, 5.8S, ITS2	481	DNA	26/03/2004
ND	AY154957	LSU, parcial	1,359	DNA	29/09/2008
AGNZ01	AY268609	LSU, parcial	640	DNA	30/04/2006
AGNZ01	AY152707	LSU, parcial	673	DNA	31/12/2005
AMBCQ-1	AY152708	LSU, parcial	674	DNA	31/12/2003
AMaDE01	AY916544	LSU, parcial	568	DNA	20/12/2005
X12	AF318230	LSU, parcial	712	DNA	06/04/2005
ND	AF033531	LSU, parcial	661	DNA	27/11/1997

### 6.3.2.3 *Gonyaulax spinifera* (GSCQ-1)

Se consiguieron 6 secuencias para *G. spinifera*, que hacen un total de 3,193 pb (figura 17), distribuidas básicamente en dos fragmentos consenso que corresponden a los genes: SSU (833 pb) y tandem SSU-ITSs-LSU (2,360 pb), que en su conjunto representan el 55.7% del ARNr blanco. Como se muestra en el anexo 2, en este caso, se confirmó la especie observándose el mayor porcentaje de identidad (> 95 – 98%) con la especie homóloga (DQ867107 para el SSU y EF416284, para el SSU-ITSs-LSU), entre otras especies del mismo género (anexo 2).

Como puede observarse en la tabla XIV, los registros para la especie son en su mayoría del gen LSU (< 945 pb). Para los ITS y el gen 5.8S del ARNr, solamente está registrada 1 secuencia (510 pb), y para el SSU existen dos registros completos y dos parciales.

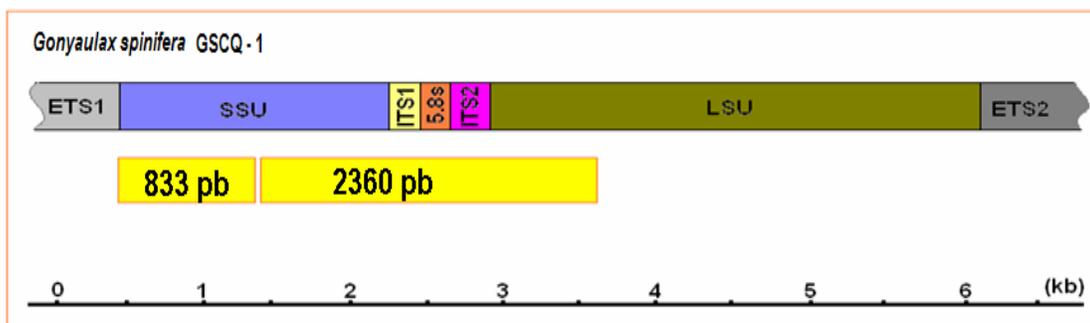
El registro preexistente del LSU para la especie (DQ151558) comprende los dominios D1 – D3, cuya secuencia que forma parte de los amplicones del tipo IV obtenidos en este estudio. Para el SSU los registros completos

(AF052190 y AF022155) permitieron identificar la región faltante de esta subunidad incluida en el amplicón de tipo I.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
G. spinifera	GSCQ-1	SSU-LSU	1,130	III	1	GSITS14MITS1400F	853	+
		LSU	1,130	III	6	GSITS14MLSUD2CR	844	-
		SSU	1,800	I	3	GS SSU SSU 1F	833	+
			1,800	I	4	GS SSU SSU 1528R	842	-
		LSU	720	IV	5	GS DID2LSU DIR F	846	+
			720	IV	7	GS DID2LSU D2CR	831	-

**Tabla XIV.** Secuencias de nucleótidos de *G. spinifera* (tax ID: 66791) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
GSTL1	AF052190	SSU	1,795	DNA	19/03/1998
CCMP409	AF022155	SSU	1,790	DNA	20/02/1998
GSA0602	EU805590	SSU, parcial	1,725	DNA	14/07/2008
Adriatic	DQ867107	SSU, parcial	1,718	DNA	27/08/2006
ND	AF051832	ITS1, 5.8S, ITS2	510	DNA	12/03/1998
GSA0602	EU805591	LSU, parcial	608	DNA	14/07/2008
GSA0501	EF416284	LSU, parcial	629	DNA	25/02/2007
isolate B	DQ151558	LSU, parcial	945	DNA	27/08/2005
isolate A	DQ151557	LSU, parcial	915	DNA	27/08/2005



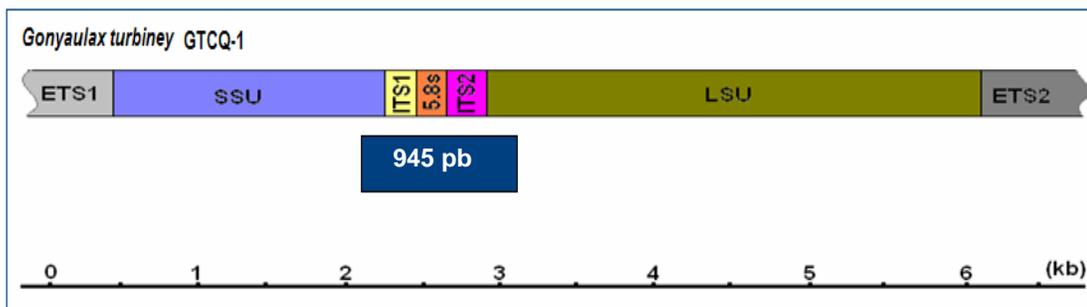
**Figura 17.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *G. spinifera* (GSCQ-1).

### 6.3.2.3 *Gonyaulax turbiney* (GTCQ-1)

Se obtuvo una secuencia (consenso) de 945 pb (figura 18), que corresponde al tandem SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU, que representa el 15.21% del ARNr blanco.

En este caso no fue posible confirmar la especie con los registros de la base de datos, ya que aunque para el género están reportadas 84 secuencias de nucleótidos, ninguna corresponde a la especie. Sin embargo, la secuencia obtenida presenta un porcentaje de identidad > 71% con especies del género *Alexandrium*, también miembro de los Gonyaulacales (anexo 2); por lo tanto, la secuencia de 945 pb representa el primer registro para la especie.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
<i>G. turbiney</i>	GTCQ-1	SSU-LSU	1,130	III	1	PTU14-ITS 1400 F	824	+
			1,130	III	6	PTU14-LSU DIC R	821	-



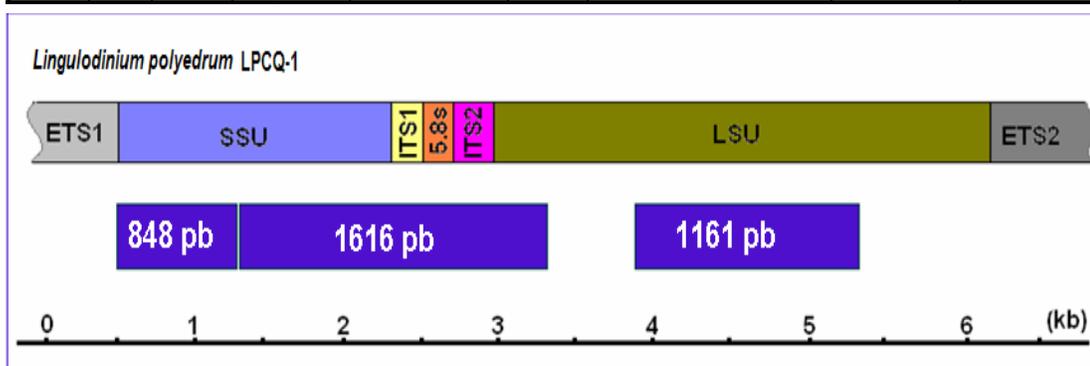
**Figura 18.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *G. turbiney* (GTCQ-1).

### 6.3.2.3 *Lingulodinium polyedrum* (LPCQ-1)

Para *L. polyedrum*, se consiguieron 8 secuencias que hacen un total de 3,625 pb (figura 19), distribuidas básicamente en tres fragmentos que corresponden a los genes: SSU (848 pb), tandem SSU-ITSs-LSU (1,616 pb) y LSU (1,161) que en su conjunto representan el 63.24% del ARNr blanco. Como

se muestra en el anexo 2, se confirmó la especie observándose el mayor porcentaje de identidad (97%) con la especie homóloga (AF377944 para el SSU, SSU-ITSs-LSU, LSU), entre otras cepas de la misma especie.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
L. polyedrum	LPCQ-1	SSU-LSU	1,130	III	1	LPITS14MITS1400F	836	+
			1,130	III	6	LPITS14MLSUD2CR	727	-
		SSU	1,800	I	3	LPSSU SSU 1F	838	+
			1,800	I	4	LP SSUSSU1528R	846	-
		LSU	720	IV	5	LP DID2LSU DIR F	725	+
			720	IV	7	LP DID2LSU D2CR	726	-
			1,100	V	8	LP LSU 1239F	847	+
			1,100	V	9	LP LSU 2400R	850	-



**Figura 19.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *L. polyedrum* (LPCQ-1).

Como puede observarse en la tabla XV, los registros para la especie en el banco de datos son en su mayoría de fragmentos del SSU  $\leq$  de 1,778 pb. Para la región de los ITSs y gen 5.8S del ARNr, solo está registrada una secuencia de 535 pb, en tanto que para el SSU existen 13 registros parciales y 3 registros completos.

El reporte de 5,526 pb para la especie (AF377944) registrado en el banco de datos incluye las secuencias que se obtuvieron en este estudio (amplicones I, III, IV y V), lo que nos permitió confirmar la especie.

**Tabla XV.** Secuencias de nucleótidos de *L. polyedrum* (tax ID: 160621,2913) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
ND	EU177128	SSU	662	ADN	17/10/2007
ND sWEDEN	EU177127	SSU	677	ADN	17/10/2007
EUA	EU177126	SSU	680	ADN	17/10/2007
Sweden	EU177125	SSU	711	ADN	17/10/2007
USA	EU177124	SSU, parcial	705	ADN	17/10/2007
DRW0108	EF613357	LSU, parcial	1,039	ADN	18/06/2007
ND	AM184208	ITS 1, 5.8S, ITS2	535	ADN	27/03/2007
MOC0001.008	DQ202226	SSU	1,161	ADN	03/08/2006
MOC0001.032	DQ202225	SSU	1,176	ADN	03/08/2006
MOC0001.007	DQ202224	SSU	1,167	ADN	03/08/2006
MOC0001.067	DQ202223	SSU	1,178	ADN	03/08/2006
MOC0001.016	DQ202221	SSU	1,249	ADN	03/08/2006
MOC0001.089	DQ202220	SSU	1,250	ADN	03/08/2006
MOC0001.064	DQ202219	SSU	1,203	ADN	03/08/2006
MOC0001.001	DQ202217	SSU	1,246	ADN	03/08/2006
CCCM 202	AF274269	SSU	1,750	ADN	10/09/2001
CCMP1738	EU165313	LSU, parcial	647	ADN	30/09/2008
CCMP1738	EF492507	SSU	1,778	ADN	31/03/2008
ND	AJ415511	SSU	1,750	ADN	04/12/2003
Gp70	X61732	LSU, D8	168	ADN	06/06/2003
Gp70	X61731	LSU, D1	349	ADN	06/06/2003
ND	AF377944	SSU, ITS 1, 5.8S, ITS2; LSU, parcial	5,526	ADN	29/05/2001

### 6.3.2 Orden Procentrales

Del grupo de especies del género *Prorocentrum* se presentó un menor porcentaje de éxito en la amplificación de las regiones de interés (fragmentos específicos de los genes SSU, tandem SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU y LSU) mediante el uso de los cebadores universales propuestos, observándose un margen de entre el 26 y 65% de éxito.

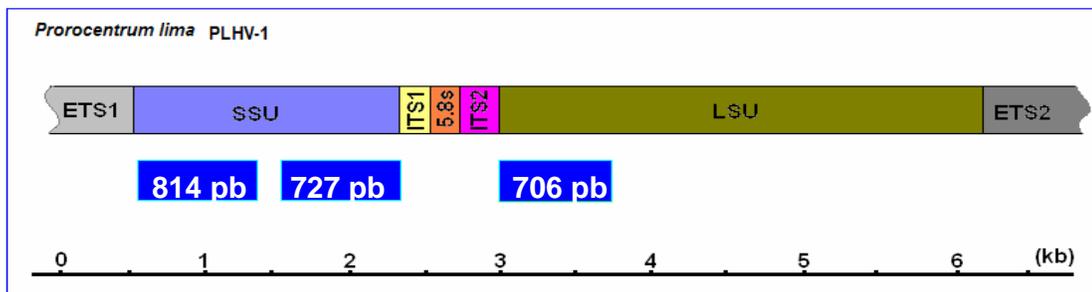
#### 6.3.2.1 *Prorocentrum lima* (PLPV-1)

Se obtuvieron 3 secuencias de dos de los genes ribosomales considerados, obteniendo un total de 2,247 pb (figura 20) que corresponden a

los fragmentos del SSU (814 y 727 pb, respectivamente) y LSU (706 pb), que en conjunto representan el 39.18% del ADNr blanco. En este caso se confirmó la especie, observándose un porcentaje > al 84 % para la especie homóloga en la base de datos (AB189778 para SSU y DQ336186 para LSU), entre otras especies del mismo género (anexo 3).

En la tabla XVI, pueden observarse algunos de los registros existentes en las bases de datos para la especie, correspondiendo, en su mayoría, a los fragmentos del ITSs y 5.8S, no mayores a 634 pb. Para la región de los ITS y gen 5.8S del ARNr, se encuentran registradas 31 secuencias de entre 621-634 pb, y para el SSU hay 12 registros de los que 8 son registros completos.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
P. lima	PLPV-1	SSU	1,800	I	4	PL SSU SSU 1528R	802	-
		LSU	720	IV	5	PL D1D2 LSU DIR F	669	+
			720	IV	7	PL D1D2 LSUD2CR	673	-



**Figura 20.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos de ADNr de *P. lima* (PLHV-1).

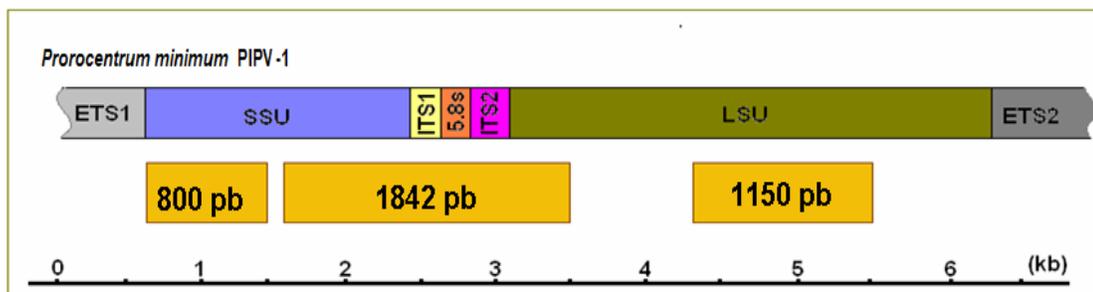
### 6.3.2.2 *Prorocentrum minimum* (PIPV-1)

Se obtuvieron 6 secuencias de los tres genes ribosomales considerados, con un total de 3,792 pb (figura 21) que corresponden a los fragmentos del SSU (800 pb) SSU-ITSs-LSU (1,842 pb) y LSU (1,150 pb) en conjunto representan el 66.15% del ADNr blanco. Como se muestra en el anexo 3, se confirmó la especie observándose el mayor porcentaje de identidad (97%)

para la especie homóloga (para SSU DQ336072, para SSU-ITSs-LSU DQ054538 y AY822610 LSU), entre otras especies del mismo género.

En la tabla XVII, pueden observarse los registros existentes en el GenBank para la especie, siendo en su mayoría de fragmentos del LSU  $\leq$  a 950 pb. Para la región de los ITS y gen 5.8S del ARNr, están registradas 8 secuencias de 639 pb, y para el SSU, hay 11 registros parciales. El reporte preexistente para la especie del LSU (AY863005) de los dominios D1 - D3 (950 pb, ubicadas en el primer cuarto del gen LSU), no incluye en la secuencia obtenida con la pareja de cebadores V que corresponde al tercer cuarto del LSU, por lo que los resultados de este estudio representan un nuevo registro para la especie. La secuencia de 1, 842 pb generada en este estudio, no solo incluye la región completa reportada por Hou *et al.* (2005) (PMDH01) de 668 pb, sino que además incluye un fragmento del SSU, ITSs 1 y 2, y el gen 5.8S, por lo que los registros generados en el presente estudio son más completos ya que las regiones secuenciadas están ancladas en los genes SSU y LSU.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
P. minimum	PIPV-1	SSU	1,130	III	1	PI ITS ITS 1400F	849	+
		LSU	1,130	III	6	PI ITS LSU DIC R	846	-
		SSU	1,800	I	3	PI SSU SSU 1F	798	+
			1,800	I	4	PI SSU SSU 1528R	855	-
		LSU	1,100	V	8	PI LSU 1239F	796	+
			1,110	V	9	PI LSU 2400R	768	-

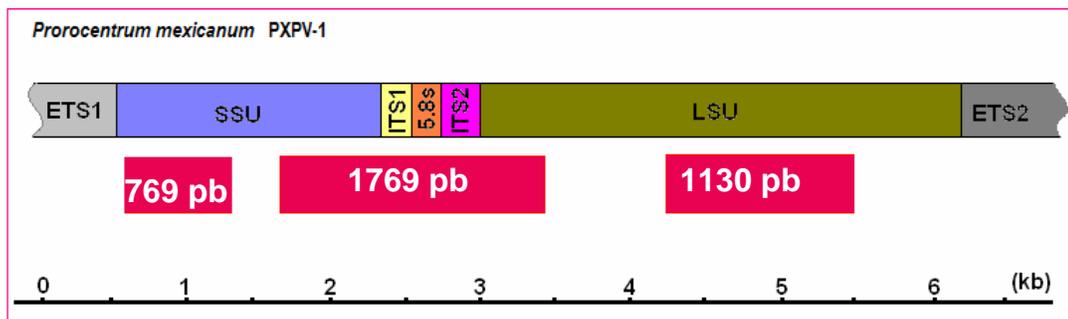


**Figura 21.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *P. minimum* (PIPV-1).

### 6.3.2.1 *Prorocentrum mexicanum* (PXPV-1)

Se obtuvieron 4 secuencias de los tres genes ribosomales considerados, con un total de 3,668 pb (figura 22) que corresponden a los fragmentos del tandem SSU-ITSs-LSU (1,055 pb) y LSU (1,130 pb), que en conjunto representan el 59.06% del ADNr blanco. Como se muestra en el anexo 3, se confirmó la especie observándose el mayor porcentaje de identidad (99%) con la especie homóloga (AY886763 para SSU-ITSs-LSU), entre otras especies del mismo género.

Sp.	C	Gen	Tamaño amplicón (pb)	Combinación	Oligo	Nombre de la secuencia	Tamaño secuencia (pb)	Orientación
P. mexicanum	PXPV-1	SSU-LSU	1,130	III	1	PX ITS ITS 1400F	853	+
		LSU	1,130	III	6	PX ITS LSU DIC R	846	-
		LSU	1,100	V	8	PX LSU 1239F	846	+
			1,100	V	9	PX LSU 2400R	832	-



**Figura 22.** Concentrado de características de las secuencias y modelo gráfico de los fragmentos del ADNr de *P. mexicanum* (PXPV-1).

En la tabla XVIII, pueden observarse los 17 registros existentes en el GenBank para la especie, correspondiendo en su mayoría a fragmentos del LSU y SSU,  $\leq$  a 1,384 y 1,790 pb, respectivamente. Para la región de los ITS y gen 5.8S del ARNr, únicamente esta registrada una secuencia (565 pb), mientras que para el SSU hay 8 registros parciales. El reporte preexistente en el GenBank para la especie (DQ336183) corresponde al LSU, en particular a la región D1 - D4 (1,384 pb), no incluye totalmente la secuencia obtenida con la pareja de cebadores V, que corresponde específicamente al tercer cuarto del LSU, por lo

que es un nuevo registro para la especie. La secuencia de 1, 769 pb generada en este estudio, no solo incluye la región completa reportada por Dang *et. al.*, (2005) (AY886763) de 565 pb, sino que además, incluye un fragmento del SSU, ITSs 1 y 2 y el gen 5.8S y LSU, resultando entonces que los registros generados en el presente estudio son más completos ya que los fragmentos secuenciados están anclados en los genes SSU y LSU.

#### **6.4 Variabilidad intraespecífica**

Para determinar la variabilidad intraespecífica de las secuencias obtenidas y para identificar si los registros son nuevos para la especie y/o cepa se realizaron análisis de alineamiento por especie y por región del ARNr con la mayoría de las secuencias reportadas en el GenBank (datos no mostrados). El análisis de las secuencias permitió distinguir el porcentaje de homología y tipo de modificaciones (sustituciones, mutaciones) que fueron clasificadas en: inserciones, deleciones, transversiones y transiciones. En general, el tipo de modificaciones presentes corresponden principalmente a transversiones (tabla XIX).

**Tabla XVI.** Secuencias de nucleótidos de *P. lima* (tax ID:39448) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
USMA-4.	AB189780	SSU	1,749	ADN	02/12/2005
CCMP684	AB189779	SSU	1,749	ADN	02/12/2005
CRLMN-6.	AB189778	SSU	1,746	ADN	02/12/2005
USSP-F8	AB189777	SSU	1,746	ADN	02/12/2005
PPL2-4	AB189776	SSU	1,746	ADN	02/12/2005
OAK-TO-PL	AB189775	SSU	1,746	ADN	02/12/2005
CIBNOR PRL1	EF517266	SSU	630	ADN	31/03/2008
NM	Y16235	SSU	1,786	ADN	09/02/1999
PL7V	EF517265	SSU	576	ADN	31/03/2008
NR	EF025381	SSU parcial	1,761	ADN	21/11/2006
ccmp1966	EF377326	SSU parcial	1,705	ADN	20/11/2007
PLMK_02	AJ567459	SSU, parcial	878	ADN	20/06/2005
PLMA_01	AJ567458	SSU, parcial	878	ADN	20/06/2005
PLRN_02.	AJ567457	SSU, parcial	878	ADN	20/06/2005
PLLS01	AY259170	SSU, parcial	627	ADN	01/04/2004
4V	EU244474	SSU , ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	603	ADN	18/11/2007
95-INDO-PLIMA.	AB189772	ITS1, 5.8S, ITS2	622	ADN	02/12/2005
AK9001	AB189771	ITS1, 5.8S, ITS2	623	ADN	02/12/2005
PDIO-3	AB189770	ITS1, 5.8S, ITS2	622	ADN	02/12/2005
PPL2-4	AB189769	ITS1, 5.8S, ITS2	622	ADN	02/12/2005
OAK-TO-PL	AB189768	ITS1, 5.8S, ITS2	622	ADN	02/12/2005
CCMP1743	AB189767	ITS1, 5.8S, ITS2	634	ADN	02/12/2005
CCMP686	AB189766	ITS1, 5.8S, ITS2	634	ADN	02/12/2005
USMA-1	AB189762	ITS1, 5.8S, ITS2	634	ADN	02/12/2005
USSP-S15.	AB189753	ITS1, 5.8S, ITS2	621	ADN	02/12/2005
CRLMN-7	AB189745	ITS1, 5.8S, ITS2	621	ADN	02/12/2005
DNS-7	DQ336195	LSU parcial	1,390	ADN	30/07/2007
S4	DQ336193	LSU parcial	1,395	ADN	30/07/2007
PI7V	L38635	LSU, parcial	324	ADN	21/11/1995
PI7V	L38634	LSU, parcial	646	ADN	21/11/1995
Sorrento 1	DQ336189	LSU parcial	1,442	ADN	30/07/2007
PL1-11	DQ336188	LSU parcial	1,389	ADN	30/07/2007
strain DNS-3	DQ336187	LSU parcial	1,344	ADN	30/07/2007
SM24	DQ336182	LSU parcial	1,442	ADN	30/07/2007
CCMP1368	EU165317	LSU parcial	597	ADN	30/09/2008
FIUPL	EU165316	LSU parcial,	677	ADN	30/09/2008
NMN07	EF566748	LSU	1,344	ADN	01/05/2008
CIBNOR-PRL1	EF517252	LSU parcial	535	ADN	31/03/2008

**Tabla XVII.** Secuencias de nucleótidos de *P. minimum* (tax ID:39449) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
isolate 2	AY803741	SSU	1,782	ADN	24/03/2008
isolate 1	AY803740	SSU	1,782	ADN	24/03/2008
PmiPrMu21	AY421791	SSU	1,789	ADN	15/03/2007
ND	EF017804	SSU	1,,790	ADN	31/10/2006
PMDH01	DQ028763	SSU	1,796	ADN	25/05/2005
ND	AJ415520	SSU	1,755	ADN	04/12/2003
PmS1	Y16238	SSU	1,789	ADN	09/02/1999
PTPM	DQ336069	SSU, parcial	1,753	ADN	01/06/2006
JA9801	DQ336063	SSU, parcial	1,753	ADN	01/06/2006
CCMP1329	DQ336060	SSU, parcial	1,753	ADN	01/06/2006
ccmp696	DQ336072	SSU, parcial	1,753	ADN	01/06/2006
AND3V	EU244473	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	619	ADN	18/11/2007
VGO365	EU244472	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	619	ADN	18/11/2007
ND	DQ662403	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	613	ADN	10/07/2006
ND	EF579797	ITS1, 5.8S, ITS2	555	ADN	27/03/2007
PMDH01	DQ054538	SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, LSU, parcial	668	ADN	25/05/2005
PmiITSC4	AF352371	ITS1, 5.8S, ITS2, LSU parcial	639	ADN	12/04/2002
PmiITSC2_8_9	AF352370	ITS1, 5.8S, ITS2, LSU parcial	639	ADN	12/04/2002
ND	AF208244	ITS1, 5.8S, ITS2, LSU parcial	554	ADN	27/12/2000
CCMP695	EU165320	LSU	693	ADN	30/09/2008
CCMMP2812	EU165280	LSU, parcial	689	ADN	30/09/2008
3V	EF517247	LSU, parcial	672	ADN	31/03/2008
Pmin2	AY863005	LSU, parcial	950	ADN	18/01/2006
Pmin1	AY863004	LSU, parcial	950	ADN	18/01/2006
PMDH01	DQ054539	LSU, parcial	871	ADN	25/05/2005
ND	DQ662402	LSU, parcial	688	ADN	10/07/2006
Pmin1	L38637	LSU, parcial	330	ADN	21/11/1995
Pmin1	L38636	LSU, parcial	662	ADN	21/11/1995
ND	AF042813	LSU, parcial	712	ADN	01/02/1998

**Tabla XVIII.** Secuencias de nucleótidos de *P. mexicanum* (tax ID: 7267) registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Cepa	No. de acceso	Gen	Longitud (pb)	Tipo de material	Fecha*
PMOO04	Y16232	SSU	1,790	ADN	09/02/1999
USFDA	EF492510	SSU	1,790	ADN	31/03/2008
UAMI-PCMX	EF517275	SSU, parcial	635	ADN	31/03/2008
VGO680	EF517274	SSU, parcial	633	ADN	31/03/2008
UAMI-91L	EF517273	SSU, parcial	631	ADN	31/03/2008
UAMI-31L	EF517272	SSU, parcial	636	ADN	31/03/2008
UAMI-24A	EF517271	SSU, parcial	516	ADN	31/03/2008
sp3	DQ174089	SSU, parcial	1,037	ADN	11/09/2005
ND	AY886763	ITS1, 5.8S, ITS2, parcial	565	ADN	07/02/2005
UAMI-91L	EF517258	LSU, parcial	523	ADN	31/03/2008
JL35	AF260378	LSU, parcial	958	ADN	27/09/2002
CCMP687	DQ336183	LSU, parcial	1,384	ADN	19/05/2007
PMeRN_01	AJ567468	LSU, parcial	894	ADN	20/06/2005
CCMP687	EU165318	LSU, parcial	634	ADN	30/09/2008
VGO680	EF517261	LSU, parcial	499	ADN	31/03/2008
UAMI-PCMX	EF517260	LSU, parcial	563	ADN	31/03/2008
UAMI-24A	EF517259	LSU, parcial	505	ADN	31/03/2008

**Tabla XIX.** Resumen de modificaciones nucleotídicas observadas en las secuencias obtenidas, por especie y/o cepa, en comparación con las secuencias homólogas del GenBank.

Especie	Cepa	Región	Homología	Inserción	Delección	Transición	Transversión
<i>A. sanguinea</i>	ASCV-1	LSU <sub>2</sub>	96.99	10	0	21	29
<i>C. polykrikoides</i>	CPPV-1	SSU <sub>1</sub>	98.3	4	4	9	8
		ITS	80.37	16	3	52	67
		LSU <sub>1</sub>	93	18	7	42	38
		LSU <sub>2</sub>	97.35	0	6	9	17
<i>G. catenatum</i>	GCCV-1	SSU <sub>2</sub>	98.71	3	1	13	14
		ITS	90.08	SD			
	GCMV-1	LSU <sub>1</sub>	74.34	SD			
		SSU <sub>1</sub>	92.02	5	6	49	81
		ITS	90.08	0	0	1	1
<i>A. affine</i>	AACQ-1	ITS	87.66	41	50	64	81
		LSU <sub>1</sub>	84.02	0	1	27	18
<i>A. margalefii</i>	AMCQ-1	SSU <sub>1</sub>	77.58	7	2	57	91
		SSU <sub>2</sub>	93.53	0	0	2	4
		ITS	98.02	6	0	5	4
		LSU <sub>1</sub>	86.88	SD			
		LSU <sub>2</sub>	NR				
<i>G. spinifera</i>	GSCQ-1	SSU <sub>1</sub>	82.5	10	10	26	56
		SSU <sub>2</sub>	89.11	1	2	13	15
		ITS	50.1	19	0	94	152
		LSU <sub>1</sub>	83.16	5	2	90	100
<i>L. polyedrum</i>	LPCQ-1	SSU <sub>1</sub>	98.87	1	0	11	10
		SSU <sub>2</sub>	99.47	0	1	6	6
		ITS	93.87	0	4	57	26
		LSU <sub>1</sub>	95.92	0	0	19	7
		LSU <sub>2</sub>	98.12	0	2	16	5
<i>P. lima</i>	PLHV	SSU <sub>1</sub>	34.6	13	8	120	218
		SSU <sub>2</sub>	33.41	9	6	73	89
		LSU <sub>1</sub>	90.31	1	0	10	2
<i>P. minimum</i>	PIPV-1	SSU <sub>1</sub>	95.78	4	0	28	88
		SSU <sub>2</sub>	97.2	0	1	10	20
		ITS	91.56	0	0	3	0
		LSU <sub>2</sub>	NR				
<i>P. mexicanum</i>	PXPV-1	SSU <sub>1</sub>	72.15	13	11	66	127
		SSU <sub>2</sub>	71.69	6	10	91	159
		ITS	100	SD			
		LSU	99.22	0	1	0	0

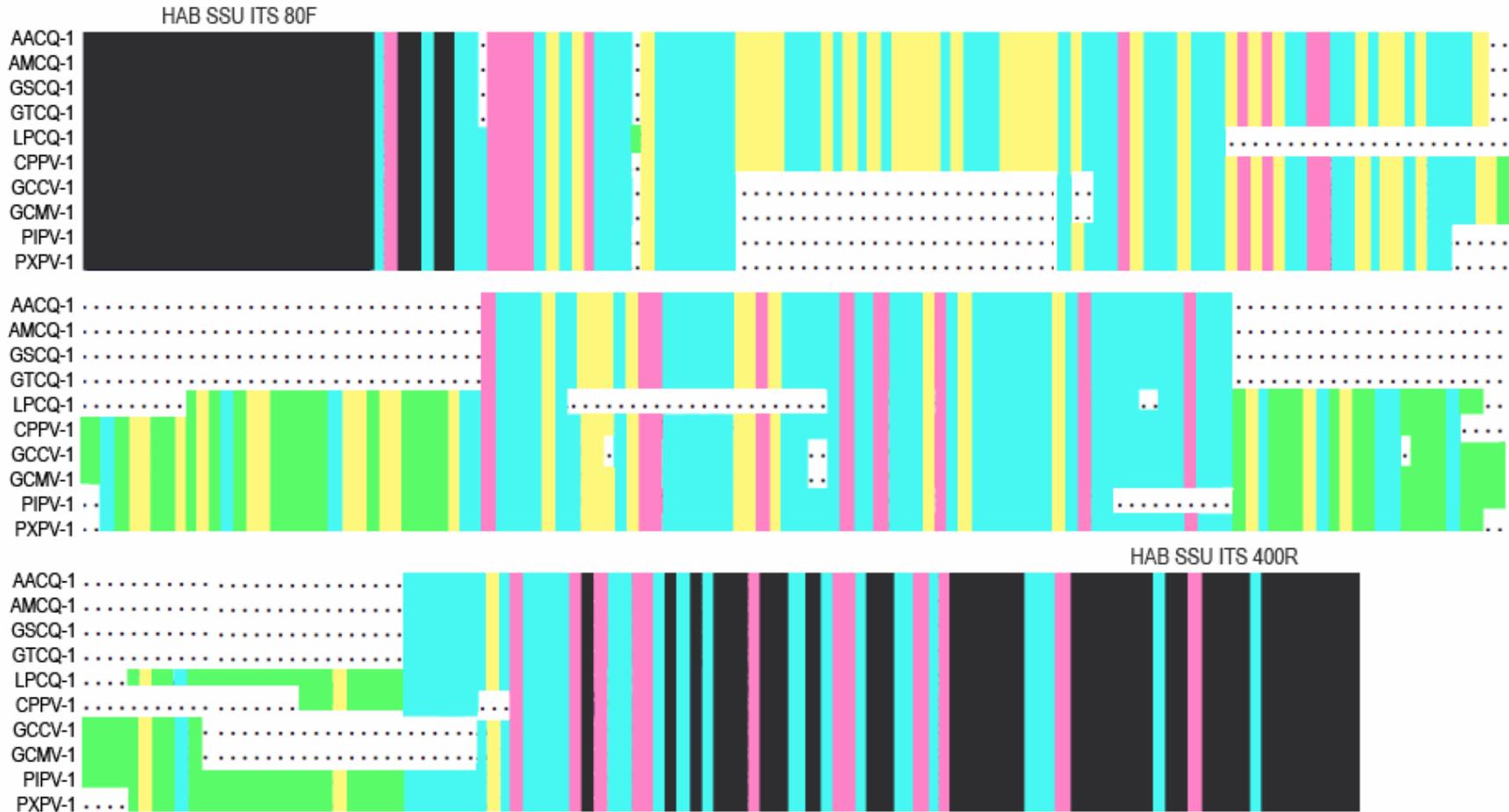
Notas: LSU<sub>1</sub>, primer cuarto del LSU; LSU<sub>2</sub>, tercer cuarto del LSU. SSU<sub>1</sub>, primera parte; SSU<sub>2</sub>, segunda parte del SSU. SD: No hay diferencias. NR: nuevo registro.

## 6.5 Diseño de cebadores.

Se hizo un análisis de alineamiento comparando, en forma independiente, las secuencias para las diferentes especies que corresponden a un mismo juego de cebadores. Esto, con la finalidad de identificar regiones conservadas y/o polimórficas, que son ideales para el diseño de los cebadores a emplear en los formatos de sondas de hibridación y SSCP, respectivamente. Para el diseño de cebadores aplicables a la generación de sondas de hibridación, se emplearon las secuencias consenso de la pareja de cebadores III y con las secuencias obtenidas con el cebador 3 (figuras 23 y 24), ya que pueden identificarse claramente regiones conservadas (bloques negros) flanqueando regiones polimórficas (bloques en color). Para el diseño de cebadores aplicables para análisis SSCP, se consideraron las secuencias obtenidas con el cebador 8 (figura 26), obteniendo un 84.13% de similitud. Las combinaciones de cebadores diseñados (de acuerdo al formato y a la región) se presentan en la tabla XX.

**Tabla XX.** Listado de cebadores diseñados para generación de sondas de hibridación y análisis SSCP.

Formato	Región	Cebador	Secuencia	Longitud (bases)	Tamaño (pb)	Tm (°C)
Sonda	SSU	HAB SSU 130F	5'- GIAATTCTAGAGCTAATACATG-3'	22	294	60
		HAB SSU 420R	5'- AGGATTGGGTAATTTGCGCG -3'	20		
	SSU ITS	HAB ITS 80F	5'- GTGAACCTGCGGAAGGATC-3'	19	312	60
		HAB ITS 400R	5'- CACAATGCWTATCGCAYTTTCG-3'	21		
		HAB ITS 400F	5'- CGAARTGCGATAWGCATTGTG-3'	21		
	HAB ITS 780R	5'-GCTGAATTTAAGCATATAAGTAAG-3'	24	367	62	
SSCP	LSU	HAB LSU 79F	5'-CCSAAAATGGATGGCGCT-3'	18	138	55
		HAB LSU 217R	5'-TACTACCACCAAGATSTGC-3'	19		
		HAB LSU 450F	5'-GGKAARCKTTGTCTTTYCT-3'	19	180	54
		HAB LSU 630R	5'-GGCTGCTAAC CTTGGAG-3'	17		



**Figura 23.** Representación gráfica del análisis de alineamiento de la secuencia consenso del extremo 5' de los amplicones de tipo III (cebador 1, HAB ITS SSU 1F y cebador 6, HAB LSU 1R). Las etiquetas HAB ITS SSU 80F, HAB ITS 400 F y R, HAB ITS SSU 780R) denotan la identidad del fragmento y la posición relativa de cada uno de los cebadores diseñados. El código de colores representa el porcentaje de homología: negro, 100%; rosa, 75%; azul, 50%; amarillo, 25%; verde, 0%. Las zonas punteadas indican la inserción de bases.

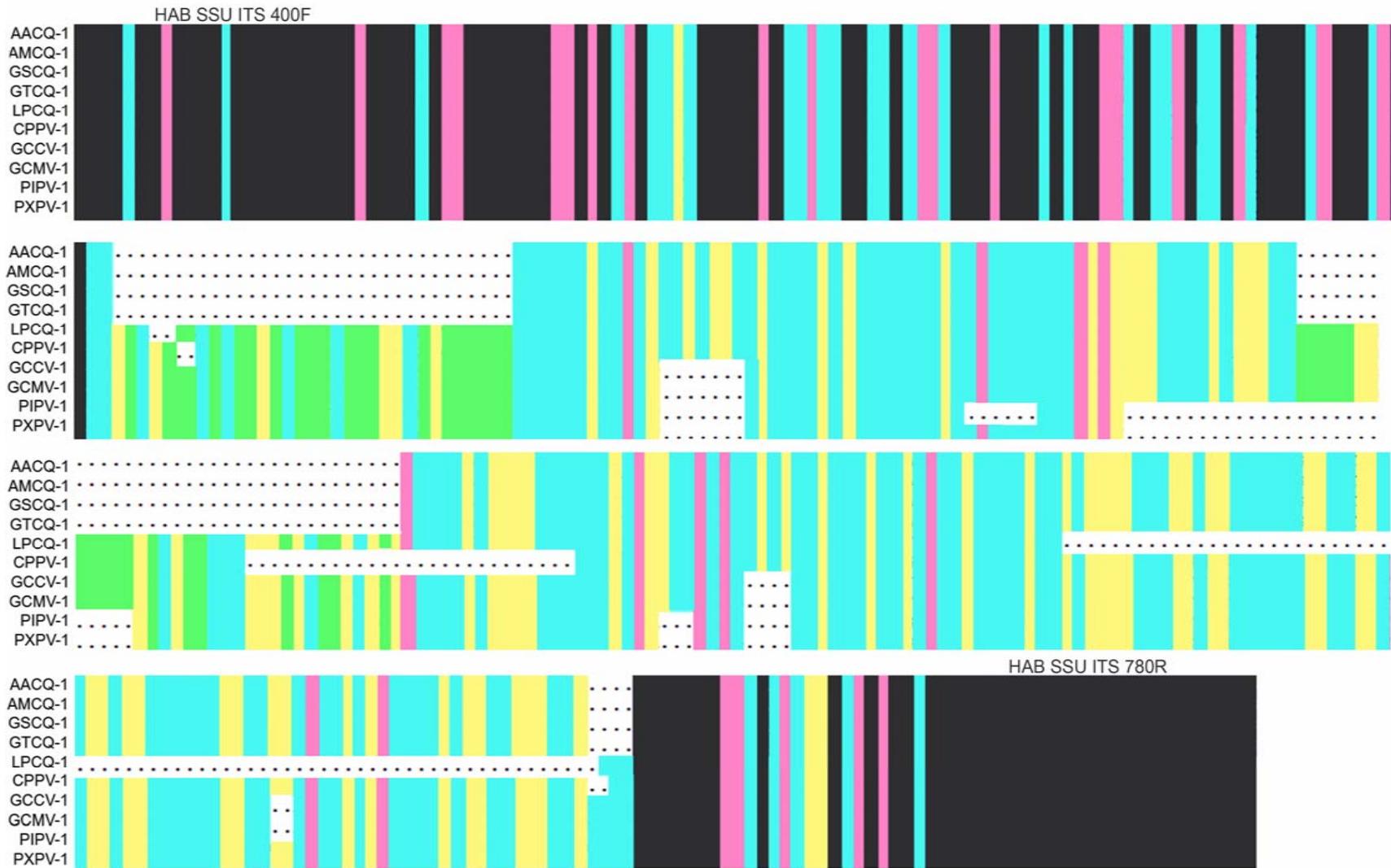
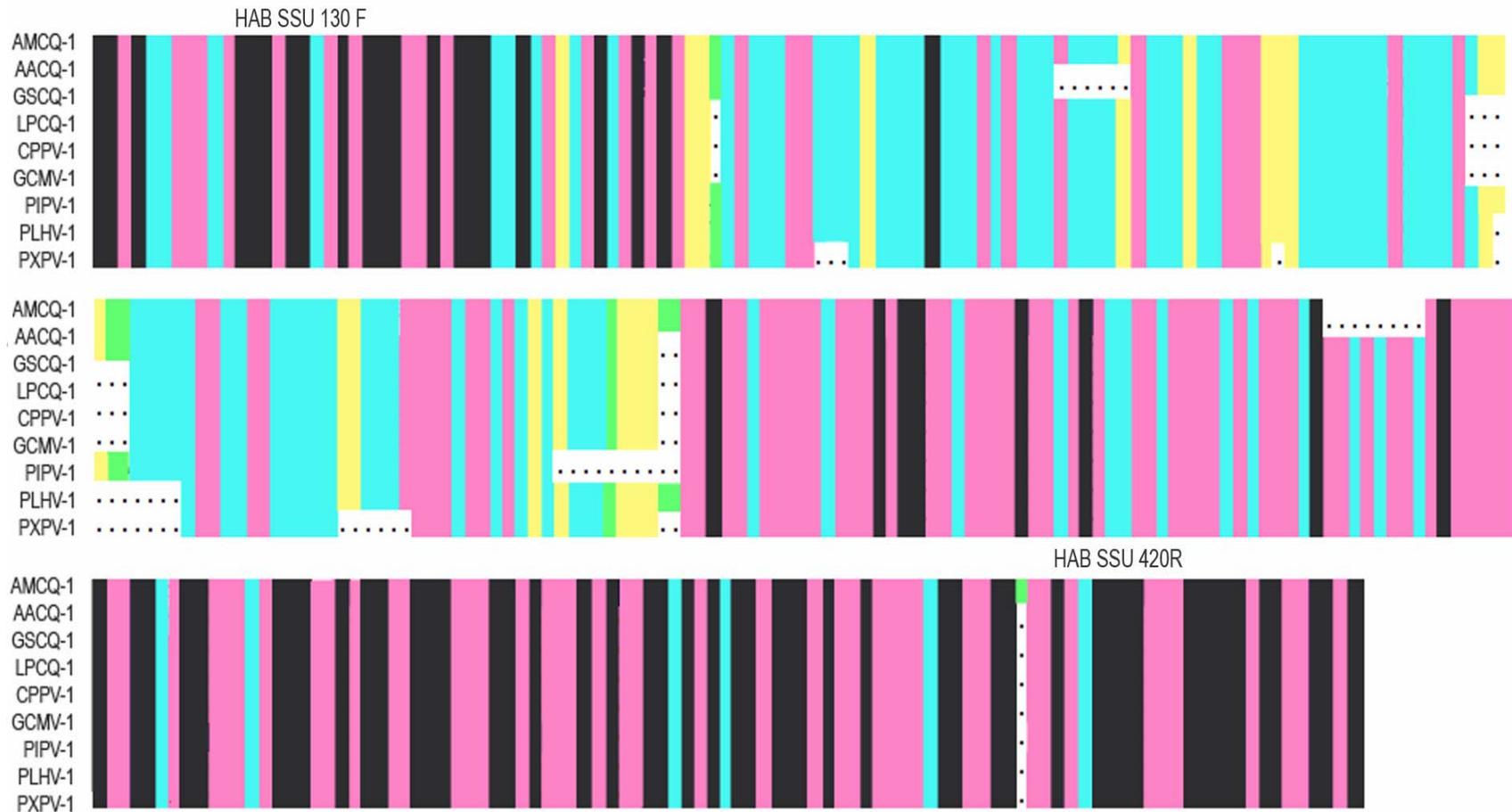
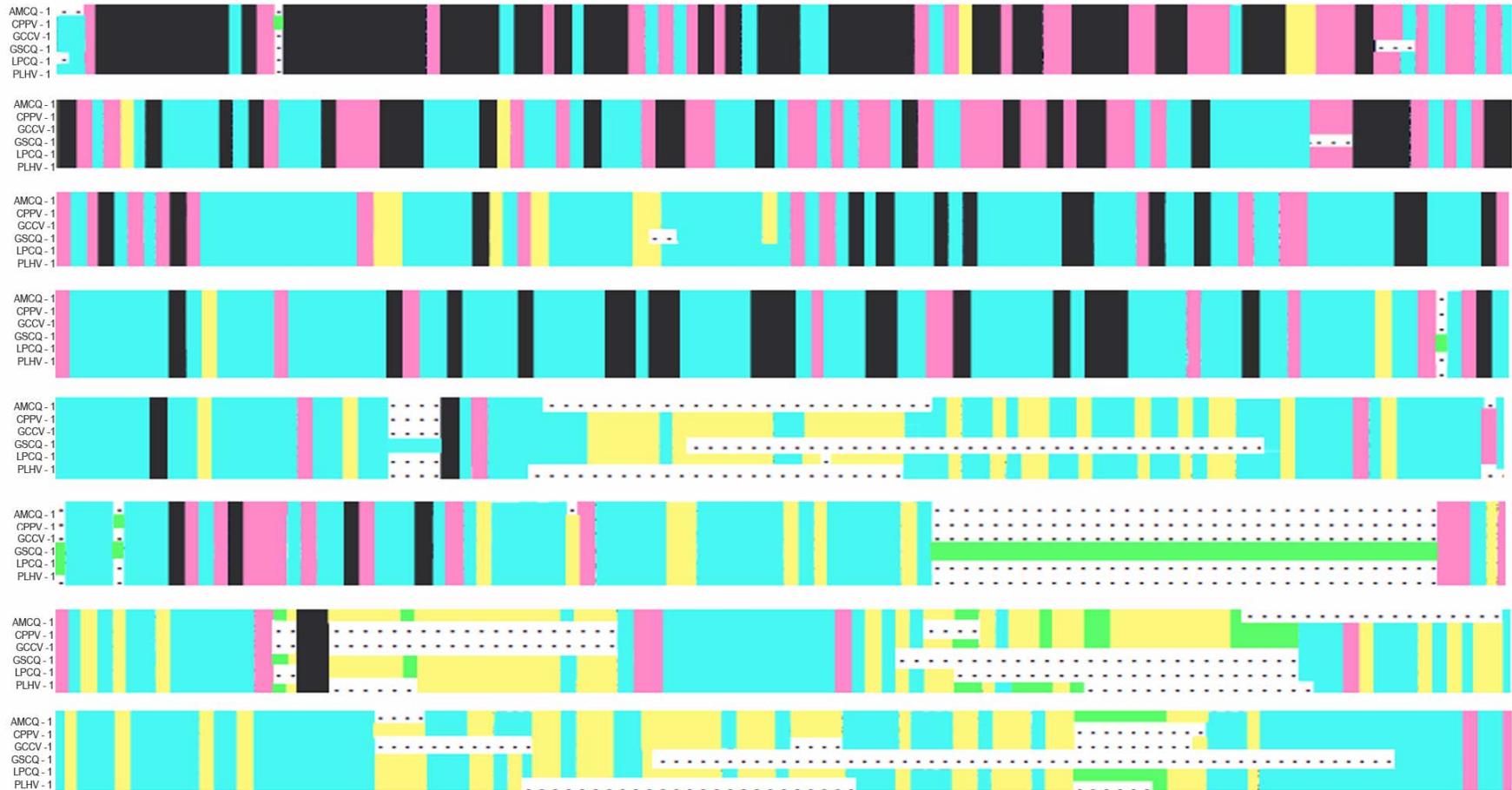


Figura 23. Continuación.



**Figura 24.** Representación gráfica del análisis de alineamiento del extremo 5' de los amplicones de tipo I (cebador 3, HAB SSU 1F). Las etiquetas (HAB SSU 130F y HAB SSU 420R) denotan la identidad del gen y la posición relativa de cada uno de los cebadores diseñados. El código de colores representa el porcentaje de homología: negro, 100%; rosa, 75%; azul, 50%; amarillo, 25%; verde, 0%. Las zonas punteadas indican la inserción de bases.



**Figura 25.** Representación gráfica del análisis de alineamiento de la secuencia consenso del extremo 5' de los amplicones de tipo IV (cebador 5, HAB LSU 1F y 7 HAB LSU 2R). El código de colores representa el porcentaje de homología: negro, 100%; rosa, 75%; azul, 50%; amarillo, 25%; verde, 0%. Las zonas punteadas indican la inserción de bases.

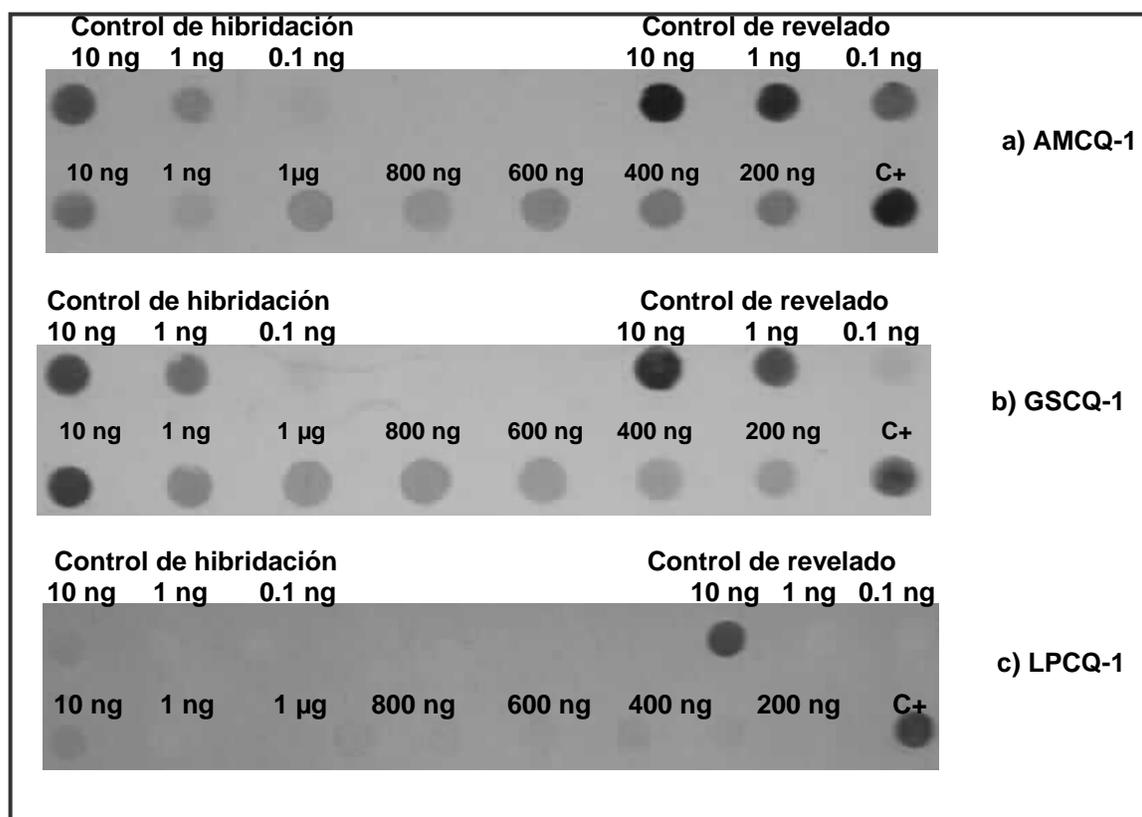


**Figura 26.** Representación gráfica del análisis de alineamiento del extremo 5' del amplicón de tipo V (cebador 8, HAB LSU 2F). Las etiquetas (HAB LSU 79F y HABLSU 217R) denotan la identidad del gen y la posición relativa de cada uno de los cebadores diseñados. El código de colores representa el porcentaje de homología: negro, 100%; rosa, 75%; azul, 50%; amarillo, 25%; verde, 0%. Las zonas nunteadas indican la inserción de bases.

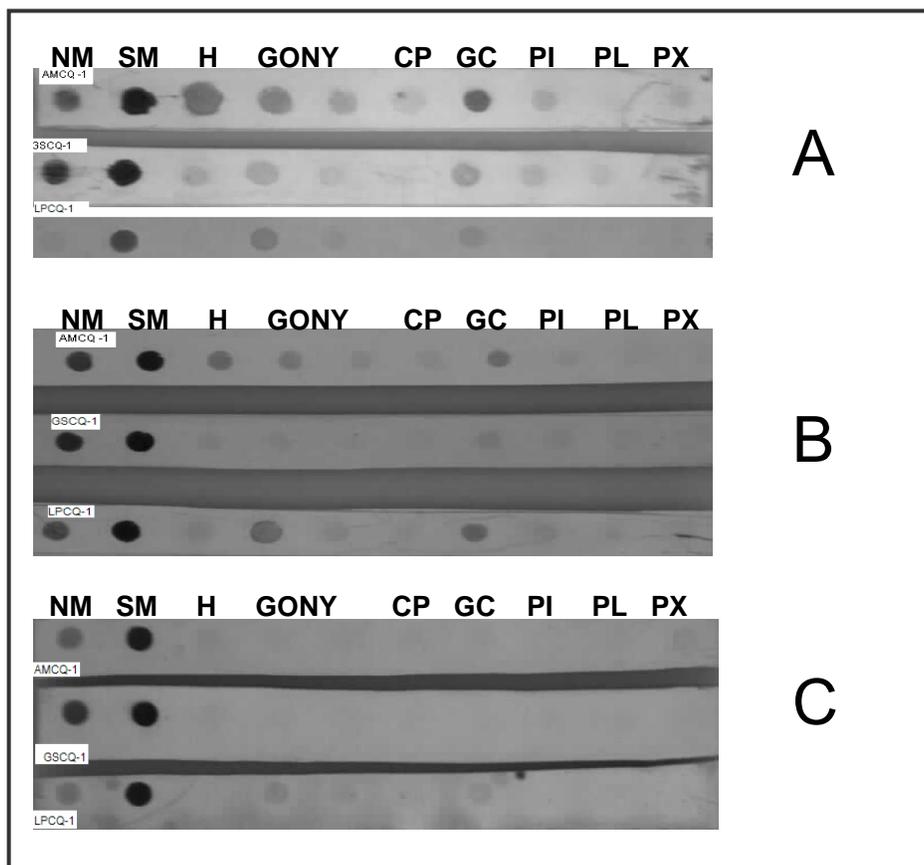
## 6.6 Pruebas de Hibridación

Con base en los análisis de alineamiento de las secuencias consenso de los amplicones del tipo IV, se realizaron pruebas preliminares para estandarizar las condiciones de hibridación (en formato de Dot-blot) de ADN total de: *A. margaleffi*, *G. spinifera* y *L. polyedrum*.

Se determinó la sensibilidad de la sonda (10 ng/ $\mu$ L) así como el límite de detección de ADN (500 ng/ $\mu$ L); estos resultados se muestran en la figura 27. Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas de hibridación cruzada para determinar la especificidad de las sondas, probado diferentes temperaturas, para hacer más astringente la reacción de hibridación y minimizar, de esta forma, problemas de reconocimiento inespecífico ADN-sonda (figura 28).



**Figura 27.** Pruebas preliminares de sensibilidad y de límite de detección de ADN total no marcado de: a) *A. margaleffi*; b) *G. spinifera*; c) *L. polyedrum*.



**Figura 28.** Pruebas preliminares de hibridación cruzada a diferentes temperaturas. Paneles: A, 40°C; B, 50 °C; C, 55°C. AMCQ-1, *A. margaleffi*; GSCQ-1, *G. spinifera*; LPCQ-1, *L. polyedrum*. H, especie homóloga; GONY, *Gonyaulax*; CP, *C. polyedrum*; GC, *G. catenatum*; *P. minimum*; PL, *P. lima*; y PX, *P. mexicanum*. Concentración de ADN por pozo = 500 ng.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención de ADN

Un cultivo puro es aquel en el cual los microorganismos provienen de una misma célula y, por tanto, se encuentran libres de contaminantes (organismos ajenos al cultivo), por lo que se espera que las células que conforman el cultivo puro compartan las mismas características morfológicas, fisiológicas y genéticas; este último punto es de vital importancia para la estandarización y desarrollo de métodos moleculares. Adicionalmente, los cultivos puros proporcionan la ventaja de disponer de un número ilimitado de células y en la fase de crecimiento deseada y que no hayan sufrido ningún tipo de tratamiento de congelación que podría dañar tanto la integridad celular como la de sus componentes más lábiles.

A partir de los cultivos puros, de las diferentes especies de dinoflagelados consideradas en este estudio, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico, observándose diferencias significativas en relación a la eficiencia de extracción, lo que se refleja en la concentración, integridad y pureza de las diferentes preparaciones de ADN genómico. Esta variabilidad se atribuye a que dentro de las especies consideradas en este estudio están representadas tanto formas tecadas (AMCQ, LPCQ, GSCQ, PIPV, PXPV y PLHV) como atecadas (GCCV, GCMV y CPPV); el tamaño y morfología de las especies también es diverso. Algunas, como *A. margalefii* (AMCQ) generan mucílago, y estas características afectan la disrupción celular que es una de las más importantes para la obtención del ADN en cantidad y calidad óptima. Además, en diferentes especies el número de mitocondrias por célula puede variar desde 200 a 1200, afectando así la cantidad total de ADN blanco presente (y recuperable) en cada una de ellas.

Es oportuno mencionar que para lograr los resultados mostrados en la figura 10 (ADN de calidad y en cantidad suficiente para usarse como templado en

reacciones de amplificación específica por PCR) el número mínimo de células debe ser de 5,000 céls./mL. Si este no se cumple, la calidad y cantidad del ADN extraído es pobre, lo que dificulta el óptimo desarrollo de las etapas posteriores (PCR), ya que si el ADN se encuentra degradado, pequeños fragmentos de ADN pueden actuar como cebadores aleatorios uniéndose en diferentes partes del genoma generando, de esta forma, fragmentos inespecíficos o productos parciales o incompletos (Hills *et al*, 1996).

## 7.2 Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite amplificar selectivamente regiones específicas del ADN, llevando a cabo *in vitro* el proceso de replicación del material genético; para ello se requiere de varios elementos básicos: el ADN templado, cebadores (que flanquean la región de interés), dinucleótidos, enzima Taq polimerasa y buffers (que crean condiciones ideales para que la enzima trabaje). Este cóctel de moléculas, se somete a un programa para amplificación (en un termociclador ó máquina de PCR) que consiste básicamente de tres etapas: 1) desnaturalización del ADN, que pasa de estructura de doble cadena a hebra simple; 2) alineamiento, etapa en la que los cebadores reconocen las regiones homólogas y forman pequeños segmentos de doble hebra y 3) extensión o síntesis del fragmento de interés, en el que la Taq polimerasa reconoce las pequeñas estructuras de doble hebra y se acopla al complejo llevando a cabo su función de polimerización al agregar a la nueva cadena los dinucleótidos complementarios dictados por el ADN templado, de forma tal que en cada ciclo se obtienen exponencialmente copias exactas del fragmento de ADN de interés, permitiendo finalmente su posterior manipulación y caracterización.

Las aplicaciones de la PCR son ilimitadas, sin embargo, el uso más común es la obtención de la secuencia del templado de ADN de diferentes organismos.

Esto se debe a que las secuencias del ADN son la mejor forma de estimar variaciones genéticas en genes específicos del taxa examinado. Los dinoflagelados no son la excepción, ya que la PCR ha sido utilizada exitosamente para la amplificación de secuencias ribosomales de diferentes especies (Scholin y Anderson 1993; Adachi *et al* 1994; Heley *et al.*, 1999; Bowers *et al.*, 2000; Usup *et al.*, 2002; Edvarsen *et al.*, 2003, Savin *et al.*, 2004; Ki *et al.*, 2005 a y b; Bolch y Salas 2007; Yan *et al.*, 2007; Saker *et al.*, 2007).

El interés en la amplificación de secuencias ribosomales radica en que los genes del ADNr incluyen regiones variables (ITS, IGS, NTS) que acumulan mutaciones que no presentan un efecto letal en el organismo, generándose así regiones espaciadoras que evolucionan rápidamente. Al mismo tiempo, el ADNr cuenta con regiones altamente conservadas (genes 18S ó SSU, 5.8S y 28S ó LSU) lo que evita la construcción de ribosomas dañados o defectuosos que afectarían negativamente el proceso de síntesis de proteínas (Mindell y Honeycutt, 1990; Hwang y Kim 1999). Además, existen cientos de copias de estos genes en el genoma nuclear, y estos genes son casi igual de abundantes (en términos de número de copias) en el ADN mitocondrial y el ADN cloroplástico (Hills *et al.*, 1996).

Debido a que el objetivo principal de este trabajo fue identificar regiones conservadas y variables en el ADNr para el diseño de métodos moleculares útiles en la identificación de fitoplancton, fue necesario desarrollar un procedimiento para obtener secuencias nucleotídicas del ADNr a partir de distintas cepas de dinoflagelados de la región. Por lo tanto, la amplificación de los productos de PCR fue una etapa crucial en este estudio. Esta etapa generó resultados favorables gracias al uso de un templado de excelente calidad en combinación con un *mejorador* (enhancer en inglés) de la reacción de PCR. Se ha reportado que los mejoradores pueden afectar la amplificación en diferentes etapas y condiciones (Chakrabarti, 2004), por ejemplo, pueden incrementar o disminuir la estabilidad

térmica del ADN templado, tal es el caso del DMSO (reactivo utilizado en este estudio) el cual desestabiliza el apareamiento inespecífico de bases en la doble cadena de ADN (en solución), al modificar las condiciones de viscosidad de la reacción favoreciendo así la amplificación (Lee *et al.*, 1981).

Como se mencionó en la sección 6.2, se obtuvieron patrones de bandeo compuestos en las amplificaciones con las parejas de cebadores II y IV (figura 11, panel B). Es posible que estas regiones presenten una composición nucleotídica distinta a las demás especies, por lo que el alineamiento de los cebadores se vio comprometido. Para trabajos posteriores se recomendaría modificar las condiciones de amplificación, para tratar de solventar este problema.

### **7.3 Análisis de alineamiento**

Un paso fundamental para llevar a cabo un proceso de comparación de secuencias nucleotídicas es el alineamiento. Este, es el proceso mediante el que las secuencias son comparadas para buscar patrones de caracteres comunes y así establecer correspondencia residuo-residuo entre las secuencias relacionadas (Xion, 2006).

En este estudio, se realizó un análisis de alineamiento múltiple (AMS) entre las secuencias obtenidas de las diferentes especies (pertenecientes a tres géneros) con la finalidad de identificar regiones homólogas y variables (figuras 23 a 26) y que son elementos determinantes para un adecuado diseño de cebadores específicos. Para realizar los alineamientos se utilizó el programa DNAMAN que se basa en el algoritmo de Higgins y Sharp (1988) en el que se analiza la relación de las distintas secuencias por pares, para determinar cuales son las que están más estrechamente relacionadas; a partir de esto, se comienza a generar un alineamiento de las dos. En cada ronda sucesiva, se va añadiendo una secuencia más al alineamiento generando, ajustándola a la nueva secuencia. Para lograr

esto, se calcula una matriz de distancia que indica la divergencia entre cada par de secuencias; a partir de la matriz de distancias, se calcula un árbol guía y las secuencias se alinean progresivamente siguiendo el orden de las ramas del árbol. En general, los algoritmos utilizados para llevar a cabo el ASM crean correspondencia entre las secuencias, insertando huecos (que corresponden a inserciones o deleciones en una o más secuencias) con la finalidad de inferir la posición de las regiones homólogas ordenadas por columnas (Hills *et al.*, 1996; Wheeler, 2005; Xion, 2006), como se muestra en la tabla XIX.

#### **7.4 Diseño de cebadores**

Como se observa en la tabla XX, se diseñaron cebadores que amplificarán regiones no mayores a 400 pb, con la finalidad de obtener sondas altamente específicas que podrán marcarse con digoxigenina, mediante una reacción de PCR convencional, con la diferencia de que se utilizarán dUTP's marcados. Anderson *et al.* (2005) establece que la especificidad de la sonda depende principalmente de que la secuencia blanco sea única para el organismo en particular o, si es compartida, por el grupo de organismos. Al mismo tiempo, la especificidad depende, en gran medida, del número y afiliación taxonómica de las secuencias dadas de alta en las bases de datos, puesto que esta información funciona como referencia para definir que la secuencia que contiene la sonda diseñada se encuentra únicamente en el organismo(s) de interés. En este caso, se corroboró que las regiones seleccionadas para el diseño de cebadores para ambas aproximaciones (sondas de hibridación y SSCP) se anclan en regiones conservadas, lo que permitirá que se dirija exitosamente la síntesis del fragmento de ADN que presenta regiones internas altamente variables y útiles para discriminar entre una especie y otra; es decir, le conferirá una marca especie-específica. Para corroborar que las zonas flanqueadas por los cebadores son especie-específicas, se compararon las sondas teóricas (basadas en las

secuencias de nucleótidos obtenidas para cada especie mediante secuenciación directa de productos de PCR, figuras 12 a 22) con las secuencias de la base de datos del GenBank mediante el algoritmo de BLAST, obteniendo un reconocimiento intraespecífico del:

- 92.57% para *A. affine*
- 87.07% para *A. margaleffi*
- 99.67% para *C. polykrikoides*
- 99.07% para *G. catenatum*
- 87.43% para *G. spinifera*
- 98.91% para *L. polyedrum*
- 96.13% para *P. mexicanum*
- 96.07% para *P. minimum* y
- 86.07% para *P. lima*

Estos resultados se obtuvieron a partir del diseño llevado a cabo con el alineamiento de las secuencias generadas con el cebador 3 (tabla XVII).

La variabilidad detectada en los alineamientos (útil para el diseño de sondas) se debe principalmente a que la comparación taxonómica muestra que la secuencia de los genes de especies cercanamente relacionadas difieren entre si debido a mutaciones puntuales (tabla XIX). Mientras tanto, los genes de especies lejanamente relacionadas, difieren en un número mayor de cambios o mutaciones (Vandame, 2003). Este comportamiento concuerda con las características de los genes ribosomales establecidas en la sección 1.1.4.1.1, en donde se menciona, entre otros, la velocidad con la que evolucionan los genes ribosomales (SSU, LSU e ITS). El hecho de encontrar regiones conservadas en las secuencias de los genes ribosomales radica en su función intrínseca básica, que es ser el principal complejo molecular en el que se lleva a cabo la síntesis de proteínas a partir del ARN mensajero. La síntesis de proteínas es un proceso vital para la supervivencia de los organismos, ya que las proteínas sintetizadas en los ribosomas son el constituyente básico de un organismo. Por lo tanto, dada su función la mayor parte de las secuencias de los genes ribosomales resisten los cambios a través del

tiempo. Lo anterior soporta el diseño de cebadores realizado a partir del cebador 3 y la pareja de cebadores III; en donde estos se anclan a regiones conservadas flanqueando regiones hipervariables, ubicadas en el SSU e ITSs.

Aunque se ha mencionado anteriormente que la región del SSU evoluciona lentamente, en eucariotas las secuencias del ARNr presentan residuos adicionales que se encuentran insertados en sitios específicos solo detectables en la estructura secundaria del ARNr de procariotas, denominados segmentos en expansión (ESs); los ESs varían en tamaño y secuencia de especie a especie. Los ESs se categorizar en 12 diferentes segmentos (designados ES<sub>SSU</sub>1 al ES<sub>SSU</sub>12) en la subunidad pequeña del ARNr y 41 segmentos distintos (designados ES<sub>LSU</sub>1 al ES<sub>LSU</sub>41) para la subunidad grande. Debido a que los ESs se encuentran en regiones no conservadas del ARNr, se cree que las inserciones de los mismos no afectan la función fundamental del ARNr (Yokoyama y Suzuki, 2008). Esta característica en particular, presente en las secuencias del SSU, se aprovechó para hacer el diseño de cebadores, así como la disponibilidad de registros de secuencias nucleotídicas pre-existentes en el GenBank.

Es importante mencionar que las secuencias del SSU han sido utilizadas anteriormente para la identificación de especies (Scholin y Anderson, 1993; Walsh, 1998; Savin *et al.*, 2004; Ki *et. al.*, 2005 ay b; Yan *et al.*, 2007; Saker *et al.*, 2007), en especial en la región del SSU. En 1993, Scholin *et al.* encontraron la presencia de dos genes diferentes en *Alexandrium fundyense*, con los que se puede discriminar entre especies tóxicas y no tóxicas (usando la SSU).

En relación a los ITS, se conoce que divergen rápidamente, durante los procesos de especiación, y fungen como región espaciadora entre las SSU y LSU, por lo que es de esperarse que esta región acumule las mutaciones que ocurren en el ADNr, presentando así tamaños altamente variables (Litaker *et al.*, 2007). A partir del primer registro de ITSs, obtenido para el dinoflagelado *Prorocentrum*

*micans* a mediados de los 90's, estas secuencias se han utilizado para identificar varias especies formadoras del FAN (Adachi *et al.*, 1994, 1996a; Edvarsen *et al.*, 2003, Bolch y Salas, 2007; Litaker *et al.*, 2007). Sin embargo, alrededor de los miembros del género *Gonyaulax* empleados en este estudio presentaron el inconveniente de que es una región altamente conservada, obteniendo únicamente un 96% de similitud entre ellos. No obstante, se pueden utilizar como prueba preliminar para inferir que se trata de una de estas especies y discriminar entre ellas con una segunda hibridación empleando la sonda obtenida para primer fragmento del SSU; sin embargo, para las especies restantes estas regiones siguen siendo excelentes candidatos.

Por otro lado, respecto a los cebadores útiles para llevar a cabo la técnica de SSCP, se diseñaron aquellos que amplificarán fragmentos no mayores a 200 pb (tabla XX), ya que es bien conocido que existe una relación directa e inversa entre la sensibilidad y el tamaño de los fragmentos a analizar. Además, es deseable que los cebadores tengan el mismo contenido de GC y la misma temperatura de fusión ( $T_m$ ), así como evitar estructuras secundarias como las horquillas y/o asas generadas por auto-alineamiento entre los cebadores (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

Para llevar a cabo este diseño, se utilizó el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con la pareja de cebadores V (figura 7), el cual amplifica el tercer cuarto del LSU, debido a que las secuencias obtenidas de esta región presentan una similitud del 84.17%. Es decir, es una región muy conservada entre especies de diferentes géneros, pero que contiene modificaciones puntuales que pueden ser resueltas mediante SSCP, ya que esta técnica puede detectar cambios en la conformación generadas por una sola base. La técnica se basa en el hecho de que los cambios conformacionales que ocasiona la variación de un solo nucleótido en la secuencia altera el plegamiento de una cadena sencilla de ADN, que por consiguiente cambia su movilidad. En sus inicios, la técnica de

SSCP había sido usada para identificar alteraciones debidas a la presencia de tumores, mutaciones puntuales en varias posiciones del fragmento discreto de ADN, que son causantes de algunas enfermedades genéticas humanas (Orita *et al.*, 1989). Recientemente, este método ha sido utilizado para el análisis de comunidades de microbianas en suelos (Schwieger y Tebbe, 1998; Schmalenberger *et al.* 2001; Rehbein, 2005).

Para el diseño de cebadores se descartaron aquellas secuencias generadas a partir de la pareja de cebadores IV (figura 7), ya que el alineamiento de estas secuencias arrojó un 57.39 % de similitud. No fue posible detectar zonas conservadas que flanquearan regiones hipervariables, ya que la variación estaba dispersa en la longitud de las secuencias (figura 25). Además, estas secuencias presentaban diferentes tamaños y una alta ambigüedad, lo que puede atribuirse a que la subunidad mayor es mucho mas grande y muestra un mayor grado de evolución en sus diferentes segmentos en expansión (41 ES), lo que fue evidente al alinear las especies de diferentes géneros. Es importante hacer énfasis en la identificación de secuencias específicas para *G. spinifera*, ya que para esta especie este fragmento podría sintetizarse y utilizarse como una sonda de alta especificidad por si misma.

En este trabajo, para llevar a cabo el diseño de cebadores se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) *Longitud de los cebadores*, ya que este parámetro afectará el éxito de la PCR, influenciando la especificidad, Tm y tiempo de alineamiento. La longitud recomendable para un cebador es de 18 a 30 nucleótidos, ya que cebadores más pequeños podrían permitir la amplificación inespecífica, mientras que cebadores más largos son más específicos pero tienen una mayor probabilidad de generar estructuras secundarias como orquillas y asas.

2) *Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)*, la especificidad de la PCR depende principalmente de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los cebadores. Para la mayoría de las aplicaciones, la T<sub>m</sub> óptima esta entre de 55 °C a 60 °C. Es importante considerar que los cebadores utilizados en una reacción de PCR presenten temperaturas de fusión similares, ya que esto mejorará la eficiencia de amplificación. Además, si la T<sub>m</sub> es la misma para todas las parejas de cebadores, por practicidad se pueden realizar amplificaciones simultaneas en una misma corrida de PCR, por lo anterior, la T<sub>m</sub> de los cebadores diseñados se estableció en 60° C.

3) *Extremos G-C*, cada cebador diseñado presenta en el inicio 5' y en el extremo terminal 3' un nucleótido de G o C para incrementar la eficiencia de alineamiento, ya que esto ayuda a asegurar la adecuada unión de un cebador dada la fuerza de los puentes de hidrógeno de los residuos G ó C.

4) *Verificación de la secuencia*, esto con la finalidad de evitar falso reconocimiento del cebador en el ADN templado; esto se llevó a cabo haciendo una búsqueda en Blast.

5) *Evitar formación de estructuras secundarias*, ya que si el cebador hibridiza sobre sí mismos y si los cebadores de una misma reacción hibridizan entre ellos se forman estructuras secundarias como asas y orquillas lo cual genera deficiencias en la obtención de los productos esperados de la PCR (Hills, *et al.* 1996; Dieffenbach y Dveksler, 2003).

## 7.5 Variabilidad intraespecífica

El grado de conservación de las secuencias en un alineamiento revela su relación evolutiva, mientras que las variaciones en las secuencias reflejan el

cambio que ha ocurrido durante la evolución, en forma de inserciones y deleciones. En este estudio se encontró que la mayor variabilidad intraespecífica la presentaron las especies pertenecientes a los órdenes Prorocentrales y Gonyaulacales, dependiendo de los genes del ADNr, siendo los SSU e ITSs las fracciones con mayor número de modificaciones nucleotídicas.

Dolapsakis *et al.* (2005) reportaron que la variabilidad intraespecífica identificada en dinoflagelados taxonómicamente poco relacionadas como los pertenecientes a los géneros *Karenia*, *Gymnodinium*, *Amphidinium* y *Dinophysis*, aparentemente es mínima en comparación con la observada para los Gonyaulacales entre sí (~10 a 50 % dependiendo del gen del ADNr) como *Alexandrium* (Scholin *et al.*, 1994; Adachi *et al.*, 1996a; John *et al.*, 2003) y *Ostreopsis* (Pin *et al.*, 2001); esta variabilidad, al parecer, se mantiene en las regiones altamente variables y de rápida evolución como son los ITS. La variabilidad presentada puede atribuirse a que existen variedades geográficas de las mismas especies (distribuidas en todo el mundo o en otras localidades), que han evolucionado de una manera local, por adaptaciones a la temperatura, corrientes marinas, entre otros factores ambientales.

Por otra parte, existen pocos registros para algunas especies, tal es el caso de *A. margaleffi*, *G. spinifera* y *P. mexicanum*, en donde al hacer el análisis de alineamiento múltiple con secuencias de la misma especie, se obtuvieron similitudes por encima del 85% para el LSU, 71 % para el SSU y 50 % para los ITS. Esto se debe a que al no haber muchos registros de las mismas especies en el GenBank no se puede hacer una comparación más apegada a la realidad, puesto que no se puede establecer cual especie es la que está cambiando. Para *G. spinifera* y *P. mexicanum*, únicamente se encuentran disponibles los registros de una secuencia para el ITS (tablas XIV y XVIII, respectivamente), y no existen registros completos de los genes del ADNr, aun para especies pertenecientes para el mismo género. Un caso similar es el de *A. margaleffi* (tabla XIII), ya que solo existe un registro para el SSU.

Como se muestra en el anexo 1, especialmente para el orden de los Prorocentrales y Gonyaulacales, en algunos casos las secuencias obtenidas presentan una mayor similitud con otras especies del mismo género, esto se debe a la ausencia de registros para los genes ribosomales de la mayoría de las especies de dinoflagelados. Por lo anterior, se recomienda generar secuencias nucleotídicas a partir de especies regionales, para obtener resultados favorables cuando se diseñen métodos moleculares para la implementación de monitoreo ambiental de estos organismos.

Un problema recurrente en torno al registro de secuencias nucleotídicas en bases de datos internacionales, es la falta de unificación de los nombres utilizados para describir a las especies. Es decir, se utilizan sinónimos, tal es el caso de *L. polyedrum*, en donde el registro más extenso para esta especie (AF377944, tabla XV) se encuentra bajo el nombre de *G. polyedra*. Al mismo tiempo, otro problema que se presenta frecuentemente es el registro de secuencias cuya descripción morfológica de la especie es inadecuada; tal es el caso de la secuencia reportada por Grzebyk *et al.*,(1999), quienes registraron una secuencia nucleotídica (Y16232) para la especie de *P. mexicanum*, sin embargo, Cortes y Sierra-Beltrán (2003) rectificaron la identificación taxonómica de esta especie, estableciendo todos los registros hechos para *P. mexicanum* en realidad son de *P. rhatymun*; a la fecha, este registro aun se encuentra en el GenBank bajo el nombre de *P. mexicanum*.

## 7.6 Pruebas de hibridación

La hibridación del ADN se basa en la naturaleza de la doble cadena de la molécula en la que los nucleótidos de las cadenas opuestas (antiparalelas) se encuentran unidas mediante puentes de hidrógeno. En el caso de adenina-timina

(A=T) son dos puentes de hidrógenos, mientras que las asociaciones guanina–citosina (G≡C) están mediadas por tres puentes de hidrógeno. Cuando la doble cadena de ADN se calienta a 100° C, los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias se rompen, liberando así a dos cadenas. Bajo condiciones adecuadas de astringencia (generadas por la fuerza iónica y la temperatura) se da la pauta para la re-asociación de las bases. Condiciones muy astringentes (elevada temperatura y baja concentración de sales) favorecen la eliminación de apareamiento inespecífico de bases, creando así condiciones ideales para un adecuado reconocimiento de bases complementarias. Por el contrario, si la astringencia es débil, esta favorece el apareamiento inespecífico. Además, el tamaño y la composición del fragmento son significativos, ya que el grado de reasociación o hibridación es inversamente proporcional al número de diferencias en la secuencia del genoma y la composición afecta la temperatura de fusión, debido a la energía necesaria para romper los puentes de hidrógeno (Hills *et al.*, 1996).

En este estudio, se llevaron a cabo pruebas preliminares de hibridación, con la finalidad de establecer la sensibilidad, límite de detección y especificidad de la sonda. Como podemos observar en las figuras 27 y 28, los dos primeros objetivos se cumplieron, sin embargo, en los que se refiere a la especificidad de las sondas se presentaron dificultades ya que estas presentaron reconocimiento inespecífico. Como se mencionó en el párrafo anterior, estos problemas se pueden sobrellevar modificando las condiciones de astringencia y empleando sondas de menor tamaño (como las que se generarán usando los cebadores diseñados en este estudio). Las dificultades observadas hasta ese momento, permiten evidenciar el grado de complejidad para estandarizar este tipo de métodos, requiriendo así el llevar a cabo un mayor número de pruebas y, sobre todo, un adecuado diseño de sondas de hibridación.

## 7.7 Taxonomía molecular

En torno a la identificación de la relación existente entre los organismos, pueden utilizarse las inferencias morfológicas; sin embargo, en las últimas cuatro décadas, se ha suscitado un incremento considerable en la generación de información molecular, como son secuencias de aminoácidos y nucleótidos que permiten en cierta medida inferir relaciones filogenéticas. El motivo de tal incremento es la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y el diseño de nuevos cebadores, herramientas clave para la amplificación de diversas regiones del ADN, que permiten identificar variaciones entre- y dentro- especies, y disminuir en cierta forma el tiempo empleado para llevar a cabo su adecuada identificación y enumeración. Sin embargo, existe un fuerte debate sobre si los caracteres moleculares o los morfológicos son una mejor fuente de información para establecer relaciones filogenéticas. Mientras continúe este debate, será necesario utilizar ambos criterios (genotípicos y fenotípicos) como complementarios para la definir una especie. Es importante destacar que el entusiasmo existente en torno del desarrollo de herramientas y nuevos métodos moleculares, no excluye los métodos tradicionales de identificación y caracterización de las especies. Lo conveniente es establecer una conexión entre ellos con la finalidad mejorar las descripciones, interpretar y probar aquellas teorías ya existentes.

## 8. CONCLUSIONES

- Para la obtención de ADN en cantidad y calidad óptima se requiere contar de biomasa suficiente (aprox. 5000 céls./mL).
- En este estudio, se generaron las 64 secuencias nucleotídicas, 54 son nuevos registros para cepas de especies de los órdenes Prorocentrales, Gonyaulacales y Gymnodiniales. Solo en el caso de *C. polykrikoides* se confirmaron los registros existentes en el GenBank (10 secuencias).
- La información potencial que representa la obtención de 54 nuevos registros para las especies de dinoflagelados es inmensa, ya que pueden aplicarse en diversos estudios como son: evolución molecular, biogeografía, filogenia, genética de poblaciones, identificación de fitoplancton, entre otros.
- Con las secuencias obtenidas, es posible diseñar nuevos cebadores para obtener las secuencias completas del genoma ribosomal de las especies estudiadas (en total fragmentos de ~5 700 pb).
- Mediante los cebadores utilizados, fue posible amplificar las regiones específicas de los genes SSU, ITSs y LSU (en sus diferentes combinaciones) de las diferentes especies estudiadas, por lo que es de esperarse que estos cebadores puedan ser empleados en otras especies (diferentes a las utilizadas en este estudio), abriendo así la posibilidad de llevar a cabo investigaciones sobre distribución geográfica local, regional y mundial de los dinoflagelados, entre otras aplicaciones.
- La existencia de cebadores universales para genes ribosomales son una herramienta fundamental para la investigación taxonómica y filogenética

(entre otras) del grupo de dinoflagelados, ya que en nuestro caso, gracias al uso de este tipo de cebadores universales fue posible amplificar el SSU de todas las especies consideradas en el estudio.

- Las secuencias de nucleótidos obtenidas de los amplicones del SSU e ITSs revelaron regiones hipervariables, ideales para el diseño de 6 parejas cebadores con aplicación directa a técnicas de hibridación, los cuales potencialmente tendrán un porcentaje de éxito mayor al 86%.
- Se encontró que el gen LSU, presentó regiones altamente conservadas, ideales para el diseño de cebadores para SSCP, ya que los análisis de, obteniendo así el diseño de 2 parejas de cebadores aplicables al formato SSCP.

## 9. RECOMENDACIONES

- Es necesario continuar con las pruebas de sensibilidad y especificidad con los amplicones de los cebadores diseñados, que son aplicables a los formatos Dot Blot y FISH; así como calibrar los cebadores diseñados para SSCP.
- Una vez estandarizados los métodos de detección, es necesario hacer pruebas con muestras naturales (de campo) para corroborar su funcionamiento (sensibilidad y especificidad).
- Se recomienda continuar con la obtención de secuencias nucleotídicas de distintas especies de dinoflagelados de la región, ya que esto contribuirá al desarrollo potencial de un programa de monitoreo a nivel estatal. Además, la información generada será de gran utilidad para complementar los estudios relacionados con la biogeografía de las especies de dinoflagelados, aspectos evolutivos, entre otros.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M, Sako Y y Ishida Y (1996 a)** Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.*, **32**:424–32.
- Adachi M, Sako Y y Ishida Y (1996 b)** Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.*, **32**:1049–52.
- Adachi M, Sako Y y Ishida Y (1994)** Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Detection efficiency and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **30**:857–863.
- Alonso RR y Ochoa JL (2004)** Hydrology of winter–spring “red tides” in Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Harmful Algae*, **3**:163–171.
- Alonso RR, Ochoa JL y Uribe A (2005)** Grazing of heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca Scintillan* (Mcartney) Kofoidon *Gymnodinium catenatum* Graham. *Rev. Lat. Microbiol.*, **47**(1-2):6-10.
- Andersen P (1996)** Design and implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC Technical Series, UNESCO. No. 44 Pp 1-8.
- Anderson DM (1995)** Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. En *Harmful marine algal Bloom*. Lassus P , Arzul G, Erard E, Gentian P y Marcaillou C (eds). París: Lavoisier Intercept Ltd. pp 103-112.
- Anderson D, Kulis D, Keafer B y Berdalet E (1999)** Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: Variability in labeling intensity with physiological condition. *J. Phycol.*, **35**:870-883.
- Anderson D, Hoagland K y White L (2000)** *Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States*. Woods Hole Oceanographic Institution Tech. Rep. pp. 22–49. [http://www.whoi.edu/redtide/pertinentinfo/Economics\\_report.pdf](http://www.whoi.edu/redtide/pertinentinfo/Economics_report.pdf)
- Anderson D, Andersen P, Bricelj V, Cullen J y Rensel J (2001)** Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters, APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and

Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, IOC, Paris. Pp 1-55

**Anderson D** (2003) Testimony in the Committee on Science Subcommittee on Environment, Technology and Standards U.S. House of Representatives Hearing on the "Harmful Algal Bloom and Hypoxia Research Amendments Act of 2003". <http://gop.science.house.gov/hearings/ets03/mar13/anderson.pdf>

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

**Ausubel FM**, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume I. Jhn Wiley & Sons, Inc. USA. Pp 7.1 – 7.5

**Band SC**, Lilly EL y Anderson D (2003) Identification of *Alexandrium affine* and *Alexandrium margalefii* (Dinophyceae) using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assay. *Phycologia* **42**(3): 261-268.

**Band SC**, Martínez L y Gárate LI (2005) First record of *Chattonella marina* in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*, **28**: 6-7.

**Bolch CJS**, Blackburn SI, Hallegraeff GM y Vaillancourt RE (1999 a) Genetic variations among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **35**:356-367.

**Bolch CJS**, Orr PT, Jones GJ y Blackburn SI (1999 b) Genetic, morphological, and toxicological variations among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J. Phycol.*, **35**:339-355.

**Bolch CJS** y Salas MF (2007). A review of molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium* "tamarensis complex" to Australasia. *Harmful Algae* **6**: 465-485.

**Bowers HA**, Tengs T, Glasgow HB, Burkholder JM, Rublee PA y Oldach DW (2000) Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfeisteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**:4641-4648.

**Bowers HA**, Tengs T, Herrmann M y Oldach DW (2001) Real-time PCR monitoring of estuarine water samples for *Pfeisteria piscicida*: rapid Cycle Real-time PCR methods and applications a dinoflagellates associated with fish kills and human illness. En Mauer S, Witter C and Nakagawara K (eds.), Springer Verlag, Heildelberg, Germany. pp 1-8.

- Bruin A**, Ibelings BW y Van Dorn E (2003) Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiol.*, **491**:47-63.
- Chakrabarti R** (2004) Novel PCR-enhancing compounds and their modes of action. En PCR technology: current innovation 2<sup>nd</sup>. Weissensteiner T, Griffin H y Griffin A (eds). CRC Press, London. pp 53-63.
- Chinain MM**, Germain M, Sako Y, Pauillac S y Legrand AM (1997) Intraspecific variation in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae): I isozyme analysis. *J. Phycol.*, **33**:36-43.
- Cortés AR**, Hernandez B y Luna R (1996) Red tide in México: a review. Proc. of the 7<sup>th</sup> International Conference on Toxic Phytoplankton IOC of UNESCO. Pp 101-104.
- Cortés AR** (1998) *Las mareas rojas*, AGT Editor, México. Pp 1- 40
- Cortés AR** y Sierra-Beltran A (2003) Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 39:221-225.
- Cortés L**, Cortes AR y Sierra-Beltrán A (2003) Presencia de *Cochlodinium catenatum* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) en mareas rojas de Bahía de Banderas, Pacífico Mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, **52**(1):35-49.
- Cortés AR** y Sierra-Beltran A (2008). Biotoxins from Freshwater and marine Harmful algal blooms occurring in Mexico. *Toxin Reviews*, **27**: 27-77
- Costas E**, Zardoya R, Bautista J, Garrido A, Rojo C y López V (1995) Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *Gymnodinium catenatum*/*Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum*/*A. lusitanicum* using antibodies, lectins and gene sequences. *J. Phycol.*, **28**:723-729.
- Coyne KJ**, Hutchins DA, Hare CE y Cary SC (2001) Assessing temporal and spatial variability in *Pfiesteria piscicida* distributions using molecular probing techniques. *Aquat Microb. Ecol.*, **24**:275-285.
- Dang DH**, Hoang MH, Ngo HT, Luyen QH, Hoang LA, Tran VK, Nguyen MH y Chu VT (2005) Phylogenetic analyses of *Prorocentrum* sp. based on 18S rRNA and ITS1-5.8S-ITS2 *J. Biotechnol* In Press.
- Davies L**, Dibner M y Battey J (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, N.Y.

- Dieffenbach** C y Dveksler G (2003). Primer Design PCR primer Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Pp 61-75
- Dodge** JD (1965) Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesokariotic cell. *Int Cong. Ser. Excerpta Med.* 91, 264-265
- Dodge** JD (1982) *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. Her Majesty's Stationery Office, London. 1-7
- Dodge** JD y Greuet C (1987) Dinoflagellate ultrastructural and complex organelles in the biology of dinoflagellates. En *Botanical Monographs V. 21*, Taylor F (ed). Oxford. Boston, EUA. Pp 93-119
- Dolapsakis** NP, Kilpatrick M, Economou-Amilli A y Tafas T (2005) Morphology and rDNA phylogeny of a Mediterranean *Coolia monotis* (Dinophyceae) strain from Greece. *Sci. Mar.*, **70**(1):67-76.
- Doyle** JJ y Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**:13–15.
- Edvarsen** B, Shalchian-Tabrizi K, Jakobsen K, Medlin L, Dahl E, Brubak S y Paasche E (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
- Elwood** HJ, Olsen GJ y Sogin ML (1985) The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha iwwz* and *Stylonychia pustulata* *Mol. Biol. Evol.*, **2**(5):399-410.
- Fensome** R, Taylor F, Norris G, Sarjeant W, Wharton D y Williams G (1993) *A classification of living and fossil Dinoflagellates*, Hanover: Sheridan Press. Pp 3
- Gallagher** JC (1980) Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansen Bay. *J. Phycol.*, **16**:464-474.
- Gallo** RJ, Villareal EJ, Sierra-Beltrán A, Blanco PM y Niño TC (2004) Possible causes of the stranding of long beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) in the Gulf of California. *CEDO News*, **10**:28-29.
- Gárate** LI, Hernández O, Band SC y Serrano C (2001) Red tides along the coasts of Baja California Sur, México (1984 to 2001). *Oceánides*, **16**(2):127-134.

- Gárate** LI, Band SC, Cervantes R & Escobedo U (2002) Mareas rojas de *Mesodinium rubrum* (Lohmann) Humburger y Buddenbrock en el Golfo de California (invierno de 1998). *Hidrobiol.*, **12**(1):15-20.
- Gárate** LI, Beltrones S y Maldonado L (2003) First record of a *Rhizosolenia debyana* bloom in the Gulf of California, Mexico. *Pacific Sci.*, **57**(2):141–145.
- Gárate** LI, López CD, Bustillos GJ y Hernández S (2004 a) Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California, Mexico. *Rev. Biol. Trop.*, **52**:51-58.
- Gárate** LI, Bustillos GJ, Erler K, Muñetón G, Luckas B y Quezada T (2004 b) Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam (*Megapitaria squalida*) in Bahía de la Paz, Gulf of California (2001-2003). *Hydrobiol.*, **352**:195–200.
- Gárate** LI, Muñetón G y Maldonado V (2006) Florecimiento de dinoflagelados of *Gonyaulax polygramma* frente a la Isla Espiritu Santo, Golfo de California, México. *Rev. Invest. Mar.*, **27**:31-39.
- GEOHAB** (2001) Global ecology and oceanography of harmful algal blooms. En *Science Plan*, Gilbert P and Pitcher G (eds). SCOR and IOC, Baltimore and Paris. pp 86.
- Gibbs** SP (1981) The chloroplast of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann N Y Acad Sci* 361: 193-208.
- Gómez** A (1998) Red tide occurrences record in Mexico from 1980 to 1992. *Anal. Inst. Biol. Serie Zoología*, **69**(1):13-22.
- Gómez**, F (2005) A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Bot. Croat.* 64(1): 129-212.
- Granéli** E y Turner J (2006) An introduction to harmful algae in ecology of harmful algae. Granéli E. y Turner J. (eds) Springer Editorial Pp 3-7.
- Grzebyk** D Sako Y y Berland B (1998) Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dhynophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequence, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis* sp nov. *J. Phycol.*, **34**:1055-1068.
- Hallegraeff** G M (1991) *Aquaculturists' guide to harmful australian microalgae*. CSIRO Div. Fisheries, Hobart, Tasmania, Australia. Pp 11
- Hallegraeff** GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol.*, **32**:79-99.

- Hallegraeff** G M (1995) Harmful algal blooms: a global overview. En *Manual on harmful marine microalgae*, Hallegraeff GM, Anderson DM y Cembella AD (eds.) IOC Manuals and Guides, No.33, UNESCO. pp 1–22.
- Hallegraeff** GM, Anderson DM, Cembella AD, Enevoldsen HO eds. (2003) In Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD eds. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, 2<sup>nd</sup> edition, Paris: IOC Monographs on Oceanographic Methodology, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, No. 11 pp 339-364.
- Heley** ST, Cavender JF y Murray TE (1999) Detection of *Alexandrium tamarensis* by rapid PCR analysis. *BioTech.*, **26**:88–91.
- Higgins** DG y Sharp PM (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, **73**:237-244.
- Hills** D y Dixon M (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly Review of Biology*, **66**(4):411-453.
- Hills** D, Moritz C y Mable B (1996) *Molecular systematics* 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc. Canada. pp 169–321.
- Hou** JJ, Huang BQ y Chen JX (2005) Molecular biological analyses of the relationship between several species of *Prorocentrum* from east China Sea. unpublished, Submitted (07-MAY-2005) No. Acceso DQ028763.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=66356306>
- Hungerford** J y Wekell M (1993) Control measures in shellfish and finfish industries in the USA, En *Algal toxins in seafood and drinking water*, Falconer I (ed). Academic Press, London. pp 117-128.
- Hwang** U y Kim W (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Kor J Parasitol.*, **37**(4):215–228.
- Janson** S y Hayes PK (2006) Molecular taxonomy of harmful algae in ecology of harmful algae, Granéli E y Turner J (eds) Springer Editorial. Pp 299-309.
- John** U, Fensome RA y Medlin LK (2003) The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarensis* “species complex” (Dinophyceae). *Mol. Biol. Evol.*, **20**(7):1015–1027.

- Judge** BS, Scholin CA y Anderson D (1993) RFLP analysis of a fragment of the large-subunit ribosomal RNA gene of globally distributed populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Biol. Bull.*, **185**:329–30.
- Ki** JS y Han M-S (2005) Sequence-base diagnostics and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *J. Appl. Phycol.*, **17**(2):147-153.
- Ki** JS, Jang GY y Han MS (2005 a) Integrated method for single-cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of ribosomal DNA from harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium catenella*. *Mar. Biotechnol.*, **6**:587-593.
- Ki** JS, Jang GY y Han MS (2005 b) Sequence based diagnosis and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *J. Appl. Phycol.*, **17**:147-153.
- La Barbera** S (1993) Dinoflagelados de la region nororiental de Venezuela. Cumaná, Ven. FONAIAP–Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado de Sucre. Serie A. 98 pp.
- Lee** C, Mizusawa H y Kakefuda T (1981) Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**(5):2838-2842.
- Lewis** RJ, Jensen SI, DeNicola DM, Miller VI, Hoagland KD y Ernst SG (1997) Genetic variation in the diatom *Fragilaria capuchina* (Fragilariaceae) along a latitudinal gradient across North America. *Plant Syst. Evol.*, **204**:99-108.
- Lindahl** O (1998) Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. En *Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*, Miraglia M, Van Egmond H, Brera C y Gilberts J (eds). Proc. of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. pp 409-423.
- Litaker** W, Vandersea M, Kibler S, Reece K, Stokes N, Lutzoni F, Yonish B, West M, D Black M y Tester P (2007) Recognizing dinoflagellates species using ITS rDNA sequence. *J. Phycology.*, **43**:334-355.
- Manhart** J y McCourt R (1992) Molecular data and species concepts in the algae. *J. Phycol.*, **28**:730-737.
- Medlin** LK, Elwood H, Stickel S y Sogin M (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**:491–499.

- Miller P y Scholin CA** (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.
- Mindel DP y Honeycutt R** (1990) Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications. *Annu. Rev. Ecol Syst.*, **21**:541- 566.
- Murphy LS y Guillard RRL** (1976) Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes I. The centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* y *T. fluviatilis*. *J. Phycol.*, **12**:9-13.
- Ochoa JL, Sanchez PA, Cruz VA, Nunez E y Sierra-Beltrán A** (1997) Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995 origin and impact. *Hydrobiol.*, **352**:195-200.
- Ochoa JL, Hernández B, Lluch CS, Arredondo VB, Núñez VE, Heredia TA, Pérez LJ y Alonso RR** (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.
- Okolodkov Y y Gárate LI** (2006) An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Bot. Mex.*, **74**:1-154.
- Orita M, Susuki Y, Sekiya T y Hayashi K** (1989) Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**:874-879.
- Pfiester LA y Anderson DM** (1987) Dinoflagellate life-cycles and environmental control. In Taylor FJR The biology of Dinoflagellates, En *Botanical Monographs* V 21 Oxford. Boston, EUA.
- Picca A, Helguera M Salomón N y Carrera A** (2004) Marcadores moleculares. En *Biotechnología y mejoramiento vegetal*, Echenique E y Rubistein L (eds). INTA Buenos Aires, Argentina. pp 61-68.
- Pin LC, Teen L, Ahmad A y Usup G** (2001) Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 246–255.
- Reguera B** (2002) Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas toxicas. En floraciones algales nocivas en el cono sur americano. Sar EA, Ferrario ME y Reguera B (ed) Inst. Esp. Oceanogr. 19-54

- Rehbein H** (2005) Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Eur Food Res Technol.*, **220**:625–632.
- Rizzo PJ** (1987) Biochemistry of the dinoflagellates nucleus. En *The biology of Dinoflagellates*. Taylor F (ed). Botanical Monographs vol. 21 Oxford. Boston, EUA. Pp 143 - 173
- Rizzo PJ** (2003) Those amazing dinoflagellate chromosomes. *Cell Research*, **13**(4):215-217.
- Robinson JP y Harris SA** (1999) Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspectiva. En *Which DNA Marker for Which Purpose?*, Gillet, E.M. (ed). Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV research Programme Molecular Tools for Biodiversity. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Saker ML, Vale M, Kramer D y Vasconcelos V** (2007) Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**:441-449.
- Sako Y, Hosoi-Tanabe S y Uchida A** (2004) Fluorescence in situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* and *Alexandrium catenella*. *J. Phycol.*, **40**:598–605.
- Savin MC, Martin JL, LeGresley M, Giewat M y Rooney-Varga J** (2004) Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microb. Ecol.*, **48**: 51-65.
- Schmalenberger A, Schwieger F y Tebbe C** (2001) Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(8):3557–3563.
- Scholin CA y Anderson DM** (1993) Population analysis of toxic and non toxic *Alexandrium* species using ribosomal RNA signature sequences. En *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda TJ and Shimizu Y (eds). Elsevier Science Publishers BV. pp 95-102.
- Scholin CA, Anderson DM y Sogin ML** (1993) Two distinct small subunit ribosomal RNA genes in the North American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **29**:209-216.

- Scholin** CA y Anderson DM (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes. *J. Phycol.*, **30**:744-754.
- Scholin** CA, Herzog M, Sogin M y Anderson DM (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**:999-101.
- Scholin** CA, Buck K, Britschgi T, Cangelosi G y Chavez F (1996) Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-target probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycol.*, **35**(3):190-197.
- Scholin** CA, Miller P, Buck K, Chavez F, Harris P, Haydock P, Hoead J y Cangelosi G (1997) Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.*, **42**65:1265-1272.
- Scholin** CA (1998) Morphological, genetic and biogeographic relationship of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catanella* and *A. fundyense*. En *Physiological Ecology of Harmful Algal Bloom*, Anderson D, Cembella A and Hallegraeff (eds) NATO ASI Series. Pp 13-28
- Scholin** CA, Massion G, Mellinger E, Brown M, Wright D y Cline D (1998) The development and application of molecular probes and novel instrumentation for detection of harmful algae. Ocean Community Conference' 98 *Proc. Mar. Tech. Soc.*, **1**:367-370.
- Scholin** CA y Anderson DM (1998) Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp 253 -257.
- Scholin** CA, Marin III R y Miller P (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.
- Schwieger** F y Tebbe C (1998) A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(12):4870-4876.
- Sellner** K, Doucette G y Kirkpatrick G (2003) Harmful algae bloom: causes, impacts and detection. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, **30**:383-406.

- SEMARNAT** y **PROFEPA** (1997) Mortandad de mamíferos marinos cuyos cadáveres arribaron a las costas de Sinaloa. *Informe técnico* 1997. pp 5-21.
- Sierra-Beltrán** A, Morquecho EM, Lechuga DC y Ochoa JL (1996) Monitoring program at Baja California Sur, Mexico. En *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Yasumoto T, Oshima Y y Fukuyo Y (eds). IOC UNESCO, Paris, pp 105-108.
- Sierra-Beltrán** A, Sanchez PJ, Cruz VA y Ochoa JL (1996) Biotoxinas marinas. *Informar*, **4**(24):8-12.
- Sierra-Beltrán** A, Palafox UM, Grajales MJ, Cruz VA, y Ochoa JL (1997) Sea bird mortality at Cabo San Lucas: evidence that domoic acid is spreading. *Toxicon*, **35**:447-454.
- Sierra-Beltrán** A, Cruz NE, del Villar LM, Cerecero J y Ochoa JL (1998) An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon*, **36**:1493-1502.
- Sierra-Beltrán** A y Cortés AR (1999) National HAB training course in Mexico. Monitoring Program Launched Early 1999. International Oceanographic Commission of UNESCO, *Harmful Algae News*, **19**:9-10
- Sierra-Beltrán** A, Cortes AR, Gallo RJ, Licea-Duran S y Villareal EJ (2005) Is *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* toxin the principal cause of sardines, dolphins, sea lions and pelicans mortality in 2004 in Mexico? *Harmful Algae News*, **29**:6-8.
- Smayda** T (1997) Harmful algae blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanograph.*, **42**(5):1137-1153.
- Sournia** A (1995) Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean; an inquiry into diversity. En *Harmful marine algal Bloom*, Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentian P y Marcaillou C (eds). París: Lavoisier Intercept Ltd. pp 103-112.
- Spector** (1984) Dinoflagellates: an introduction. En *Dinoflagellates*, Spector D. (ed) Academic Press Inc. Florida EUA. pp 1-17.
- Steidinger** KA y Curt H (1973) Phytoplankton ecology: A conceptual review based on eastern Gul of Mexico research. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **31**(1): 49-68
- Steidinger** KA (1975) Basic factor influencing red tides. In *Proceedings of the . First International Conference on Toxic dinoflagellate Bloom*. LoCicero VR(ed) Mass. Sci. Tech Found., Wakefield MA. Pp 153-162.

**Steidinger** KA y Haddan K (1981) Biologic and Hydrographic Aspects of Red Tides. *BioScience* **31**(11) 814-819.

**Steidinger**, KA. Y Tangen K (1997). Dinoflagellates. In: Tomas, C. R. (ed.). Identifying marine phytoplankton. Acad. Press, Inc. San Diego, California. pp. 387-589.

**Suárez** IB y Guzmán L (1998) Floraciones de Algas Nocivas; mareas rojas y toxinas marinas. Editorial Universitaria S. A. Chile Pp. 10-33

**Takahashi** Y, Takishita K, Koike K, Maruyama T, Nakayama T, Kobiyama A y Ogata T (2005) Development of molecular probes for *Dinophysis* (Dinophyceae) plastid: a tool to predict blooming and explore plastid origin. *Mar. Biotechnol.*, **7**: 95-103.

**Tanabe** HS y Sako Y (2006) Development and application of fluorescent in situ hybridization (FISH) method for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* in cultured and natural seawater. *Fish. Sci.*, **72**:77-82.

**Taylor** FJR (1987) The biology of Dinoflagellates, En *Botanical Monographs V 21* Oxford. Boston, EUA. 1-74

**Tomas** R Carmelo (1997) *Identifying marine phytoplankton*. Academia Press Inc. California, EUA.

**Usup** G, Pin L, Ahmad A y Teen L (2002) Phylogenetic relationship of *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) to other *Alexandrium* species based on ribosomal RNA gene sequences. *Harmful Algae*, **1**:59-68.

**Van Den Hoek** C, Mann D y Jhans H (1995) *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge, UK.

**Vandamme** AM (2003) Basic concepts of molecular evolution In The phylogenetic Handbook A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. (Ed)Salemi M y Bañadme AM. Cambridge University Press. Pp 1-24

**Van Egmond** HP, Van Apeldoorn ME y Speijers GJA (2005) Biotoxinas Marinas. En *Estudio FAO: alimentación y nutrición*. FAO.

**Walsh** D, Reeves RA, Saul DJ, Gray RD, MacKenzie L, Bergquist PR y Bergquist PL (1998) Heterogeneity of SSU and LSU rDNA sequences of *Alexandrium* species. *Biochem. Systemat. Ecol.*, **26**:495-509.

- Wang Q**, Deeds JR, Place AR y Belas R (2005) Dinoflagellate community analysis of a fish kill using denaturing gradient gel electrophoresis. *Harmful Algae*, **4**:151–162.
- Wheeler W** (2005) Alignment, dynamic homology and optimization. En *Parsimoy, phylogeny and genomics*, Albert V (ed). Oxford Univesity Press, EUA. pp 71-74.
- Xion J** (2006) Sequence Aligment in Xion J (Ed.). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press. EUA. Pp. 31-49.
- Yan QY**, Yu YH, Feng WS, Deng WN y Song XH (2007) Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factor in Lake Donghu. *Microb. Ecol.*, **54**:290-297.
- Yokoyama T** y Suzuki T (2008) Ribosomal RNAs are tolerant toward genetic insertions: evolutionary origin of the expansion segments. *Nucleic Acids Research*, **36**:(11)3539–3551.

**ANEXO 1.** Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Gymnodiniales

<i>Akashiwo sanguinea</i> ASCV-1								
Oligo	Análisis de homología							
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura	
8	791	<i>Akashiwo sanguinea</i>	AY831412.1	635/689	92	4291-4965	85(959)	
			AY831411.1	635/689	92	4291-4965	85(959)	
			DQ779986.1	623/673	92	4696-5357	85(953)	
<i>Cochlodinium polykrikoides</i> CPPV-1								
Oligo	Análisis de homología							
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura	
3	851	<i>Cochlodinium sp</i>	DQ915170	816/818	99	3 - 819	96(1498)	
			<i>G. catenatum</i>	DQ779990	823/838	98	444 - 1281	98(1463)
			<i>C. polykrikoides</i>	DQ779986	823/838	98	380 - 1217	98(1463)
4	852	<i>C. polykrikoides</i>	EU418964	830/840	98	1564 - 725	98(1493)	
			DQ779985	830/840	98	2090 - 1251	98(1493)	
			AY347309	830/840	98	2090 - 1251	98(1493)	
2	853	<i>C. polykrikoides</i>	DQ779986	487/495	98	1648 - 3073	76(1104)	
			AY347309	487/495	98	1648 - 3073	76(1104)	
			AY421782	475/484	98	1306 - 1789	56(841)	
6	849	<i>C. polykrikoides</i>	DQ779986	648/760	85	3650 - 2913	88(752)	
			DQ779985	648/760	85	3650 - 2913	88(752)	
			DQ779984	648/760	85	3650 - 2913	88(752)	
1	855	<i>C. polykrikoides</i>	DQ779986	446/539	82	2004 - 3430	78(661)	
			AF208248	267/311	85	208 - 510	35(318)	
			EU418935	266/311	85	788 - 1090	35(313)	
6	853	<i>C. polykrikoides</i>	DQ779986	648/760	85	3650 - 2913	87(752)	
			DQ779985	648/760	85	3650 - 2913	87(752)	
			DQ779984	648/760	85	3650 - 2913	87(752)	
5	716	<i>C. polykrikoides</i>	EF506627	708/716	98	31 - 745	99(1273)	
			EF506625	708/716	98	36 - 750	99(1273)	
			AB295050	708/716	98	36 - 750	99(1273)	
7	722	<i>C. polykrikoides</i>	EF506625	707/713	99	712 - 1	98(1279)	
			AB295050	707/713	99	712 - 1	98(1279)	
			AB295049	707/713	99	712 - 1	98(1279)	
8	843		AB295050	829/835	99	1298 - 2132	98(1506)	
			AB295048	829/835	99	1298 - 2132	98(1506)	

		<i>C.</i>	EF506628	674/678	99	279 - 956	79(1227)
9	845	<i>polykrikoides</i>	AB295048	838/843	99	2401 - 1559	99(1524)
			AB295050	836/844	99	2401 - 1559	99(1507)
			DQ779986	782/847	92	5712 - 4870	99(1192)
			<b><i>Gymnodinium catenatum</i> GCCV-1</b>				
<b>Oligo</b>	<b>Análisis de homología</b>						
	<b>Bases</b>	<b>Especie</b>	<b>No. Acceso</b>	<b>No. de bases</b>	<b>%</b>	<b>Alin</b>	<b>Cobertura</b>
4	818	<i>G. catenatum</i>	EU418954	752/784	95	1525 - 749	95(1260)
			DQ785883	752/784	95	2300 - 1524	95(1260)
			AB265962	752/784	95	1708 - 932	95(1260)
1	852	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	825/836	98	2253 - 3086	98(1539)
			AF208247	572/576	99	1 - 576	67(1040)
			AY506592	524/524	100	1 - 524	61(968)
6	844	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	833/836	99	3295 - 2460	98(1524)
			AF208247	488/492	99	576 - 85	58(885)
			AY506592	465/465	100	524 - 60	61(968)
5	773	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	600/600	100	3113 - 3712	77(1109)
			DQ785882	600/600	100	3147 - 3746	77(1109)
			DQ779990	600/600	100	2939 - 3538	77(1109)
7	711	<i>G. catenatum</i>	DQ286733	693/697	99	697 - 1	97(1262)
			DQ785883	690/693	99	3666 - 2975	97(1260)
			DQ785882	690/693	99	3700 - 3009	97(1260)
<b><i>Gymnodinium catenatum</i> GCMV-1</b>							
<b>Oligo</b>	<b>Análisis de homología</b>						
	<b>Bases</b>	<b>Especie</b>	<b>No. Acceso</b>	<b>No. de bases</b>	<b>%</b>	<b>Alin</b>	<b>Cobertura</b>
3	752	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	525/583	90	643 - 1217	80(745)
			AB265962	525/583	90	51 - 625	80(745)
			AY421785	525/583	90	63 - 637	80(745)
1	852	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	825/836	98	2253 - 3086	98(1480)
			AF208247	564/578	97	1 - 576	67(987)
			AM184202	535/579	92	1 - 573	67(815)
6	844	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	835/838	99	3299 - 2462	98(1528)
			AF208247	486/490	99	576 - 87	57(881)
			AM184202	459/490	93	573 - 87	57(726)
9	844	<i>G. catenatum</i>	DQ785883	710/795	89	5357 - 4575	98(974)
			DQ785882	710/795	89	5391 - 4609	98(974)
			DQ779990	710/795	89	5183 - 4401	98(974)

**ANEXO 2.** Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Gonyaulacales

<i>Alexandrium affine</i> AACQ-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	789	<i>A. insuetum</i>	AB088298.1	658/835	78	82 - 882	99 (488)
		<i>A. ostenfeldi</i>	U27500.1	654/831	78	83 - 881	99(484)
		<i>A. tamutum</i>	AJ535379	655/833	78	77 - 877	99 (481)
4	835	<i>Alexandrium sp.</i>	EU418967.1	682/775	88	1497 - 739	90(883)
		<i>A. insuetum</i>	AB088298.1	682/775	88	1691 - 933	90(883)
		<i>A. ostenfeldi</i>	AJ535383.1	681/774	87	1633 - 875	90(883)
1	762	<i>A. margaleffi</i>	AMA251208.1	469/487	96	1-481	58(794)
		<i>A. minutum</i>	AY831408.1	616/818	75	2159-2963	93(475)
		<i>A. affine</i>	AY831409.1	582/819	71	2193-2988	91(345)
6	828	<i>A. margaleffi</i>	AMA251208	470/487	96	481-1	10(75.2)
		<i>A. minutum</i>	AY831408.1	561/682	82	3144-2467	56(798)
		<i>A. affine</i>	AY831409.1	538/706	76	3169-2470	78(482)
<i>Alexandrium margaleffi</i> AMCO-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	767	<i>A. margaleffi</i>	U27498	439/545	80	122- 653	69(399)
		<i>A. minutum</i>	AJ535380	429/547	78	98 - 629	69(329)
			U27499	424/541	78	129 - 652	68(322)
4	845	<i>A. margaleffi</i>	U27498	753/764	98	1685 - 923	90(1356)
		<i>A. minutum</i>	AJ535388	750/766	97	1669 - 905	90(1323)
		<i>A. ostensfeldii</i>	AJ535381	751/767	97	1683 - 918	90(1323)
2	847	<i>A. minutum</i>	AY831408	726/839	86	1794-2626	95(887)
		<i>A. affine</i>	AY831409	712(834	85	1813 - 2631	94(822)
		<i>A. margaleffi</i>	U27498	466/483	96	1316 - 1798	56(802)
6	853	<i>A. margaleffi</i>	AF318230	659/666	98	664 - 1	77(1118)
			AY152708	645/646	99	646 - 1	75(1186)
		<i>A. minutum</i>	AY831408	545/611	89	3405 - 2803	70(749)
1	855	<i>A. margaleffi</i>	AJ251208		96	1- 481	56(800)
		<i>A. minutum</i>	AY831408	690/882	79	2150-3030	98(558)
		<i>A. affine</i>	AY831409	378/479 195/226	78 86	2168-3055	78(528)
6	850	<i>A. margaleffi</i>	AJ251208	471/488	96	481 - 1	57(800)
		<i>A. minutum</i>	AY831408	575/691	83	3146 - 2470	77(593)
		<i>A. lusitanicum</i>	DQ176656	290/323	89	321-1	37(405)
5	679	<i>A. margaleffi</i>	AF318230	662/669	98	46 - 712	98(1192)
			AY154958	660/667	98	1 - 665	97(1188)
			AY152707	646/648	99	26 - 673	95(1184)
7	650	<i>A. margaleffi</i>	AY152707	640/643	99	653 - 11	98(1168)

			AY152708	640/643	99	654 - 12	98(1168)
			AY268609	629/630	99	640 - 11	96(1157)
8	849	<i>A. minutum</i>	AY831408.1	767/810	94	4116-4925	95(1260)
			AY831409.1	733/808	90	4137-4944	95(1115)
		<i>A. affine</i>	DQ785891.1	731/809	90	4119-4927	95(1101)
9	812	<i>C. polykrikoides</i>	AY831408.1	699/767	91	5152-4392	94(1056)
		<i>A. minutum</i>	DQ785891.1	658/750	87	5155-4411	92(921)
		<i>A. tamarense</i>	DQ444290.1	658/750	87	5185-4441	92(921)
<b><i>Gonyaulax spinifera</i> GSCO-1</b>							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	833	<i>G. spinifera</i>	DQ867107	777/801	97	65 - 863	95(1343)
		<i>G. verior</i>	AY443013	432/521	82	283 - 789	60(442)
		<i>G. spinifera</i>	AF022155	430/521	82	298 - 805	60(433)
4	845	<i>G. spinifera</i>	DQ867107	810/819	98	1718 - 903	96(1458)
			AF022155	753/853	88	1752 - 915	98(985)
		<i>G. polygramma</i>	AY775287	698/778	89	1675 - 910	90(970)
1	854	<i>G. spinifera</i>	EF416284	180/191	94	1 - 189	22(291)
			DQ151558	166/204	81	1 - 197	22(152)
		<i>G. polyedra</i>	AF377944	82/88	93	1688 - 1773	10(126)
6	845	<i>G. spinifera</i>	EF416284	556/584	95	580 - 1	68(917)
			DQ151558	349/413	84	405 - 1	47(392)
		<i>G. membranacea</i>	AY154961	135/168	80	354 - 191	45(370)
5	846	<i>G. spinifera</i>	EF416284	534/557	95	27 - 580	65(894)
			DQ151558	322/381	84	32 - 405	43(361)
			DQ151557	322/381	84	11 - 384	43(361)
7	831	<i>G. spinifera</i>	EF416284	556/584	95	580 - 1	69(917)
			DQ151558	349/413	84	405 - 1	48(392)
			DQ151557	330/391	84	384 - 1	45(370)
<b><i>Gonyaulax turbiney</i> GTCQ-1</b>							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
1	838	<i>A. margaleffi</i>	AMA251208	470/487	96	1-481	58(794)
		<i>A. minutum</i>	AY831408.1	666/851	78	2171-3015	96(636)
		<i>A. affine</i>	AY831409.1	652/884	73	2173-3040	98(497)
6	855	<i>A. margaleffi</i>	AMA251208	468/487	96	481-1	56(789)
		<i>A. minutum</i>	AY831408.1	558/675	82	3137-2467	77(663)
		<i>A. affine</i>	AY831409.1	534/699	76	3162-2460	77(486)

## Continuación anexo 2

<i>Lingulodinium polyedrum</i> LPCQ-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	838	<i>G. polyedra</i>	AF377944	715/833	85	1650 - 2471	97(861)
			EU177126	587/687	85	1 - 679	80(697)
		<i>L. polyedrum</i>	AM184202	442/525	84	13 - 532	61(497)
4	847	<i>G. polyedra</i>	EF492507	827/833	99	1742 - 910	97(1502)
			AF274269	827/833	99	1728 - 896	97(1502)
		<i>L. polyedrum</i>	DQ202217	827/833	99	1116 - 284	97(1502)
1	836	<i>G. polyedra</i>	AF377944	715/833	85	1650 - 2471	97(861)
			EU177126	587/687	85	1 - 679	80(697)
		<i>L. polyedrum</i>	AM184202	442/525	84	13 - 532	61(497)
6	727	<i>G. polyedra</i>	AF377944	667/714	93	3037 - 2329	97(1048)
		<i>L. polyedrum</i>	EF613357	624/720	86	710 - 1	96(782)
		<i>P. micans</i>	X16108	361/426	84	441 - 25	57(411)
5	728	<i>G. polyedra</i>	AF377944	670/717	93	2375 - 3085	97(1053)
		<i>L. polyedrum</i>	EF613357	624/723	86	50 - 761	97(771)
		<i>G. polyedra</i>	X61731	277/284	97	67 - 349	38(484)
7	727	<i>G. polyedra</i>	AF377944	667/714	93	3037 - 2329	97(1048)
		<i>L. polyedrum</i>	EF613357	624/720	86	710 - 1	96(782)
		<i>G. polyedra</i>	X61731	319/331	96	349 - 21	45(544)
8	838	<i>G. polyedra</i>	AF377944	871/836	97	3638 - 4473	97(1434)
		<i>G. aureolum</i>	DQ77991	712/827	86	3753 - 4569	95(867)
		<i>A. sanguinea</i>	DQ779988	711/827	85	3585 - 4400	95(861)
9	851	<i>G. polyedra</i>	AF377944	824/841	97	4737 - 3897	98(1454)
		<i>C.</i>	DQ779986	751/848	88	5708 - 4873	98(1007)
		<i>polykrikoides</i>	DQ779985	751/848	88	5708 - 4873	98(1007)

**ANEXO 3.** Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para el orden de los Prorocentrales

<i>Prorocentrum lima</i> PLHV-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	799	<i>P. minimum</i>	DQ336072	605/720	84	85 - 794	89(678)
			DQ336069	605/720	84	85 - 794	89(678)
			DQ336066	605/720	84	85 - 794	89(678)
4	802	<i>P. lima</i>	AB189778	510/675	75	1613 - 946	84(444)
			AB189777	510/675	75	1613 - 946	84(444)
			AB189776	510/675	75	1613 - 946	84(444)
5	672	<i>P. lima</i>	DQ336186	649/654	99	25 - 676	97(1177)
			DQ336180	641/657	97	33 - 687	97(1120)
			DQ336195	639/655	97	36 - 688	97(1116)
7	674	<i>P. lima</i>	DQ336186	633/638	99	638 - 1	94(1147)
			DQ336193	642/661	97	660 - 1	97(1110)
			DQ336181	642/661	97	660 - 1	97(1110)
<i>Prorocentrum minimum</i> PIPV-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	799	<i>P. minimum</i>	DQ336072	605/720	84	85 - 794	89(678)
			DQ336069	605/720	84	85 - 794	89(678)
			DQ336066	605/720	84	85 - 794	89(678)
4	817	<i>P. minimum</i>	DQ336072	764/801	95	1722 - 924	97(1267)
			DQ336069	764/801	95	1722 - 924	97(1267)
			DQ336066	764/801	95	1722 - 924	97(1267)
1	850	<i>P. minimum</i>	DQ054538	661/669	98	1 - 668	78(1190)
			AF352370	635/639	99	1 - 639	75(1158)
			EU244473	616/620	99	1 - 619	72(1122)
6	847	<i>P. donghaiense</i>	DQ336340	636/665	95	662 - 1	77(1059)
		<i>P. minimum</i>	AF352370	570/574	99	639 - 66	67(1038)
			DQ054538	544/550	98	668 - 120	64(981)
8	796	<i>P. donghaiense</i>	AY822610	647/777	83	1279 - 2040	96(693)
		<i>P. micans</i>	X16108	635/780	81	1297 - 2054	96(606)
			AY822609	501/608	82	1405 - 1999	75(514)
9	768	<i>P. donghaiense</i>	AY822610	514/712	72	1616 - 2315	92(333)
		<i>P. micans</i>	AY822609	509/712	71	1633 - 2326	92(301)
			X16108	502/714	70	1297 - 2054	92(268)

## Continuación anexo 3

<i>Prorocentrum mexicanum</i> PXPV-1							
Oligo	Análisis de homología						
	Bases	Especie	No. Acceso	No. de bases	%	Alin	Cobertura
3	769	<i>P. micans</i>	PMI415519	635/785	80	52-814	91(672)
		<i>P. mexicanum</i>	EF492510.1	633/785	80	43-810	91(661)
		<i>P. dentatum</i>	DQ336057.1	631/783	80	43-810	91(661)
4	758	<i>P. micans</i>	DQ004735.1	682/769	88	1687-924	90(967)
		<i>P. mexicanum</i>	EF492510.1	678/768	88	1682-919	90(960)
		<i>P. minimum</i>	DQ336072.1	680/769	88	1658-895	90(958)
1	855	<i>P. cassubicum</i>	EU244475	631/631	100	1 - 631	73(1161)
		<i>P. rathymum</i>	EU244466	631/631	100	1 - 631	73(1161)
		<i>P. micans</i>	M14649	737/797	92	1665 - 2451	91(1118)
6	848	<i>P. cassubicum</i>	EU244475	517/519	99	631 - 113	61(948)
		<i>P. rathymum</i>	EU244466	517/519	99	631 - 113	61(948)
		<i>P. mexicanum</i>	AY886763	486/489	99	565 - 77	57(885)
8	847	<i>P. donghaiense</i>	AY822619	809/834	97	1266 - 2095	98(1395)
		<i>P. micans</i>	X16108	807/837	96	1284 - 2108	98(1363)
		<i>G. aureolum</i>	DQ779991	795/834	95	3753 - 4581	98(1317)
9	833	<i>P. micans</i>	AY822609	770/818	94	2319 - 1512	97(1229)
			X16108	762/822	92	2374 - 1569	97(1160)
		<i>P. donghaiense</i>	AY822610	763/819	93	2360 - 1553	97(1184)

## GLOSARIO

**Ácido nucleico:** Biomolécula formada por macropolímeros de nucleótidos o polinucleótidos. Esta presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una generación a la siguiente. Existen dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

**ADN polimerasa:** Enzima que sintetiza una nueva cadena de ADN en dirección 5'-3' usando una cadena antiparalela de ADN como molde

**ADN ribosomal (ADNr):** Contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El ADNr se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18S SSU, 5.8 S, y 28S LU), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico, ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son Adenina, Timina, Citosina y Guanina. Los desoxirribonucleótidos están ligados por enlaces fosfodiéster entre el grupo 5'-fosfato de un nucleótido y el grupo 3'-hidroxil del siguiente. El ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células así como para su propia replicación y cumple con la función de archivar la información genética contenida en su secuencia de bases.

**AFLP:** (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) son una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, seguido de la ligación o unión de adaptadores complementarios a los sitios de restricción y amplificación selectiva mediante PCR de los fragmentos con los adaptadores. Los fragmentos amplificados se visualizan posteriormente a la separación en un gel desnaturizante de poliacrilamida o por fluorescencia.

**Alelo:** Cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen

**Alineamiento de secuencias:** Esquema en que se escriben dos o más secuencias, una encima de la otra, y se estima que los residuos que comparten la misma posición tienen un origen evolutivo común.

**Aloenzimas:** Formas alelicas de las isoenzimas

**Alveolata:** es uno de los principales grupos de protistas. Existen tres grupos principales, que son muy diferentes en forma, pero que están relacionados desde un punto de vista ultraestructural y genético: Ciliophora, Apicomplejos y Dinoflagellados. La característica compartida más notable es más la presencia de alvéolos corticales.

**Alvéolos:** vesículas planas dispuestas en una capa continua que apoya la membrana, formando típicamente una película flexible. En los dinoflagelados forman a menudo las placas de una armadura. Los alveolados tienen mitocondrias con crestas tubulares y sus flagelos o cilios tienen estructuras distintivas.

**Anfiesma:** cobertura celular.

**Antapicales:** Placas situadas en la parte posterior de la hipoteca, que están en contacto con el antiápex. Se designan con la simbología (""). Presente solamente en formas tecadas, se excluyen los Dinophysiales.

**Antropogénico:** Este término es usado para describir los efectos, procesos, objetos o materiales creados o derivados de actividades realizadas por el ser humano, en oposición a la ocurrencia en ambientes sin influencia humana.

**Apical o Apice:** Parte anterior de la célula. El ápice está usualmente asociado con el complejo poro apical (APC) en peridinales, gonyaulacales y órdenes similares, o hueco apical en aquellas especies no armadas que proceden esta característica.

**Apicales:** placas situadas en la parte anterior de la epiteca que están en contacto directo con el apex. Se designa con la simbología (""). Presentes solamente en formas tecadas, con excepción de Dinophysiales.

**Área ventral:** Situada en la porción media del cuerpo de la célula, formada por cuatro placas, con frecuencia delgadas, transparentes y a veces ornamentadas. El sulcus se encuentra a su izquierda. Presente solamente en *Ceratium*.

**ARN:** Ácido nucléico formado por nucleótidos en los que los azúcares son ribosas y las bases nitrogenadas son Adenina, uracilo, citosina y guanina. 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 como el ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y un ARN nuclear heterogéneo (ARN hn).

**Atecadadas:** Formas carentes de pared celular incrustadas de sales cálcicas. No presentan valvas, poro apical, espinas, listas, y otras extensiones tecales. El protoplasma es retenido por una membrana celular y/o película

**Base de datos:** archivo de computo utilizado para almacenar y organizar datos, de forma tal que se pueda acceder fácilmente a la información, utilizando diferentes criterios de búsqueda.

**Base:** Compuesto que usualmente contiene nitrógeno y es capaz de aceptar un H<sup>+</sup>. Se emplea para designar los componentes de los nucleótidos que no son azúcares. Las cinco bases que constituyen los ácidos nucleicos son la Adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U).

**Biodiversidad:** es el término por el que se hace referencia a la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, resultado de miles de millones de años de Evolución según procesos naturales y también, de la influencia creciente de las actividades del ser humano. La biodiversidad comprende igualmente la variedad de ecosistemas y las diferencias genéticas dentro de cada especie que permiten la combinación de múltiples formas de vida, y cuyas mutuas interacciones y con el resto del entorno, fundamentan el sustento de la vida sobre el planeta

**Bioinformática:** Disciplina de almacenar y analizar datos biológicos uso de computadoras para analizar, guardar y acceder a secuencias de ADN y proteínas

**Biotecnología:** toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

**BLAST:** (Basic Local Alignment Search Tool): Programa de búsqueda de secuencias en bases de datos basándose en la similitud de las secuencias. Dentro de las principales características del algoritmo se encuentra la velocidad con la que realiza la búsqueda, ya que está diseñado para detectar rápidamente regiones similares en la secuencia sometida con las secuencias dadas de alta en las bases de datos.

**Blooms:** Incremento en la abundancia numérica de algún microorganismo fitoplanctónico pudiendo estar asociado a una discoloración del agua

**Cebador:** Una molécula (generalmente un polinucleótido) al cual la ADN polimerasa puede unir el primer desoxirribonucleótido durante la replicación del ADN.

**Cebadores universales:** Cebadores diseñados para unirse efectivamente a una gran variedad de taxas). Generalmente se encuentran diseñados en regiones altamente conservadas que varían ligeramente entre taxas (20 pb es común).

**Célula:** Unidad fundamental de la materia viva

**Celulosa:** es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa; es pues un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido); es rígido, insoluble en agua, y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de  $\beta$ -glucosa. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre.

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

**Cíngulo** conocido como depresión transversa: En células del tipo dinoconte, esta estructura es usualmente un canal o surco encerrando la célula una o varias veces. Si es varias veces el cíngulo está doblado alrededor de la célula y es considerado torsión.

**Citoplasma:** Porción fluida de una célula limitada por la membrana celular exceptuando el núcleo (si lo hay)

**Cloroplastos:** Orgánulos celulares que en los organismos eucariontes fotosintetizadores se ocupan de la fotosíntesis. Están limitados por una envoltura formada por dos membranas concéntricas y contienen vesículas, los tilacoides, donde se encuentran organizados los pigmentos y demás moléculas que convierten la energía luminosa en energía química.

**Cocoides:** estados no móviles del ciclo de vida usualmente refiriéndose a las células de fase vegetativas que dominan el ciclo de vida y pueden ser de pared gruesa.

**Conservación:** En biología molecular, preservación a través del tiempo de algunas bases o aminoácidos de la secuencia de un gen o de una proteína que está evolucionando.

**Cromosoma:** Un elemento genético, generalmente circular en procariontes y lineal en eucariotes, que lleva genes esenciales para el funcionamiento de la célula.

**Cuerno apical:** Extensión apical prominente en la célula, formada por platos apicales. Este solo se encuentra en dinoflagelados tectados y constituye un apéndice (apex) de la célula.

**Cuernos:** Prolongaciones sólidas, huecas o atenuaciones de las placas apicales, postcingulares y/o antapicales. Presente solamente en formas tectadas.

**Cultivo axénico o puro:** Un cultivo microbiano que contiene una única clase de microorganismo

**Delección:** Eliminación de una secuencia de ADN acompañada por la ligación de las regiones adyacentes.

**Desenquistamiento:** Cuando el hignocigoto madura y esta listo para producir una célula móvil a partir de la célula en reposo, un meosito desnudo emerge del arqueofilo o la apertura en la pared; esta célula emergente será flagelada o ameboide. Típicamente esta célula sufrirá meiosis y producirá 4 células vegetativas 1N que son móviles en la columna de agua.

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

**Desnaturalización:** Eliminación del plegamiento correcto de una proteína o de un ácido nucleico que es necesario para su funcionamiento normal. La desnaturalización de ácidos nucleicos implica la disociación de la doble cadena en cadenas sencillas.

**DGGE (electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente)** Técnica electroforética que puede separar fragmentos de ácidos nucleico del mismo tamaño pero de distinta secuencia

**Diatomeas:** Son el grupo mas diverso de microalgas abundantes, fotosintetizadores que viven en agua dulce o marina constituyendo una parte muy importante del fitoplancton. Uno de los rasgos característicos de las células de diatomeas es la presencia de una cubierta de sílice (dióxido de silicio hidratado) llamado frústulo.

**Dinoconte.** Un tipo de célula de los dinoflagelados en la cuál los dos flagelos están insertados ventralmente. Un flagelo es transverso y anidado en un cíngulo, el otro es longitudinal y anidado en el sulcus. El flagelo transversal provee propulsión y el flagelo longitudinal provee dirección.

**Dinoflagelado:** son un grupo de organismos eucarióticos unicelulares constituido por aproximadamente 3400 – 4 100 especies, representadas por más de 130 géneros y forman parte del plancton marino. Puesto que son productores primarios, constituyen una parte importante de la cadena alimenticia acuática.

**Dinoflagellata o Pyrrhophyta** es un extenso grupo de protistas, flagelados, fotosintéticos en su mayoría.

**Diploide:** Una célula o cigoto que posee un núcleo con dos juegos de cromosomas  $2N$ .

**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato i.e. nucleótido que consiste en un azúcar, una base nitrogenada y tres fosfatos.

**Dominio:** Región de una secuencia conservada evolutivamente que corresponde a una estructura tridimensional independiente asociada con una función particular.

**Dorsal:** El lado dorsal (atrás) de la célula tipo dinoconte que está opuesta al lado ventral o frontal donde se localiza el sulcus. Cuando se utiliza el microscopio de luz para observar dinoflagelados es importante saber si usted esta enfocando la superficie ventral o esta enfocando a través del lado dorsal el interior de la superficie ventral. En el último caso estará observando una imagen al revés.

**Electroforesis:** técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) según su movilidad, partículas disueltas o coloides sometidas a un campo eléctrico a través de una matriz porosa. La movilidad electroforética de una partícula depende de su tamaño, estructura tridimensional y carga eléctrica

**Endosimbiosis:** Una teoría que propone que la mitocondria y el cloroplasto fueron inicialmente bacteria de vida libre que establecieron una residencia permanente en las células eucarióticas primitivas, dando origen finalmente a la célula eucariótica moderna

**Enquistamiento:** Hay varios tipos de enquistamientos. Células estresadas pueden rodar y sedimentarse y aún así ser viables si las condiciones de estrés son removidas. Otros cistos temporales relacionados para reproducción sexual, flotación y otros aspectos funcionales de sobrevivencia individual, así otro tipo de enquistamiento se relaciona con reproducción sexual, y la producción de hignocigotos de pared gruesa los cuales pueden permanecer encapsulados por meses a un año. Estos cistos de resistencia, hoy hignocigotos poseen su propio sistema de clasificación distinguiéndose características morfológicas y terminología aplicada.

**Enzima de restricción:** Enzima que reconoce y rompe ADN de doble cadena en sitios específicos de la secuencia de ADN

**Enzima:** Proteínas catalíticas que funcionan acelerando las reacciones químicas

**Epicono:** Área superior al cingulum. Formas atecadas solamente.

**Epiteca** conocida como epicono o episoma: la parte anterior de la célula tipo dinoconta sobre el cingulo.

**Especie:** del latín *species* a cada uno de los grupos en que se dividen los géneros, es decir la limitación de lo genérico en un ámbito morfológicamente concreto. En biología, una especie es la unidad básica de la clasificación biológica.

**Espinas:** Protuberancias sólidas en la placa teical que usualmente se angostan hasta una punta, pueden ser cortas o largas, o anchas y angostas.

**Eucariota:** Una célula con un núcleo delimitado por una membrana nuclear y que en general presenta otros orgánulos, pertenecientes al dominio *Eukarya*.

**Eucarióticos:** Los organismos eucariotios son todos aquellos cuyas células tienen su material hereditario fundamental (su información genética) encerrado dentro de una doble membrana, la envoltura nuclear, que delimita un núcleo celular.

**Evolución:** Cambio de una línea de descendencia a lo largo del tiempo para dar origen a la producción de una nueva especie o variedad

**Extrusomas:** orgánulos limitados por membranas que se encuentran en las células de algunos eucariontes y que, bajo ciertas condiciones, descargan su contenido fuera de la célula. Hay distintos tipos, probablemente no homólogos, cuyas funciones son diversas. Entre ellos se incluyen: Mucocistos, nematocistos, toxicistos y tricocistos

**Fagocitar:** Proceso en el cual una partícula es englobada por una membrana citoplasmática y es internalizada.

**FAN:** Abreviación del término floraciones algales nocivas, empleado para designar la aparición de un grupo heterogéneo de microorganismos el cual puede ser percibido como dañino por los efectos adversos en el ambiente.

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

**Filogenia:** Relaciones evolutivas entre organismos

**Fisión binaria:** División celular que sigue al aumentar una célula dos veces su tamaño mínimo

**Fitoplancton:** Conjunto de microorganismos fotosintéticos que flotan en el medio acuático.

**Flagelado:** Son flageladas las células que tienen flagelos

**Flagelos:** apéndices locomotores que baten el líquido circundante con un movimiento generalmente helicoidal es un apéndice con forma de látigo usado para el movimiento presente en muchos organismos unicelulares

**Fotosíntesis:** Serie de reacciones en las que se produce la síntesis de ATP por reacciones energizadas por la luz y la fijación de CO<sub>2</sub> dando materia celular.

**Fotosintéticos:** Organismos que llevan a cabo la fotosíntesis y además son capaces de fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico, se les conoce como organismos fotoautótrofos o simplemente autótrofos.

**Gametos:** En especies armadas y no armadas, una célula 1N que se fusiona con otra 1N produce un cigoto 2N. Los gametos pueden ser células de tamaños similares y células morfológicamente similares, isogametos, o de tamaños diferentes y morfológicamente similares, anisogametos.

**Gen:** es el conjunto de una secuencia determinada de nucleótidos de uno de los lados de la escalera del cromosoma referenciado. La secuencia puede llegar a formar proteínas, o serán inhibidas, dependiendo del programa asignado para la célula que porte los cromosomas. Un segmento de ADN o ARN esencial para que se lleve a cabo una función específica.

**Género:** Una colección de especies diferentes, que comparten una o mas propiedades (generalmente varias propiedades)

**Genoma:** Contenido genético completo de una célula u organismos; incluyendo cromosomas, plásmidos y profagos. Información completa de un organismo.

**Genotipo:** Composición genética de un organismo

**Hábitat:** Lugar de residencia de una población en un medio

**Haploide:** Célula vegetativa o gamética que posee un juego de cromosomas.

**Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH):** Método que emplea un colorante fluorescente incorporado a una sonda nucleotídica específica para localizar secuencias de ADN en cromosomas o detectar ADN.

**Hibridación:** Formación de un dúplex de ácido nucleico con bandas que proceden de diferentes fuentes mediante apareamiento de bases complementarias

**Hipnozigote conocido como dinocisto:** es un estado cigótico diploide en el ciclo de vida sexual de los dinoflagelados. Todos a excepción de una especie de dinoflagelado es un aplonte con el planocigoto y el hignocigoto siendo el único estado 2N. Los dinoflagelados con hignocigoto son típicamente dimórficos en el cuál los estados de cigotos 1N y 2N son morfológicamente distintos.

**Hipocono:** Área inferior al cingulum. Formas atecadas solamente.

**Hipoteca:** Parte posterior de una célula del tipo dinoconte debajo del cingulo lateral. La vista lateral de una célula es el lado izquierdo o derecho el cuál usualmente representa el contorno o profundidad de la célula. Formas tecadas solamente.

**Histonas:** Las histonas son unas proteínas pequeñas que están en el núcleo. Son muy básicas lo que les facilita unirse al ADN para ejercer su función de empaquetarlo formando parte de la cromatina.

**Homología:** Medida cualitativa que establece una relación evolutiva entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas. La homología le atribuye un origen evolutivo (no azaroso) a la existencia de similitudes entre las secuencias comparadas.

**Ingeniería genética:** Uso de técnicas *in Vitro* para conseguir el aislamiento, manipulación, recombinación y expresión del ADN, así como para desarrollar organismos genéticamente modificados

**Inserción:** (1) mutación cromosómica que implica la eliminación de un segmento de un cromosoma, su rotación a 180° y su reinserción en el mismo lugar. (2) mutación (generalmente acompañada por una deleción) en la que uno o más nucleótidos son insertados en una secuencia de ADN.

**Isoenzimas:** son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química. Estas enzimas suelen mostrar diferentes parámetros cinéticos (*i.e.* diferentes valores de  $K_M$ ), o propiedades de regulación diferentes. La existencia de las isoenzimas permite el ajuste del metabolismo para satisfacer las necesidades particulares de un determinado tejido o etapa del desarrollo.

**Loci:** *Plural de locus*

**Locus** (del latín *locus*, lugar; plural *loci*) es una posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen o de un biomarcador (marcador genético). Una variante de la secuencia de ADN en un determinado locus se llama alelo

**Marcadores genéticos:** Un marcador molecular es un segmento de ADN en el cromosoma con una localización física identificable y cuya herencia puede ser rastreada. Un marcador puede ser un gen o alguna sección del ADN con función desconocida

**Mareas rojas:** Se refiere al fenómeno bio-óptico del cambio en la coloración del agua por acción de un incremento en la biomasa fitoplanctónica.

**Medio de cultivo:** Una solución acuosa de varios nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos.

**Meiosis:** Proceso de división nuclear durante la gametogénesis en el que la replicación pasa de dos (diploide) a una sola copia de cada cromosoma (haploide)

**Membrana citoplasmática:** Barrera con permeabilidad selectiva que envuelve al citoplasma y lo separa del entorno

**Mesocarión:** Núcleo de los dinoflagelados el cual posee características tanto de organismos eucariotas como proariotas.

**Microalgas:** algas microscópicas unicelulares, de tamaños y formas muy variadas. La mayor parte son de hábitat acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas. La mayoría de las microalgas son organismos fotosintéticos aunque algunos pueden comportarse como organismos heterotróficos y mixotróficos.

**Mitocondrias:** son orgánulos, presentes en prácticamente todas las células eucariotas, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular; actúan por tanto, como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP por medio de la fosforilación oxidativa. Realizan, además, muchas otras reacciones del metabolismo intermediario, como la síntesis de algunos coenzimas. Es notable la enorme diversidad, morfológica y metabólica, que puede presentar en distintos organismos.

**Morfología:** forma celular

**Mutación:** Cambio heredable en la secuencia de bases del genoma de un organismo

**Núcleo:** Una estructura rodeada por una membrana que contiene los cromosomas en células eucarióticas

**Nucleótido:** Un monómero de un ácido nucleico que contiene una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo), una molécula de fosfato y un azúcar, bien sea ribosa (ARN) o desoxirribosa (ADN)

**Par de bases (Pb):** Unidad de medida del ADN de doble cadena.

**Parásitos:** relación simbiótica (entre distintas especies) en la que el parásito es dependiente metabólicamente de su hospedador y no es beneficiosa para éste.

**PCR en tiempo real:** PCR en tiempo real, es una modificación a la técnica de PCR, en la que no se realiza electroforesis, de tal forma que los resultados se obtienen simultáneamente con la amplificación de los productos. Se realiza utilizando un marcador que produce fluorescencia al unirse al ADN de cadena doble, esto se monitorea con un equipo que la detecta al tiempo que genera una curva de la intensidad de la fluorescencia contra la temperatura de cada ciclo. El primer incremento significativo en la cantidad de productos de PCR se correlaciona con la cantidad total de templado de ADN disponible originalmente.

**PCR:** ver Reacción en Cadena de la polimerasa.

**Pedúnculo:** Es un apéndice citoplasmático localizado cerca del poro flagelar en algunas especies fotosintéticas y no fotosintéticas. Es una organela extensible asociada con fagotrofia y puede tener también otras funciones.

**Pigmentos:** Clorofila a, c<sub>2</sub>, betacaroteno, peridinina, fucoxantina, y sus derivados, y otras xantofilas. Algunas especies con clorofila c<sub>1</sub>, clorofila b, ficobiliproteínas, y otros pigmentos como por ejemplo el 19'hexanoyloxy-fucoxanthin asociado con simbiontes nuevos o viejos.

**Placa:** Cada una de las pequeñas piezas que unidas por sus bordes, a manera de mozaico, constituyen el cuerpo de un dinoflagelado. Su superficie puede hallarse esculpida y sus suturas revestir grados diversos de complejidad.

**Placas tecales:** Son placas de dinoflagelados armados, están compuestas de celulosa o algún polisacárido microfibrilar. Estas placas fueron formadas en vesículas.

**Pláncton:** Se denomina plancton (del griego πλαγκτός, *plagktós*, "errante") al conjunto de organismos, principalmente microscópicos, que flotan en aguas saladas o dulces, más abundantes hasta los 200 metros de profundidad aproximadamente.

**Planozigotos:** un cigoto móvil 2N producido por la fusión de gametos 1N. Típicamente el planocigoto es morfológicamente similar a la célula vegetativa 1N.

**Plástidos:** Son organelos característicos de las células eucarióticas vegetales. Sus tamaños pueden variar, están envueltos por una doble membrana que a la vez lo delimita y tienen ribosomas semejantes a los de los procariontes. Se forman a partir de proplastos, que son los plástidos de células jóvenes. Se caracterizan por tener microgotas de lípidos y por poseer material genético propio.

**Poblaciones:** grupo de organismos de una especie particular, que viven en una área geográfica, o espacio

**Polimerasa:** es una enzima que cataliza la síntesis de ácidos nucleicos a partir de templados de ácidos nucleicos preexistentes, formado ARN a partir de ribonucleótidos o ADN a partir de desoxirribonucleótidos..

**Polimorfismos:** describe múltiples y posibles estados de una única propiedad. En biología, un polimorfismo genético son los múltiples alelos de un gen entre una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos

**Poros apical:** Orificio presente en el Ápice de la epiteca.

**Poros ventral:** En algunos Gonyaulacales un poro ventral puede estar presente en la unión de la primera placa apical 1' y en la intercalar anterior, u otra placa apical. Algunas veces el poro está en una de las placas apicales o en una intercalar. La presencia de un poro ventral en su localización puede ser característica diagnóstica para ciertas especies.

**Productor primario:** Organismo que utiliza la luz para sintetizar materia orgánica a partir de CO<sub>2</sub>.

**Púscula:** Organela con complejo variable el cuál puede ser observado como una vacuola especializada que se abre a través de la superficie celular usualmente en el área flagelar.

**RAPDS:** Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar (RAPD, por sus siglas en inglés). Es una técnica que se basan en el uso de cebadores cortos, únicos (8-10 bases), con una secuencia aleatoria, para la amplificación de un promedio de 3 a 10 regiones de ADN de forma simultánea, analizándose el resultado con base en la presencia-ausencia de fragmentos amplificados de un tamaño específico.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** procedimiento *in Vitro* que genera millones de copias de un fragmento de ADN específico por medio de la repetición de una reacción que involucra a la ADN polimerasa.

**Región o cara ventral:** Es la que contiene al sulcus. La opuesta es la dorsal.

**RFPL:** El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el uso de endonucleasas de restricción, enzimas que cortan el ADN al reconocer secuencias nucleotídicas específicas, generando fragmentos de ADN, que pueden ser separados electroforéticamente y visualizadas por diversos mecanismos.

**Ribosoma:** Partícula intracelular compuesta de ARNr y de proteínas que constituyen el sitio de iniciación de la traducción de los ARN mensajeros.

**Secuencia consenso:** Secuencia idealizada en la que cada base representa la base más comúnmente encontrada en esa posición cuando se comparan secuencias reales.

**Secuenciación:** determinación del orden de nucleótidos (bases) en una molécula de ADN o de ARN o del orden de aminoácidos en una proteína.

**Similitud:** es el resultado de una medida cuantitativa basado en una observación empírica, mientras que homología es una hipótesis basada en la similitud e secuencias u en otros datos biológicos sobre el origen de estas. La similitud puede definirse en porcentaje.

**Single cell PCR:** método simplificado que integra procedimientos de extracción de ADN y PCR en un solo tubo, seguido de secuenciación directa de los productos sin purificar

**Sonda moleculares:** Oligonucleótido corto y de secuencia única que se emplea como sonda de hibridación para la identificación de microorganismo

**SSCP Single Strand Conformation Polymorphism** El método básicamente consiste en la separación electroforética de esta cadena sencilla de ácido nucleico, basado en la diferencia de bases en su secuencia, cuyo efecto es una diferencia en estructura secundaria detectable en su movilidad en el gel. Incluso, el cambio en una sola base en la secuencia puede afectar la estructura secundaria y por lo tanto la movilidad en el gel.

**Sulcus:** Es el área longitudinal en la superficie ventral de la célula que forma más o menos una hendidura pronunciada o una depresión que da cabida al flagelo longitudinal. En algunas especies armadas, el sulcus, el cual está principalmente en la hipoteca, invade la hipoteca y la epiteca como una placa "la anterior sulcal". En especies no armadas puede estar asociada con una hendidura apical que posee su origen anteriormente.

**Surgencias:** son un fenómeno oceanográfico que consiste en el movimiento vertical de las masas de agua, de niveles profundos hacia la superficie.

**Tabulación** se refiere al conteo de las placas en series designadas específicas. En el sistema Kofoidiano de nomenclatura de placas hay seis principales series transversales, apical (') prima, anterior intercalar (a), precingular ("), postcingular ("), posterior intercalar (p), y antiapical ("").

**Taxonomía:** La ciencia de la identificación, clasificación y nomenclatura.

**Teca:** Complejo de membranas múltiples con vesículas, algunas especies con escamas. Conocida como anfiesma, 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.. .

**Tm:** temperatura a la cual se espera que el cebador se una al menos al menos la mitad de los posibles sitios de unión

**Toxina:** Es un compuesto el cual tiene un efecto fisiológico adverso en un organismo vivo, aun cuando es aplicado en pequeñas cantidades. Un compuesto puede ser llamado toxina si este cumple con tres premisas: debe presentarse en plantas, animales o bacterias, debe ser ajeno a la víctima y debe ser tóxico y adverso al bienestar o vida de la víctima.

**Transición:** Sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina.

**Transversión:** Sustitución de una purina por una pirimidina o de una pirimidina por una purina

**Tricocisto:** Son organelas eyéctiles. Estructuralmente tienen unos componentes llamados el cuerpo anterior y el opérculo anterior, que están a su vez divididos en partes identificables, que están arreglados radial o subradialmente en la célula.

**Ventral:** el lado ventral de las células tipo dinocontas está identificado por la presencia del sulcus y de la unión del cíngulo y el sulcus. También es el lugar de inserción flagelar en dinocontes.