



# **Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur**

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012

.....

Editores: Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota





# **Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur**

Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado  
2008-2012

*Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota*

Editores



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

*Diseño gráfico*  
Liliana Ramírez B.

*Diseño editorial*  
Mónica Pérez-Ramírez

*Edición de textos en inglés*  
Diana Leticia Dorantes Salas

**Biodiversidad y vulnerabilidad de ecosistemas costeros en Baja California Sur.  
Aportaciones de estudiantes de grado, posgrado y posdoctorado 2008-2012.**  
Editado por Mónica Pérez-Ramírez y Salvador E. Lluch-Cota.

Primera edición 2012  
D.R.© Publicación de divulgación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja  
California Sur, México, 23096

ISBN 978-607-7634-07-2

Hecho en México

“Las opiniones expresadas por los autores (textos, figuras y fotos) no necesariamente reflejan la postura de la institución editora de la publicación”

---

# *Contenido*

Agradecimientos

Presentación

Tutores participantes

## Primera Parte

### MIDIENDO LA BIODIVERSIDAD

<b>Capítulo 1</b>	1
Desarrollo y evaluación de métodos moleculares para la detección e identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las costas de Baja California Sur	
Angélica Herrera-Sepúlveda	
<b>Capítulo 2</b>	25
Efecto de <i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943) productor de toxinas paralizantes (PSP) sobre la expresión genética del ostión del Pacífico	
<i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793)	
Norma García-Lagunas	
<b>Capítulo 3</b>	51
Respuesta del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) a la exposición aguda y sub-crónica a <i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg, 1860) Stein 1975, productor de toxinas diarreicas, mediante el seguimiento de la expresión de genes específicos	
Reyna Romero	
<b>Capítulo 4</b>	76
Asincronía en la especiación asociada con el levantamiento del Istmo de Panamá: el caso de los haemúlidos	
Jose Tavera	

	<b>Capítulo 5</b>	
Ecomorfología y evolución de la familia Pomacentridae (Perciformes: Labroidae) en el Pacífico Oriental		94
	Rosalía Aguilar-Medrano	
	<b>Capítulo 6</b>	
Composición temporal del fitoplancton en ambiente de arrecife costero en el sureste de la Península de Baja California		122
	Alejandra Torres-Ariño	
	<b>Capítulo 7</b>	
Variabilidad temporal de los ensamblajes de macroalgas en arrecifes rocosos de Bahía de Loreto		145
	Alejandra Mazariegos-Villarreal	
	<b>Capítulo 8</b>	
Macroalgas en bancos abuloneros de la costa occidental de Baja California Sur		165
	Alma Rosa Rivera-Camacho	
	<b>Capítulo 9</b>	
Variación espacio-temporal de la densidad de <i>Acanthaster planci</i> (Echinodermata: Asteroidea) en el Golfo de California		183
	Daniela A. Murillo-Cisneros	
	<b>Capítulo 10</b>	
Estructura comunitaria de asteroideos (Echinodermata: Asteroidea) en Bahía de Loreto		199
	Fabián Cervantes-Gutiérrez	
	<b>Capítulo 11</b>	
Variación estacional, contenido energético y biomarcadores lipídicos –ácidos grasos- de la comunidad planctónica de Balandra, Baja California Sur en un ciclo anual		218
	Nayeli Pedroza-Martínez	

	<b>Capítulo 12</b>	
Variación espacial de la estructura de las comunidades de peces de arrecife en la costa oeste del Golfo de California		230
	Alejandro Aldana-Moreno	

	<b>Capítulo 13</b>	
Señales isotópicas del $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de <i>Megastraea undosa</i> (Wood, 1828), <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) y algunas de sus fuentes de alimento		245
	M. Magali Gómez-Valdez	

	<b>Capítulo 14</b>	
Dieta natural de <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby, 1825) en arrecifes rocosos de la costa Pacífico de Baja California Sur		256
	Fatima Aguilar-Mora	

	<b>Capítulo 15</b>	
Condición fisiológica de la almeja generosa, <i>Panopea globosa</i> , en Bahía Magdalena, BCS		269
	Laura Margarita Cruz-Gómez	

	<b>Capítulo 16</b>	
Relación trófica entre los peces de arrecife y manglar en La Paz, BCS		284
	Samuel Calderón-Liévanos	

## Segunda Parte

### RELACIONANDO LA BIODIVERSIDAD CON LA VULNERABILIDAD DE LOS ECOSISTEMAS

	<b>Capítulo 17</b>	
Macroalgas en el arrecife del Canal de San Lorenzo BCS después del impacto del buque Lázaro Cárdenas II y el huracán Juliette		296
	Tonatiuh Chávez-Sánchez	

	<b>Capítulo 18</b>	
Revisión del conocimiento actual sobre florecimientos macroalgales en lagunas costeras del Golfo de California		310
	Alejandra Piñón-Gimate	

	<b>Capítulo 19</b>	
Reclutamiento coralino en un arrecife restaurado en La Paz, BCS		330
	Rafael Andrés Cabral-Tena	
	<b>Capítulo 20</b>	
Elementos de dinámica poblacional para el manejo de peces damisela del Golfo de California		346
	Julio Ayala-Aguilar	
	<b>Capítulo 21</b>	
Análisis de la comunidad íctica posterior a un evento de perturbación antropogénica en arrecife de San Lorenzo, Bahía de la Paz, BCS		359
	Briseida Mejía-Torres	
	<b>Capítulo 22</b>	
Estructura de la comunidad íctica de manglar en tres sistemas (Balandra, Enfermería y Zacatecas) y dos periodos (1980 y 2010) en relación con el grado de influencia antrópica		375
	Francisco J. López-Rasgado	
	<b>Capítulo 23</b>	
Pesca incidental en la pesquería de pelágicos menores en el noroeste de México		399
	Sergio Macías-Mejía	
	<b>Capítulo 24</b>	
Índice de fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante el impacto de la pesca de arrastre		412
	Pablo Vega-García	
	<b>Capítulo 25</b>	
Certificación pesquera en países en desarrollo: tópicos recientes y perspectivas de implementación		428
	Mónica Pérez-Ramírez	



---

## *Agradecimientos*

Agradecemos a CONACYT, ya que su apoyo fue primordial para la realización de este libro. Por un lado, la mayoría de los autores fueron beneficiados con becas de posgrado. Por otra parte, el proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros* otorgó el financiamiento que permitió realizar parte de los estudios aquí presentados, y su integración. Otras fuentes importantes de subvención fueron: 1) proyecto SEP-CONACYT 83442 *Identificación molecular y estudio de la regulación de la expresión diferencial de genes, en el ostión del Pacífico Crassostrea gigas, en respuesta a exposición a toxinas marinas*; 2) proyecto CONACYT 50589 *Disponibilidad y aprovechamiento de macroalgas y pastos marinos en ecosistemas altamente productivos*; 3) proyecto CONABIO CT001 *Programa de monitoreo de la restauración de arrecife coralino afectado por el Buque Tanque Lázaro Cárdenas II, y de las comunidades arrecifales de la región del Parque de Loreto, Baja California Sur*; 4) proyecto CONACYT 126574 *Recursos pesqueros masivos de México ante el cambio climático*; 5) proyecto SIP 20121034 *Desempeño productivo de captura y económico-financiero de la pesca deportivo-recreativa de la zona de Los Cabos, B.C.S., México*; 6) proyecto COBI *Uso y manejo de especies de peces e invertebrados de ornato en el Parque Nacional Marino Bahía de Loreto* y 7) proyectos CONANP *Estudio técnico: Desarrollo microregional dentro del marco del área natural protegida Cabo San Lucas* y *Estudio técnico: Análisis y perspectivas para el desarrollo económico y diversificación de actividades dentro del marco del área natural protegida Cabo Pulmo*.

Expresamos nuestro agradecimiento a las instituciones donde los autores estudian y llevan a cabo sus investigaciones: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad

del Mar (UMAR) y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Así como a las instituciones nacionales y en el extranjero que se vinculan a este proyecto proveyendo expertos en diferentes disciplinas para la conformación de comités tutoriales: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidades Mazatlán y Guaymas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN (CICIMAR), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Instituto de Ecología (INECOL), Curtin University, Marine Biological Association (MBA), Universidad Nacional de Colombia, University of California, Université de Liège, UPMC Banyuls y SCRIPPS Institution of Oceanography (SIO).

No podemos dejar de reconocer las aportaciones que han brindado todos y cada uno de los integrantes de los comités tutoriales en CIBNOR: Bertha O. Arredondo Vega, José Alfredo Arreola Lizárraga, Felipe Ascencio Valle, Eduardo F. Balart Páez, Luis Felipe Beltrán Morales, Thelma Castellanos Cervantes, Pedro Cruz Hernández, Juan Antonio de Anda Montañez, Norma Y. Hernández Saavedra, Ana María Ibarra Humphries, Alfonso Maeda Martínez, Enrique Morales Bojórquez, Lourdes Morquecho Escamilla, Gopal Murugan, Alejandra Piñón Gimete, Elisa Serviere Zaragoza, María Teresa Sicard González y Dariel Tovar Ramírez.

Gracias a las personalidades que participan en los comités desde otras instituciones en México: Reyna Alvarado Jiménez, Francisco Becerril Bobadilla, Francisco Benítez Villalobos, Rolando Cardeña López, Gerardo Ceballos Corona, José de la Cruz Agüero, Efraín de Luna, Pablo del Monte Luna, Lloyd Findley, Alma Lilia Fuentes Farías, Silvia Alejandra García Gasca, Gustavo Hernández Carmona, Luis Hernández Moreno, Liliana Hernández Olalde, Eduardo Herrera Galindo, Sharon Herzka Llona, Volker Koch, Antonio López Serrano, Juan Manuel López Vivaz, Daniel Lluch Belda, Marco Antonio Medina,

Germán Ponce Díaz, Héctor Reyes Bonilla, Rafael Riosmena Rodríguez y Oscar Trujillo Millán. En el extranjero: Arturo Acero Pizarro (Colombia), Giacomo Bernardi (Estados Unidos), Jixin Chen (Reino Unido), Bruno Frédéricich (Bélgica), Philip A. Hastings (Estados Unidos), Linda Medlin (Francia), Bruce Phillips (Australia) y Declan Schroeder (Reino Unido).

El trabajo en campo, en laboratorio y en las colecciones fue apoyado por el personal técnico del CIBNOR: Jorge Angulo Calvillo (capítulos 11, 15, 22), Jesús Bautista Romero (15, 22, 23, 24), Horacio Bervera León (7, 15, 17, 19), Noemí Bocanegra Castillo (12, 21), Enrique Calvillo Espinoza (11, 22), Lucía Campos Dávila (4, 5, 12, 21), Laura Carreón Palau (11), Mario Cota Castro (7, 17, 19, 21), Roberto Hernández Herrera (15), Alejandra Mazariegos Villareal (8, 13, 14, 17), Carlos Pacheco Ayub (15, 22, 23, 24), Juan José Ramírez Rosas (7, 8, 13, 19, 21), Delia Irene Rojas Posadas (1, 2, 3, 6) y Arturo Sierra Beltrán (2, 3, 6). Asistencia en otras colecciones biológicas: José de la Cruz Agüero y Víctor Cota Gómez (CICIMAR), Rick Feeney (Los Angeles County Museum), Sandra J. Raredon (Museum of Natural History Smithsonian Institution) y H. J. Walker (SIO). Los autores también agradecen a los compañeros y amigos que participaron directa o indirectamente en los 25 estudios comprendidos en esta obra.

---

## *P r e s e n t a c i ó n*

Diversos foros mundiales han resaltado la necesidad de conciliar la biodiversidad (entendida como la variedad de organismos y ecosistemas) con el factor humano puesto que la biodiversidad representa beneficios ecológicos y socioeconómicos para las generaciones actuales y futuras. Este libro es presentado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y financiado por la Secretaría de Educación Pública (SEP) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto SEP-CONACYT 83339 *Biodiversidad y vulnerabilidad en ecosistemas marinos costeros*. La obra compila una serie de tesis recientes que examinan la biodiversidad en los ambientes costeros de Baja California Sur y el Golfo de California. La importancia de estas contribuciones radica en generar dos vertientes de conocimiento para la región: por un lado, mediciones de biodiversidad, que abarcan desde número y composición de especies hasta identificación genética y dominios tróficos. Por otra parte, la relación entre biodiversidad y vulnerabilidad de los ecosistemas en el entendido que los factores ambientales y las actividades humanas provocan impactos y cambios en los ecosistemas y las especies que en ellos habitan.

La historia geológica y evolutiva, la interacción de condiciones ambientales y la diversidad de ecosistemas costeros hacen de Baja California Sur lugar de residencia estacional o permanente para un elevado número de especies acuáticas; algunas de ellas endémicas de la región, esto es, que no se encuentran en ninguna otra parte del mundo. Esta diversidad de ecosistemas costeros se debe a características geográficas, climáticas y topográficas propias de la región. Por ello la marcada diferencia entre ambientes de alta energía situados en el Océano Pacífico y ambientes protegidos en el Golfo de California. Unido a esto consideremos un grado todavía moderado de explotación humana y tendremos

modelos excepcionales de estudio: ecosistemas arrecifales coralinos y rocosos, sistemas submareales rocosos asociados a bosques de macroalgas, lagunas costeras y manglares, que han sido escenarios para la recolección o censos de organismos, el registro de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, clorofila, nutrientes) y ensayos *in situ* con organismos móviles.

Contar con información que permita mejorar el entendimiento de la relación entre biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas es importante para analizar procesos naturales, determinar beneficios y costos ambientales, y pronosticar la respuesta de los ecosistemas ante variaciones climáticas y presión antropogénica. Esta información biológica al interactuar con otras disciplinas (*p. ej.* administración, economía), debe funcionar como marco de referencia para proponer medidas de manejo en materia de biodiversidad tal y como lo sugieren distintos instrumentos y convenios internacionales. En nuestro país, múltiples dependencias federales y estatales, organizaciones no gubernamentales, universidades y centros públicos de investigación llevan a cabo estudios sobre biodiversidad.

Es así como el CIBNOR, en su carácter de centro público CONACYT, produce e integra conocimientos científicos sobre impactos ambientales y antropogénicos y prepara recursos humanos especializados en manejo y conservación de recursos naturales. El proyecto SEP-CONACYT 83339, así como otros proyectos asociados a la Línea Estratégica CIBNOR EP3 *Variabilidad y vulnerabilidad de ecosistemas marinos del noroeste mexicano*, apoyaron la generación de recursos humanos para alcanzar diferentes grados académicos. Sus aportaciones, que exhiben la frescura y energía de jóvenes comprometidos con su investigación, se vieron enriquecidas con la experiencia de sus comités tutoriales conformados por científicos nacionales e internacionales, fortaleciendo las redes de cooperación y la línea de investigación en CIBNOR.

El presente libro, resultado y muestra de lo arriba expuesto, está constituido por veinticinco capítulos organizados en dos partes que en conjunto ofrecen conocimiento científico y teórico sobre la diversidad de especies y su vulnerabilidad ante algunos eventos ambientales e impactos antropogénicos. En la primera parte, se exploran mediciones de biodiversidad en sistemas costeros empleando técnicas moleculares (genética) y métodos tradicionales (taxonomía, índices de variación y relaciones tróficas). Las técnicas moleculares aquí presentadas sirven para monitorear mareas rojas (proliferación de microalgas tóxicas) y sus efectos en mariscos dirigidos a consumo humano y con importancia económica para la región. También se utilizaron técnicas moleculares para estudiar las relaciones de parentesco entre especies de peces, bajo el fundamento de que este ensamblaje de especies es un modelo que aporta pistas sobre la evolución de la vida.

Ante la necesidad de cuantificar la biodiversidad y compararla temporal (épocas del año) y espacialmente (tipos de ecosistema), los Capítulos 6, 7 y 8 abordan la composición y la estructura de comunidades productoras primarias, es decir, productoras de oxígeno: el fitoplancton y las macroalgas mientras que los Capítulos 9 y 10 tratan sobre organismos depredadores de arrecifes de coral. Estos estudios permiten conocer qué especies están presentes, qué patrones exhiben y qué factores influyen en su distribución (temperatura, nutrientes, etc.). Para comprender como es la circulación de nutrientes y energía en algunos sistemas acuáticos, se realizaron análisis tróficos con moluscos y peces.

La segunda parte del libro trata sobre la comprensión del rol de la biodiversidad en el funcionamiento de diversos ecosistemas costeros y su vulnerabilidad considerando la influencia ambiental y/o antropogénica. Así, tenemos como agentes de cambio: el encallamiento de un buque, el paso del huracán Juliette, los florecimientos algales, la instauración de arrecifes artificiales, la extracción de peces de ornato y la pesca comercial. Los Capítulos 17, 18, 19 y 21 tocan

temas como la situación específica de algunos recursos en arrecifes rocosos y coralinos tras el impacto del huracán; la relación entre productores de oxígeno y nutrientes generados por actividad humana en las costas y las necesidades futuras de investigación. También se ha integrado un estudio de caso para examinar los cambios en la comunidad de peces a través de comparaciones espaciales y temporales en tres sitios con diferente grado de impacto humano (Capítulo 22).

En los últimos años, la explotación de recursos se ha intensificado incidiendo en la biodiversidad de los ecosistemas. Los dos capítulos finales presentan algunas aplicaciones que ya integran conocimientos previos en materia de biodiversidad e impactos, en este caso, producidos por la actividad pesquera. En primera instancia, se propone un índice que expresa la fragilidad ecológica de los ecosistemas bentónicos ante la pesca de arrastre. A continuación, la certificación, una herramienta de manejo pesquero reconocida internacionalmente cuyo objetivo es fomentar la pesca sustentable y el menor daño ambiental.

Suele aceptarse que sin investigación científica sobre la diversidad, que sin generar el conocimiento que permita comprender mejor la vulnerabilidad de los ecosistemas y, por ende, articular aproximaciones adecuadas e integrales a los mismos, toda explotación sustentable y la conservación misma serían inviables en el corto o mediano plazo. Es por ello que un libro como el presente, que comunica la investigación recientemente generada en el CIBNOR sobre esta temática, contribuirá a elucidar la respuesta de ecosistemas particulares ante el creciente aumento de la presión generada por las variaciones climáticas y el desarrollo humano.

Consideramos, pues, que el libro ha de ser de interés para todo aquél preocupado —y ocupado— en conocer, aprovechar y conservar la elevada biodiversidad costera de Baja California Sur.

---

## *Tutores participantes*

Línea estratégica EP.3 CIBNOR y Proyecto SEP-CONACYT 83339

### **Bertha O. Arredondo Vega**

Investigador Titular A del CIBNOR, trabaja el tema de metabolismo de ácidos grasos en fitoplancton marino y el papel que desempeñan como biomarcadores de cadena trófica (FATM, por sus siglas en inglés) en ecosistemas marinos costeros.  
[kitty04@cibnor.mx](mailto:kitty04@cibnor.mx)

### **Eduardo F. Balart Páez**

Es biólogo por la Universidad Católica de Valparaíso, Maestro por la Universidad de Kyoto, y Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Su interés se ha centrado en el estudio de la biodiversidad, sistemática y ecología de los peces asociados a manglares, arrecifes, plataforma y talud continental; evaluación y biología de recursos pesqueros potenciales; así como en la ecología y restauración de arrecifes. Es autor de 60 publicaciones y en total ha dirigido 26 tesis de licenciatura hasta doctorado. Actualmente es Investigador Titular en el Programa de Ecología Pesquera, Curador de la Colección Ictiológica, y responsable del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes del CIBNOR. Es miembro del SNI Nivel I.  
[ebalart04@cibnor.mx](mailto:ebalart04@cibnor.mx)

### **Liliana Hernández Olalde**

Es Bióloga Marina (UABCS-2000), con Maestría en Manejo de Recursos Marinos (2003) y Doctorado en Ciencias Marinas (2008) otorgados por el CICIMAR-IPN; Estancia Posdoctoral CIBNOR (2011). Es candidata del SNI. Su investigación se enfoca en la reproducción de animales marinos, especialmente peces: determinación del sexo, maduración gonádica, comportamiento reproductivo y cuidado parental. Ha participado en diversos proyectos de investigación, publicado artículos en revistas especializadas y presentado trabajos en congresos nacionales e internacionales. Ha dirigido y participado en tesis de licenciatura y posgrado. En el programa de licenciatura (Biología Marina-UABCS) ha impartido cursos sobre biología celular y reproducción.  
[lilianah@uabcs.mx](mailto:lilianah@uabcs.mx)



**Norma Y. Hernández Saavedra**

Es Bióloga egresada de la FES Iztacala (UNAM). Estudio la Maestría en Ecología Marina en el CICIMAR (IPN) y el Doctorado en uso, manejo y preservación de los recursos naturales, con especialidad en Biotecnología, en el CIBNOR. Ha realizado estancias de investigación en Universidad de Oviedo, España y en el IGBMC (Université Louis Pasteur), en Francia. Es miembro del SNI Nivel II e Investigador Titular en el CIBNOR, donde imparte cátedra en Microbiología, Biología Molecular y Celular e Ingeniería Genética. Sus intereses de investigación son la biotecnología y la aplicación de técnicas moleculares para el aprovechamiento y manejo de recursos naturales. Sus proyectos han sido financiados por diversas fuentes, resultando en la publicación de artículos en revistas internacionales indexadas y en la formación de recursos humanos de nivel licenciatura, maestría y doctorado.

[nhernan04@cibnor.mx](mailto:nhernan04@cibnor.mx)

**Salvador E. Lluch-Cota**

Es Biólogo Marino por la UABCS, Maestro en Ciencias por el CICIMAR-IPN y Doctor en Ciencias por el CIBNOR. Se ha desempeñado como coordinador de varios proyectos de investigación en las áreas de variabilidad climática y sus efectos en recursos marinos. Cuenta con más de 25 publicaciones científicas internacionales, diversos capítulos de libro e informes técnicos. Ha dirigido cinco tesis de Licenciatura, cuatro de Maestría y cuatro de Doctorado. En 2007 fue acreedor del Premio Nacional de Ciencia en la categoría Científico Joven. Es miembro fundador de la Sociedad Mexicana de Pesquerías e integrante del SNI Nivel II.

[slluch@cibnor.mx](mailto:slluch@cibnor.mx)

**Alejandra Piñón Gimete**

Realizó estudios de posgrado en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Durante el doctorado trabajó con florecimientos macroalgales y su relación con nutrientes de tipo antropogénico en lagunas costeras del estado de Sinaloa. Ha participado en varios proyectos y comités tutoriales como investigador asociado en el CIBNOR. Actualmente, se encuentra en el segundo año de estancia posdoctoral en el mismo centro, bajo la dirección de la Dra. Elisa Serviere, desarrollando investigación sobre florecimientos macroalgales de la Bahía de La Paz. Es Candidata del SNI.

[apinon@cibnor.mx](mailto:apinon@cibnor.mx)

**Elisa Serviere Zaragoza**

Realizó estudios de licenciatura, maestría y doctorado en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en la línea de Botánica Marina. Trabajó como Profesor Asociado en el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias, UNAM, y actualmente es Investigador Titular del CIBNOR y miembro del SNI Nivel II. Sus líneas de investigación son Ecología Marina y Ecología Trófica. Cuenta con 48 publicaciones, 7 capítulos de libro y un Catálogo Onomástico (Nomenclátor) de las algas bentónicas marinas de México. Ha participado en la formación de alumnos de licenciatura (12) y de posgrado (14). Desde 2009, es Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR.  
[serviere04@cibnor.mx](mailto:serviere04@cibnor.mx)



---

De izquierda a derecha: Eduardo F. Balart Páez, Elisa Serviere Zaragoza, Norma Y. Hernández Saavedra, Salvador E. Lluch-Cota y Liliana Hernández Olalde

Formación de recursos humanos.

Capítulo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Grado	D	D	D	D	D	D	M	L	L	L	L	M	L	L	M	L	L	P	M	L	L	D	M	M	D	
Estatus	c	c	c	c	t	c	t	t	t	t	c	t	t	t	c	c	t	c	t	c	c	c	t	t	t	
Bertha O. Arredondo Vega											d															
Eduardo F. Balart Páez				d	d			d	d	d	d				a		a	d	d		d	a				
Liliana Hernández Olalde*																d					d					
Norma Y. Hernández Saavedra			d	d	d																					
Salvador E. Lluch Cota						a				a					d	a				a		d	d	d	d	
Alejandra Piñón Gimate*												a					a									
Elisa Serviere Zaragoza								d	d				d	d	a		d	d				a				
Tutores en CIBNOR**	3	3	4	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Tutores externos	1	1	3	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	0	1	0	0	1	1	0	2	2	1	3	

\* = Investigadores posdoctorantes del proyecto; \*\* = no incluye a los investigadores del proyecto; L = licenciatura; M = maestría; D = doctorado; P = posdoctorado; c = tesis en curso; t = tesis terminada; d = director de tesis; a = asesor de tesis.



# Capítulo 1

---

Desarrollo y evaluación de  
métodos moleculares para  
la detección e identificación  
de dinoflagelados tóxicos y  
nocivos en las costas de  
Baja California Sur

---

**Angélica**  
Herrera-Sepúlveda

---

CIBNOR  
Becaria CONACYT 205502

## Resumen

En la actualidad, no existe un programa formal y bien establecido para el monitoreo de eventos de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en las costas de México, la mayoría de los esfuerzos en este sentido se enfocan en la caracterización taxonómica y recuento de los organismos presentes en las muestras. Estas actividades conllevan tiempo y la necesidad de contar con taxónomos de fitoplancton. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la rápida detección y enumeración de las especies formadoras de FAN. En este documento se presentan las principales actividades desarrolladas y los resultados obtenidos a la fecha. Para el análisis de comunidades, se llevó a cabo la estandarización de la técnica: Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla acoplado a electroforesis capilar (CE-SSCP); análisis de disociación (HRM) y el diseño de sondas para la detección especie-específica. En el caso de CE-SSCP se analizaron 3 fragmentos: I) V4 18S SSU; II) D1/D2 28S LSU y III) D7 28S LSU, de los que el fragmento D7 presentó la mejor resolución. Para la detección especie-específica, se diseñaron diferentes sondas de hibridación utilizando el software ARB. Estas sondas son especie-específicas para la identificación de *Prorocentrum rathymum*, *P. maculosum* y *P. belizeanum*, y se diseñaron sondas grupo-específico para discriminar entre especies del género *Prorocentrum* con hábitos bentónicos y planctónicos. Adicionalmente, se presentan los resultados obtenidos durante el entrenamiento recibido para el montaje de la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) y microarreglos. Finalmente, el análisis de disociación mostró resultados similares a los obtenidos con CE-SSCP en donde el fragmento V4 18S presentó múltiples temperaturas de disociación y D2 28S tiene una resolución insuficiente para distinguir entre las especies estudiadas.

**Palabras clave:** dinoflagelados, métodos moleculares, floraciones algales nocivas

## *Developing and assessing molecular methods to detect and identify toxic and harmful dinoflagellate species in coasts of Baja California Sur*

### *Abstract*

*At present, there is no formal and well-established program to monitor HABs in Mexican waters; most efforts in this regard focus on characterizing of the organisms present in the samples. Therefore, it is necessary to develop new techniques for rapid detection and enumeration of HAB-forming species. A monitoring program focused on HAB species using molecular methods will allow analyzing several samples in a short period of time without the need of phytoplankton taxonomy expertise. This document shows the main activities developed and the results obtained to date. For the community analysis, the following techniques were performed: single-strand conformation polymorphism coupled to capillary electrophoresis (CE-SSCP); melting curve analysis (HRM), and probe design for species-specific detection. With CE-SSCP methodology, 3 fragments were analyzed: (I) V4 18S SSU, (II) 28S D1/D2 LSU, and (III) D7 28S LSU. D7 fragment was the best option in terms of resolution. For species-specific detection, we designed different hybridization probes using ARB software. A set of species-specific probes to identify of *Prorocentrum rathymum*, *P. belizeanum*, and *P. maculosum* were designed, as well as group-specific probes for benthic and planktonic *Prorocentrum*. Additionally, the results obtained during technical training on Fluorescence in situ hybridization (FISH) and microarrays are shown here. Finally, the dissociation analysis showed similar results to those obtained with CE-SSCP, in which the 18S V4 fragment presented multiple dissociation temperatures and 28S D2 did not have a sufficient resolution to distinguish among the analyzed species.*

**Keywords:** dinoflagellates, molecular methods, harmful algal blooms

## Introducción

La discoloración de los cuerpos de agua, independientemente del organismo causante, han sido denominadas mareas rojas las cuales han ocurrido consistentemente a lo largo de la historia (Asai *et al.*, 2003). Las mareas rojas o Floraciones Algas Nocivas (FAN) 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) y la salinidad o la temperatura, ó por alteraciones de origen antropogénico (Suárez & Guzmán, 1998; Alonso & Ochoa, 2004). El término “Floraciones Algas Nocivas” fue acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO para designar las apariciones de un grupo heterogéneo de microorganismos, que son percibidas como dañinas debido a sus efectos adversos en el ambiente, repercutiendo directamente en la salud humana, en las actividades de acuicultura, recreación, turismo y en las poblaciones naturales de organismos marinos de zonas costeras (Sar *et al.*, 2002).

La relevancia del estudio de los eventos FAN, deriva del aumento registrado en el número y frecuencia de los mismos en las diferentes zonas costeras del mundo (Hallegraeff, 1993). En este contexto, se han enfocado esfuerzos al establecimiento de sistemas de monitoreo ambiental y biológico en diferentes países del mundo, tanto para estudiar las relaciones entre variabilidad ambiental-presencia-peligrosidad de los eventos, como para desarrollar una capacidad predicativa que permita la toma oportuna de medidas preventivas y correctivas (Herrera, 2008).

A lo largo de la línea costera los programas de monitoreo incluyen, en su mayoría, dos aspectos principales: 1) la observación biológica, en este caso se lleva a cabo la identificación y cuantificación de especies de algas potencialmente tóxicas así como el monitoreo del contenido de toxinas en moluscos, y 2) la medición de



parámetros físico-químicos, temperatura del agua, salinidad, nutrientes, clorofila, estratificación del agua, corrientes, entre otros; todo esto con el propósito de adquirir una capacidad predictiva de los eventos FAN (Andersen *et. al.*, 2003). Sin embargo, en términos reales, el establecimiento de los programas de monitoreo presenta una fuerte problemática relacionada con la insuficiencia de equipo y personal capacitado, lo que puede conllevar a un inadecuado monitoreo tanto de los parámetros ambientales como biológicos.

Empleando el método tradicional (colecta, fijación, sedimentación y microscopía óptica, y en su caso, electrónica), no es fácil ni expedito identificar especies formadoras de FAN en muestras del medio natural, ya que se requiere de taxónomos expertos. Esto, conlleva un elevado consumo de tiempo y, desafortunadamente, no presenta suficiente resolución para la identificación a nivel especie de todos los organismos formadores de FAN (Miller & Scholin, 1998). La baja resolución de este método se debe a que muchas características taxonómicas solamente pueden ser reveladas mediante microscopía electrónica, como tamaño y forma de la célula, posición de cloroplastos, arreglo de placas y complejos de poros apicales (Hallegraeff, 1993).

Adicionalmente, la identificación y cuantificación de las especies presentes no es suficiente para estimar el potencial de riesgo, debido a que no todas las cepas de la misma especie son tóxicas. Por ejemplo, el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (John *et al.*, 2003) y la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* (Smith *et al.*, 1990) presentan las variedades tóxica y no tóxica. Es importante hacer énfasis en que cuando se presentan eventos FAN, el tiempo de identificación de las especies presentes en una muestra es un factor crítico para minimizar el impacto potencial en la salud pública. Para resolver este problema, se han hecho varios estudios enfocados en el desarrollo de alternativas de identificación de estos organismos, destacando las técnicas moleculares, las cuales proveen a los ficólogos de una alternativa rápida, precisa y de fácil implementación (ver Herrera, 2008).

## Justificación

En la actualidad, no existe un programa formal y bien establecido para el monitoreo de eventos de Floraciones Algales Nocivas (FAN) en las costas de México, la mayoría de los esfuerzos en este sentido se enfocan en la caracterización taxonómica y recuento de los organismos presentes en las muestras. Estas actividades conllevan tiempo y la necesidad de contar con taxónomos de fitoplancton. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la rápida detección y enumeración de especies formadoras de FAN. Un programa de monitoreo de especies FAN utilizando métodos moleculares, permitirá acortar significativamente el tiempo de análisis de las muestras y de obtención de resultados para la toma de decisiones ante una contingencia.

Como resultado de investigaciones realizadas en los últimos cuatro años, en el laboratorio de Genética Molecular del CIBNOR se han diseñado métodos basados en la caracterización de diversas regiones del ADN ribosomal de 14 especies de dinoflagelados que se distribuyen en la región; tanto para la identificación de especies formadoras de FAN como para el estudio de comunidades de fitoplancton (Herrera, 2008). El objetivo de este trabajo es presentar los avances relacionados con el desarrollo de métodos moleculares para la identificación de dinoflagelados tóxicos y nocivos, como propuesta para la detección temprana y el monitoreo de microalgas nocivas en las costas de Baja California Sur.

## Material y métodos

Las especies y cepas utilizadas para el desarrollo de este estudio fueron obtenidas de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR (CODIMAR); sus características generales y condiciones de cultivo se presentan en la Tabla 1. Los cultivos se mantuvieron en tubos de vidrio de 15 mL. El protocolo de extracción de ADN fue modificado a partir de Stoeck *et al.* (2007).

## Análisis de comunidades

*Polimorfismo conformacional de cadena sencilla acoplado a electroforesis capilar (CE-SSCP)*. El análisis de CE-SSCP se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Delbes *et. al.* (2000), Ghiglione *et. al.* (2005) y West *et. al.* (2008). En los análisis se incluyeron a las especies enlistadas en la Tabla 1. Se amplificaron las regiones hipervariables V4 SSU (Elwood *et. al.*, 1985); D2 y D7 (Herrera, 2008) del LSU. Para amplificar la región D2 se diseñó un nuevo cebador que flanqueara esta región, utilizando el software ARB (Ludwig *et. al.*, 2004). Todos los cebadores con sentido F, fueron marcados en el extremo 5' con TET (Thermo Scientific Biopolymers).

**Tabla 1.** Listado de especies y condiciones de cultivo.

	Especie	Clave	Localidad	Medio de cultivo	T°C
Δ*	<i>Akashiwo sanguinea</i>	ASPV-1	BACO	GSe	20±3
•*	<i>Alexandrium margalefii</i>	AMCQ-1	BACO	GSe	20±3
•*	<i>Ceratium balechii</i>	CBMV-j	BAMAZ	F/2+Se	20±3
•*	<i>Cochlodinium polikrikoides</i>	CPPV-1	BAPAZ	GSe	20±3
•*	<i>Coolia monotis</i>	CMHV-1	CUBA	F/2+Se	25±3
*	<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCV-11	BACO	GSe	20±3
Δ*	<i>G. catenatum</i>	GCMV-2	BAMAZ	GSe	20±3
•	<i>G. onyaulax spinifera</i>	GSCQ-1		GSe	20±3
•*	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	LPCQ-1	BACO	GSe	20±3
*	<i>Prorocentrum rathymum</i>	PXPV-1	BAPAZ	GSe	20±3
Δ*	<i>P. rathymum</i>	PXHV-1	CUBA	F/2+Se	20±3
Δ*	<i>P. minimum</i>	PIPV-1	BAPAZ	GSe	20±3
Δ	<i>P. belizeanum</i>	PBHV-1	CUBA	F/2+Se	25±3
Δ	<i>P. maculosum</i>	PMHV-1	CUBA	F/2+Se	25±3
Δ	<i>P. lima</i>	PLHV-1	CUBA	GSe	20±3
*	<i>Protoceratium reticulatum</i>	PRPV-1	BAPAZ	GSe	20±3

Δ = Especies empleadas para la amplificación del fragmento 18S V4; • = especies empleadas para la amplificación del fragmento 28S LSU D2; \* = especies empleadas para la amplificación del fragmento 28S LSU D7. Todos los cultivos con 28 días de mantenimiento y 12 ciclos luz:oscuridad. Fuente: (<http://www.cibnor.gob.mx/eplant1.php?pagID=colecciones/codimar/codimar>).

## Detección especie-específica

*Diseño de sondas de hibridación*. Se amplificaron regiones específicas del ADNr (SSU, ITS 1 y 2, 5.8S, y LSU) para las especies presentadas en la Tabla 2 (Herrera, 2008), con la finalidad de obtener las secuencias necesarias y obtener un adecuado diseño de cebadores, aplicables en las metodologías de WCH-FISH para *Prorocentrum rathymum*, *P. maculosum* y *P. belizeanum*. El diseño de las sondas se llevó a cabo utilizando el programa ARB (Ludwig *et. al.*, 2004). La especificidad de estas sondas fue probada utilizando el formato de microarreglo (proyecto internacional MIDTAL, <http://www.midtal.com>).

*Hibridación Fluorescente in situ (FISH)*. Se llevaron a cabo pruebas preliminares para estandarizar el manejo del método de FISH, utilizando la metodología descrita por Töbe *et. al.* (2010). Las especies incluidas en este análisis pertenecen a los géneros *Prorocentrum* y *Heterosigma* y forman parte de la colección de dinoflagelados marinos (Tabla 2) del Marine Biological Association (MBA). Las sondas utilizadas se presentan fueron DinoB (5'-CCTCAAACCTTCCTTGCHTTA-3') y Crypto B (5'-ACGGCCCCAACTGTCCCT-3') (Marca Fluorescente 5'FITC).

**Tabla 2.** Listado de especies y condiciones de cultivo de las cepas depositadas en MBA.

Especie	Clave	Medio de cultivo	Temperatura	Ciclos luz: oscuridad	Días de mantenimiento
<i>P. minimum</i>	714	F/2+Se	20±3	12	28
<i>P. minimum</i>	698	F/2+Se	20±3	12	28
<i>P. lima</i>	558	F/2+Se	25±3	12	28
<i>P. lima</i>	558C	F/2+Se	20±3	12	28
<i>P. micans</i>	97B	F/2+Se	25±3	12	28
<i>H. akashiwo</i>	669	F/2+Se	20±3	12	28

*Análisis de perfil de disociación (High Resolution Melt-HRM-)*. El análisis de HRM se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Al-Kandari *et al.* (2010). Se amplificaron las mismas regiones hipervariables (V4 SSU y D2 LSU) utilizadas en la técnica CE-SSCP.

## Resultados y discusión

### Análisis de comunidades

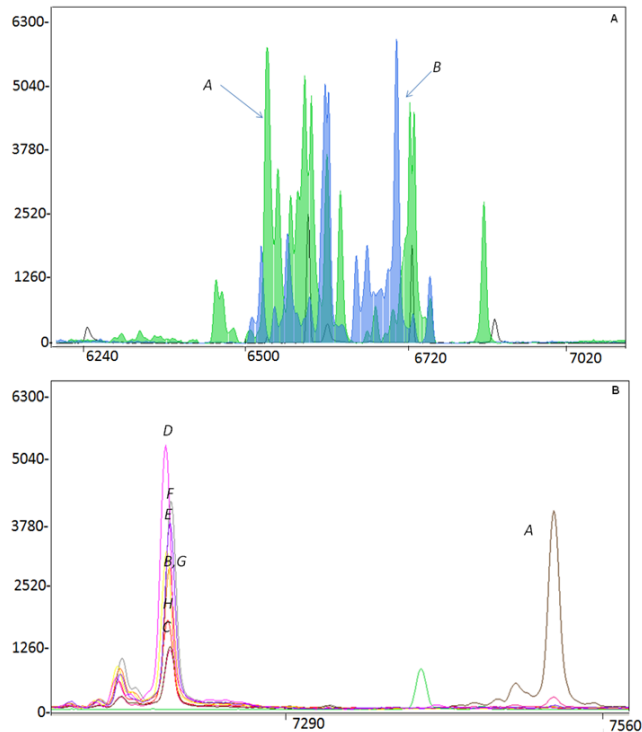
*CE-SSCP*. El principio teórico de la metodología de SSCP, es que una alteración en la secuencia nucleotídica, incluso el cambio de una sola base, puede afectar el plegamiento de la cadena sencilla de ADN (ssADN), influenciando su conformación nativa y este cambio es detectable como un cambio en la movilidad electroforética (Wu *et. al.*, 2009). Nuestro objetivo fue desarrollar un estudio preliminar para evaluar la eficiencia de CE-SSCP para resolver e identificar varias especies de dinoflagelados comúnmente presentes en costas mexicanas. Con base en la tasa de evolución del ADN ribosomal (ADNr), se seleccionaron tres

regiones altamente variables de genes ribosomales para su evaluación mediante CE-SSCP, utilizando el ADN genómico extraído de cultivos puros. Se probaron tres diferentes regiones del ADNr: la región V4 del gen ARNr 18S (SSU) y los dominios D2 y D7 del gen ARNr 28S (LSU). Debido a la alta variabilidad en la composición de las secuencias de nucleótidos de las regiones V4 18S y 28S D2, esperábamos encontrar un cambio drástico en el patrón de migración entre las diferentes especies, sin embargo, bajo las condiciones utilizadas para el CE-SSCP en este trabajo, no fue posible. Para la región V4, encontramos un complejo patrón de picos y dado que las muestras ambientales suelen ser complejas, esta región no es apta para ser utilizada (Figura 1A).

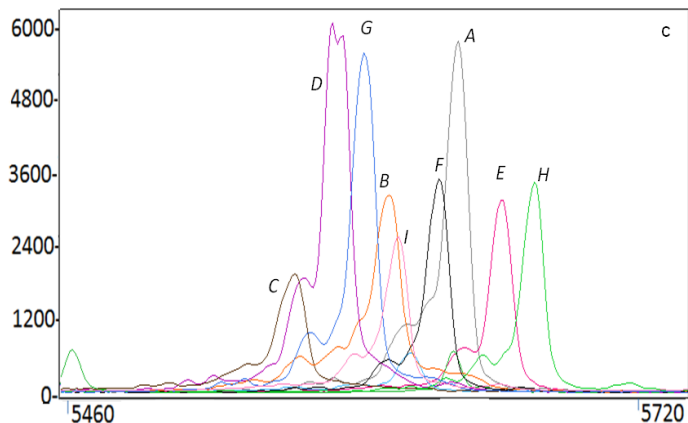
En el caso de la región D2, el patrón obtenido no permiten distinguir entre las 7 especies, sólo *Gymnodinium catenatum* (GCMV-2) se resolvió de manera eficiente. Aun cuando existen antecedentes de estudios sobre la alta variabilidad de la LSU en el dominio D2, se obtuvo de baja resolución con las especies estudiadas (Figura 1B). Con respecto a la región D7, el electroferograma de los amplicones (Figura 2) muestra un patrón en el cual todas las especies se distinguen fácilmente. Incluso, en el caso de *P. rhathymum* (cepas PXHV-1 y PXPV) no se revelaron diferencias entre cepas, ya que la especie fue reconocida como un mismo pico, mientras que en el caso de *G. catenatum* (cepas GCMV-2 y GCCV-11) la presencia de múltiples picos se observó para ambas cepas (conservando el mismo patrón de picos), aun cuando las condiciones de amplificación fueron optimizadas (datos no mostrados). La eficiencia de resolución obtenida para los 3 fragmentos analizados en este estudio, pueden atribuirse a la influencia de los parámetros que afectan los resultados de CE-SSCP (Ren, 2000; Kourkine *et. al.*, 2002).

Estos parámetros son: 1) el tamaño y composición de la secuencia del ADN, 2) la composición del tampón y el pH, 3) las matrices de separación del ADN y finalmente, 4) la temperatura. En lo que respecta al tamaño y composición de la secuencia del ADN, es definitivamente más fácil detectar mutaciones en algunas regiones del gen que en otras, debido a los efectos de la secuencia de ADN sobre el plegamiento de la cadena. Varias investigaciones han concluido que en la medida que aumenta la longitud de los fragmentos de ADN, disminuye la sensibilidad de detección de mutaciones mediante CE-SSCP (Ren, 2002). Un fragmento de

150-250 pares de bases (pb) es conveniente porque los riesgos de errores producidos por la PCR vinculados con el tamaño de amplificación se reducen, además, se reduce el impacto de los inhibidores y los errores de síntesis de la ADN polimerasa (Zinger *et. al.*, 2007). Con los cebadores utilizados, se generaron productos de PCR de 350 (V4), 400 (D2) y 198 (pb) (D7) respectivamente, siendo el fragmento más pequeño (D7) el que proporcionó mayor eficiencia de resolución, suficiente para distinguir 12 diferentes especies de dinoflagelados, mientras que los fragmentos V4 y D2 mostraron baja resolución.



**Figura 1.** A = Análisis de CE-SSCP del fragmento de 350 pb del V4SSU para las especies *A. sanguinea* (pico A) y *G. catenatum* (pico B). El tiempo de migración (eje de las X) y la intensidad de fluorescencia (eje de las Y) se indican en tiempo y unidades relativas de fluorescencia, respectivamente. B = Perfil de separación CE-SSCP de productos de PCR de 400 pb del dominio D2 LSU en matriz polímero convencional (POP-CAP). Pico A - *G. catenatum* (GCMV-2), Pico B - *A. sanguinea* (ASPV-1), Pico C - *C. monotis* (CMHV-1), Pico D - *A. margaleffi* (AMCQ-1), Pico E - *L. polyedrum* (LPCQ-1), Pico F - *C. polykrikoides* (CPPV-1), Pico G - *C. balechi* (CBMV-1) y Pico H - *G. spinifera* (GSCQ-1). Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de la señal de fluorescencia (eje de las Y) se indica en unidades de tiempo y unidades relativas de fluorescencia, respectivamente.



**Figura 2.** Perfil de separación de productos de PCR de 198 pb del dominio D7LSU en matriz polímero convencional (POP-CAP). A = *A. margaleffi* (AMCQ-1); B = *A. sanguinea* (ASPV-1); C = *C. balechii* (CBMV-1); D = *C. polikrikoides* (CPPV-1); E = *C. monotis* (CMHV-1); F = *P. minimum* (PIPV-1); G = *P. rhathymum* (PXHV-1); H = *P. reticulatum* (PRPV-1) e I = *L. polyedrum* (LPCQ-1). Tiempo de migración (eje de las X) e intensidad de la señal de fluorescencia (eje de las Y) se indica en unidades de tiempo y unidades relativas de fluorescencia, respectivamente.

El contenido de GC de la secuencia de ADN también parece tener algún impacto en la facilidad de detección de mutaciones por CE-SSCP. Nataraj *et. al.* (1999) reportaron que hay mayor sensibilidad de detección de mutaciones en fragmentos con alto contenido de GC (60%) que en los fragmentos con una proporción menor (GC 40%), bajo las mismas condiciones del análisis. Probablemente, el mayor número de pares de bases GC proporciona conformaciones más estables, debido a la existencia de tres enlaces de hidrógeno por cada par de bases. Los fragmentos analizados presentaron un contenido de GC de 49.2% para D7 y 43.4% para el D2. Si consideramos que en un fragmento de 200 pb con una composición de 50% GC, la estabilidad de dicha secuencia será mayor, debido a que se requiere más energía para desestabilizar la conformación adquirida.

*Conclusión y recomendaciones para CE-SSCP.* 1) Bajo las condiciones empleadas en este estudio, hemos conseguido un resultado exitoso de CE-SSCP para resolver 12 especies de dinoflagelados, utilizando como marcador molecular a la región D7. Sin embargo, el perfil de separación de *G. catenatum* (en las condiciones

experimentales) mostró múltiples picos; 2) La resolución de CE-SSCP podrá proporcionar una rápida visión general de la composición de la comunidad de dinoflagelados tóxicos y nocivos en las muestras ambientales. En este contexto, podríamos estimar la abundancia relativa de un grupo objetivo y su incremento acelerado, obteniendo una señal de alerta casi en tiempo real y 3) Tras su adecuada estandarización y validación, la técnica CE-SSCP puede mejorar las actividades de monitoreo en los países con limitados recursos financieros y técnicos como el nuestro, en particular, para el análisis de las especies de dinoflagelados tóxicos y nocivos.

### **Identificación especie-específica**

*Diseño de sondas de hibridación.* Las sondas moleculares son fragmentos de ADN producidos sintéticamente, que se unen selectivamente (hibridan) a secuencias específicas complementarias del ADN o del ARN de un organismo en particular (especie) o un grupo de especies (Anderson, 1995). En la Tabla 3 se muestran las características generales de las sondas oligo nucleotídicas diseñadas con el software ARB, función Probe Design. Una vez que las sondas se diseñaron, se consideró el número de *disparidades (mismatches)* con secuencias no flanqueantes, así como su posición, al centro o en los extremos de la sonda. La especificidad teórica de la sonda fue obtenida utilizando la función Match Function y se probó *in vitro* utilizando el formato de microarreglo del proyecto de la unión Europea “MIDTAL Project”.

*Pruebas de especificidad de las sondas diseñadas utilizando el formato de Microarreglo.* Un microarreglo es un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (10,000 muestras por cm<sup>2</sup>). Los microarreglos de ADN son una nueva herramienta de la biología molecular y las ciencias genómicas (Ramírez *et al.*, 2003). Esta tecnología fue desarrollada por Brown & Botstein (1999) para explorar los genomas de manera sistemática y comprensiva. El poder y universalidad de herramientas como los microarreglos, deriva de su exquisita especificidad y la afinidad del apareamiento de bases complementarias. En el 2008, el grupo internacional liderado por la Dr. Linda Medlin, puso en marcha el



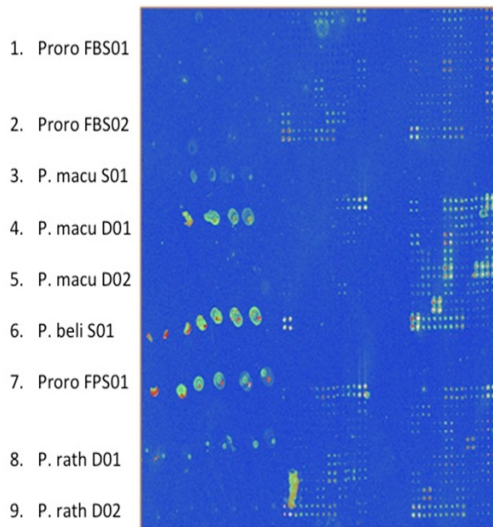
proyecto MIDTAL (*MI*croarray for the *DE*tection on *TO*xic *AL*gae), el cual consiste en producir un microarreglo universal para detectar microalgas tóxicas y sus toxinas, a partir de extractos de microalgas de muestras naturales (Medlin, 2009).

**Tabla 3.** Sondas de hibridación diseñadas para el grupo de Prorocentrales.

Especie objetivo	Nombre y región	Secuencia
Prorocentrales bentónicos	Proro FBS01	5'-GAUGCCCAGAUCAAGCCAGAUGCUC-3'
	SSU	
<i>P. maculosum</i>	Proro FBS02	5'-CCAACUAUCCCCAUUGACCAUUACC-3'
	SSU	
<i>P. belizeanum</i>	P. macu S01	5'-AUUUUUCGCCAGCGGACGCCAUACG-3'
	SSU	
<i>P. maculosum</i>	P. macu D01	5'-UUCUUUUUUCUUCGCGCAUUCUG-3'
	LSU	
	P. macu D02	5'-UGGUGCCCUUUUUAUCCAAGAGGCCCGCACCUGC-3'
<i>P. belizeanum</i>	LSU	
	P. beli S01	5'-GAGAGCUGCAGAGUUGAA-3'
Prorocentrales planctónicos	SSU	
	Proro FPS01	5'-UUCAAGGCGUAAGCCUGCUUGAAAC-3'
<i>P. rathymum</i>	SSU	
	P. rath D01	5'-GACAAGAAGCGCUGCAACCAGACAC-3'
	LSU	
	P. rath D02	5'-UGUGUCAGGGAAACGCCCAGUCACC-3'
	LSU	

En el caso de la detección de especies tóxicas formadoras de FAN, se utilizan sondas de hibridación que ya han sido probadas en formato FISH; estas sondas fueron adaptadas al formato de microarreglo para probar su especificidad. El microarreglo MIDTAL está compuesto por más de 100 sondas específicas para más de 30 especies de microalgas tóxicas (Chen *et al.*, 2010). Para determinar la especificidad de las sondas diseñadas en este trabajo (Tabla 3), estas se imprimieron manualmente el microarreglo “MIDTAL Project” primera versión. De manera general, se puede destacar que después de una serie de lavados para mejorar la especificidad de las sondas (45-60°C), no se observó reconocimiento específico ya que las sondas P. macu S01, P. macu D01, y P. beli S01 hibridaron con ARN de *Prorocentrum lima* (Figura 3, líneas 3, 4 y 6). Por ello, se recomienda diseñar nuevas sondas para *P. maculosum* y *P. belizeanum*.

Con respecto a las sonda para Prorocentrales planctónicos (Proro FPS01, Figura 3 línea 7) así como aquellas para *P. rathymum* (*P. rath* D01 y *P. rath* D02, Figura 3, líneas 8 y 9), es necesario probar su especificidad utilizando ARN de algún *Prorocentrum* planctónico, como podría ser *P. rathymum* y/o *P. minimum*. Cabe mencionar que la sonda “Prorocentrales bentónicos” (FB02) fue incluida en la nueva versión del microarreglo MIDTAL 3.0. El monitoreo utilizando este método permitirá analizar un mayor número de muestras en un menor periodo de tiempo con una gran exactitud, sin la necesidad de contar con personal altamente entrenado en taxonomía. Además ofrecerá un análisis cercano a lo que ocurre en tiempo real en los ecosistemas, permitiendo así tener un mejor conocimiento de la ecología de las especies FAN y proveerá de un sistema efectivo de alerta temprana (Medlin, 2009).



**Figura 3.** Imagen del lector de microarreglo de pruebas de especificidad de sondas para Prorocentrales bentónicos y Prorocentrales planctónicos. Las sondas fueron impresas manualmente en el microarreglo en el siguiente orden: 1 = Proro FBS01; 2 = Proro FBS02; 3 = *P. macu* S01; 4 = *P. macu* D01; 5 = *P. macu* D02; 6 = *P. beli* S01; 7 = Proro FPS01; 8 = *P. rath* D01 y 9 = *P. rath* D02.

*Conclusiones y recomendaciones para sondas de hibridación.* 1) La sonda para los Prorocentrales bentónicos presentó la suficiente especificidad para ser incorporada en la versión 3.0 del microarreglo MIDTAL; 2) Es necesario obtener las secuencias completas de la SSU para el diseño de nuevas sondas, probarse en formato de microarreglo y continuar con las pruebas de FISH y 3) Se llevarán a cabo el análisis de especies formadoras de FAN, utilizando la última versión del microarreglo y muestras naturales en las costas de Baja California Sur, principalmente de la Bahía de la Paz.

*Hibridación fluorescente in situ de células completas (WCH-FISH).* La metodología propuesta para llevar a cabo la identificación especie-específica es la WCH-FISH (Whole Cell Hybridization-Fluorescence *in situ* Hybridization). En esta técnica, la sonda penetra en la célula y se une selectivamente a la secuencia blanco; se lava el exceso de la sonda y el complejo que se forma se detecta por microscopía de fluorescencia. En formatos de WCH se han usado sondas dirigidas a fragmentos específicos del LSU-ARNr para identificar y enumerar especies de los géneros *Alexandrium* y *Pseudo-nitzschia*, obtenidos tanto de cultivos puros como de poblaciones naturales (Scholin *et. al.*, 1994; Miller & Scholin, 1998; Scholin *et. al.*, 1997, 1999). Una de las ventajas que presenta el método de WCH-FISH es que las sondas utilizadas pueden adaptarse y usarse en microarreglos, consiguiendo así ser una excelente opción para llevar a cabo un eficiente programa de monitoreo (Medlin, 2009). En este trabajo, se realizó una estancia para la estandarización de la técnica de hibridación fluorescente *in situ*, en la que se probaron dos sondas Clase-específico *vs.* tres cepas pertenecientes al grupo de los Prorocentrales, con la finalidad de determinar su especificidad; los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

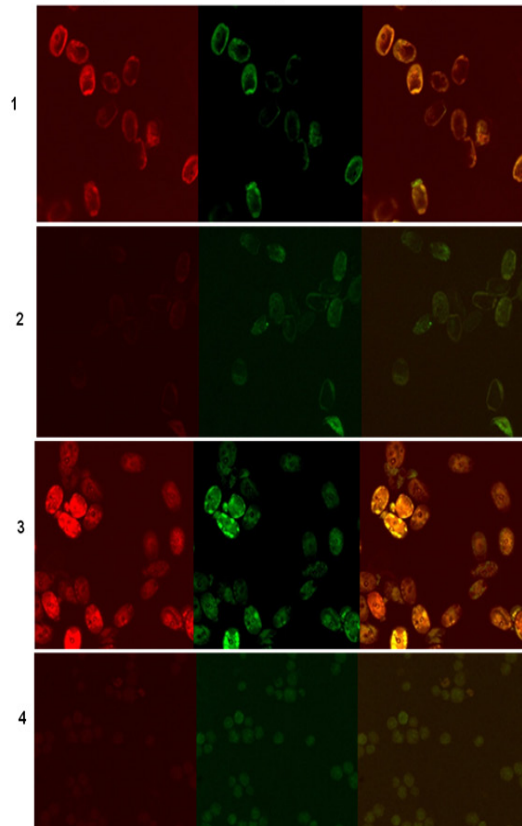
**Tabla 4.** Especificidad de las sondas DinoB y Crypto B por FISH.

Especie	Cepa	Inespecificidad	
		DinoB	CryptoB
<i>P. minimum</i>	714	+	+
<i>P. minimum</i>	698	+	+
<i>P. lima</i>	558	+	+
<i>P. lima</i>	558C	+	+
<i>P. micans</i>	97B	+	+
<i>Heterosigma akashiwo</i>	669	+	+

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos con microscopia confocal para *P. lima* (cepa 558) vs las sondas Dino B y Crypto B. En estas imágenes se puede apreciar la autofluorescencia de las muestras (4A), la detección de las sondas de hibridación (4B), y la imagen compuesta por la autofluorescencia de la muestra más la señal de la sonda de hibridación (4C), así como los resultados obtenidos de la hibridación de la sonda DinoB vs la cepa 669, correspondiente a la prueba de especificidad. Se puede observar que la autofluorescencia o fluorescencia primaria de las muestras es elevada (dada por la presencia de pigmentos tales como la clorofila); para disminuir este efecto se probó un mayor tiempo en la etapa de fijación de las muestras. La autofluorescencia de las muestras no disminuyó totalmente, sin embargo, se obtuvieron mejores resultados consistentes con el decremento de la autofluorescencia propia de las muestras cuando el periodo de fijación de las muestras se prolongó (resultados no presentados). Además, para mejorar la especificidad de la sonda Crypto B, se incrementó 5°C la temperatura de hibridación, sin embargo, no se logró mejorar la especificidad de la sonda (resultados no presentados).

*Conclusión y recomendaciones para FISH.* 1) Las temperaturas de hibridación y lavado deben adecuarse a cada sonda que se diseñe, ya que no se puede predecir totalmente el comportamiento de las mismas y 2) El uso de microscopia confocal permitió identificar la autofluorescencia de las muestras, siendo este uno de los parámetros más importantes a considerar para mejorar la interpretación de los resultados. El entrenamiento en el manejo de esta técnica, en el Marine Biological Association (MBA) comprendida en el periodo de Noviembre-Diciembre 2010, fue llevado a cabo exitosamente, ya que se pudieron detectar puntos clave en la metodología de Hibridación Fluorescente *in situ*.

*Análisis de perfil de disociación (High Resolution Melt -HRM-).* Bajo la premisa de alta variabilidad de los dominios V4 y D2, estas regiones fueron amplificadas por PCR en tiempo real y sometidas a análisis de disociación utilizando la metodología de HRM. El principio teórico en el que se basa esta metodología, es que la alteración en una secuencia nucleotídica (causada por una mutación) puede afectar la temperatura de disociación de la cadena de ADN, con variaciones de 1 a 2°C, por lo que las diferencias son fácilmente detectadas (Odell *et. al.*, 2005).



**Figura 4.** Fotomicrografías de *P. lima* 558 hibridado con Dino B (Fila 1), Crypto B (Fila 2) y sin sonda (Fila 3). *Heterosigma akashiwo* hibridado con Dino B (Fila 4). Las fotografías de la izquierda: autofluorescencia de la muestra, centro: detección de la sonda, y derecha: autofluorescencia + señal de la sonda.

Kubista (2008) propone usar esta técnica en búsqueda de SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*), mapeo de ADN, búsqueda de mutaciones, análisis de microsatélites, identificación de especies/taxonomía, entre otras. Con referencia a su uso en taxonomía de organismos fitoplanctónicos, esta técnica se ha empleado para identificar y diferenciar algunas especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*, en muestras ambientales de las costas de Cataluña (Andree *et. al.*, 2011). Al-Kandari *et. al.* (2010) emplearon esta metodología para

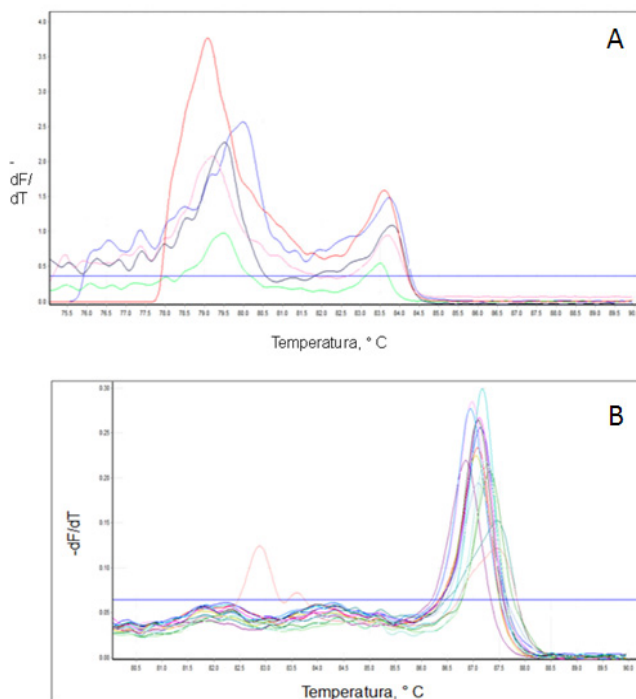
determinar si la especie *Karenia mikimotoi* que se encuentra en Europa, es una especie introducida del Océano Pacífico, por otra parte, Granados-Cifuentes & Rodríguez-Lanetty (2010) utilizaron esta metodología para el preciso y rápido genotipado de poblaciones monotípicas de *Symbiodinium spp.*

En este trabajo, nuestro objetivo fue determinar si mediante el uso de la técnica HRM la resolución de los fragmentos V4 SSU y D2 LSU podría incrementarse para resolver e identificar entre varias especies de dinoflagelados. Utilizando oligos universales para eucariontes (V4) se obtuvo un amplicón de 350 pb a partir de ADN genómico extraído de cultivos puros de *P. belizeanum* (PBHV-1), *P. minimum* (PIPV-1), *P. lima* (PLHV-1), *P. maculosum* (PBHV-1) y *P. rathymum* (PXHV-1). En el perfil de disociación (HMR) se observan múltiples picos de fluorescencia, comparable para todas especies (Figura 5A).

Por otro lado, la región variable D2 fue amplificada a partir de ADN genómico de varias especies de dinoflagelados, generando en todos los casos amplicones de 389 pb. En la Tabla 5 y la Figura 5B se presentan las temperaturas de disociación y los perfiles de disociación de cada una de las especies. En este caso, la temperatura de disociación de las 12 especies resultó muy similar, como en el caso particular de *Alexandrium margalefii* (AMCQ-1) y *Akashiwo sanguinea* (ASCQ-1), quienes a pesar de pertenecer a géneros con amplias distancias filogenéticas, presentan una diferencia de disociación de 0.03°C.







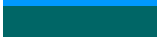






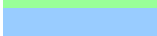
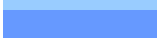
Generalmente, los diferentes productos de PCR tienen diferente temperatura de disociación, dependiendo de su relación de GC/AT, tamaño, composición de secuencia y temperatura de corrimiento, entre otros (Ririe *et. al.*, 1996; Talmi-Frank *et. al.*, 2010). Además, se recomienda utilizar fragmentos cortos (entre 100 y 300 pb) debido a que el tamaño del amplicón afecta considerablemente la resolución de esta metodología. Bajo esta premisa, es posible identificar que estas variables son las mismas que afectan la resolución de la metodología CE-SSCP, lo cual refuerza la importancia del tamaño del amplicón en la aplicación de este tipo de herramientas analíticas.

*Conclusión y recomendaciones para análisis de perfil de disociación (High Resolution Melt -HRM).* 1) Los resultados obtenidos mediante el análisis HRM, para el fragmento V4 SSU y para el D2 LSU son similares a los obtenidos con CE-SSCP; 2) Se recomienda utilizar un fragmento de menor tamaño, como el fragmento D7, para poder comparar los resultados obtenidos con CE-SSCP, así como las secuencias inter-transcritas 1 y 2 (ITS1 e ITS2) y 3) Esta metodología puede ser útil para la discriminación de especies pertenecientes al mismo género, por lo tanto, los trabajos siguientes se enfocaran a la diferenciación de especies del género *Prorocentrum*.



**Figura 5.** A = Perfil de disociación de HRM del fragmento V4 de *P. belizeanum* (●PBHV-1), *P. minimum* (●PIPV-1), *P. lima* (●PLHV-1), *P. maculosum* (●PBHV-1) y *P. rathynum* (●PXHV-1). B = Perfil de disociación de HRM del fragmento D2 para las especies *A. margalefii* (●AMCQ-1), *A. sanguinea* (●ASPV-1), *C. balechii* (●CBMV-1), *C. polikrikoides* (●CPPV-1), *C. monotis* (●CMHV-1) y *CMPV-1*, *G. catenatum* (●GCCV-11 y ●GCMV-2), *G. spinifera* (●GSCQ-1), *L. polyedrum* (●LPCQ-1), *P. belizeanum* (●PBHV-1), *P. minimum* (●PIPV-1), *P. maculosum* (●PMHV-1), *P. reticulatum* (●PRPV-1) y *P. rathynum* (●PXHV-1).

**Tabla 5.** Análisis de disociación HRM del fragmento D2.

Cepa	Color	Temperatura de disociación		
		PICO 1	PICO 2	PICO 3
AMCQ-1		87.08		
ASCQ-1		87.05		
CBMV-1		87.15		
CMHV-1		86.85		
CMPV-1		86.98		
CPPV-1		86.95		
GCCV-11		87.45		
GCMV-2		82.88	83.6	87.45
GSCQ-1		87.32		
LPCQ-1		87.12		
PBHV-1		87.1		
PIPV-1		87.17		
PMHV-1		87.27		
PRPV-1		87.23		
PXHV-1		87.1		

Hasta el momento, nuestra investigación se encuentra en un punto intermedio de desarrollo, ya que las primeras etapas que consideran el desarrollo y/o identificación de las herramientas más útiles y resolutivas (dentro del contexto de su fácil implementación en un país con recursos económicos limitados como el nuestro), de alguna forma han sido alcanzadas y lo que resta por hacer es la optimización de cada una de ellas y su evaluación en muestras de campo, además de mejorar el formato de presentación, en vías de la generación a largo plazo de uno o varios kits para su aplicación en actividades de monitoreo. Los resultados obtenidos son prometedores, ya que la técnica HMR proporciona una resolución similar a la CE-SSCP, sin el requerimiento de un equipo tan complicado y costoso como un secuenciador.

Por otra parte, estamos cada vez más cerca de generar un cambio en la forma de llevar a cabo el monitoreo, en donde los métodos convencionales se complementen con herramientas moleculares que, como se ha visto, ofrecen una gran factibilidad de implementación, análisis simultáneo de un gran número de muestras (de 1 a 96



en una misma corrida), con una inversión de tiempo y esfuerzo menor, además de fácil interpretación de resultados. Esta nueva estrategia permitirá llevar a cabo un análisis más cercano al tiempo real del ecosistema (logrando profundizar en el entendimiento de la ecología de las diferentes especies presentes en eventos FAN) y, finalmente, ofrecerá un sistema de alerta temprana para las costas de BCS, permitiendo la posibilidad de establecer estrategias de mitigación. Además, estos métodos generan información complementaria (secuencias genéticas) las cuales pueden ayudar a generar más conocimiento en torno a la diversidad genética de las especies formadoras de FAN.

## Referencias

- Al-Kandari, M., D. Schroeder, M. Edward, M. Yallop & P. Hayes. 2010. Is the European *Karenia mikimotoi* an alien? En: *Abstracts 14<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae*, del 1-5 de Noviembre del 2010. Creta, Grecia.
- Alonso, R.R & J.L Ochoa. 2004. Hydrology of winter–spring “red tides” in Bahía de Mazatlán Sinaloa, México. *Harmful Algae*, 3: 163–171.
- Andersen, P., H. Enevoldsen & D.M. Anderson. 2003. Harmful algal monitoring program and action plan, 627–648. En: Hallegraeff, G.M., D.M Anderson & A.D. Cembella (Eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, París.
- Anderson, D.M. 1995. Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective, 103–112. En: Lassus, P., G. Arzul, E. Erard, P. Gentian & C. Marcaillou (Eds.) *Harmful Marine Algal Bloom*. Lavoisier Intercept, París.
- Andree, K., M. Fernández-Tejedor, L.M. Elandaloussi, S. Quijano-Scheggia, N. Sampedro, E. Garcés, J. Camp & J. Diogène. 2011. Quantitative PCR coupled with melt curve analysis for detection of selected *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) from the Northwest Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 1651–1659.
- Asai, R, K. Nakanishi, C. Nakamura, K. Ikebukuro, J. Miyake & I. Karube. 2003. A polymerase chain reaction-based ribosomal DNA detection technique using a surface plasmon resonance detector for a red tide causing microalga,

- Alexandrium affine*. *Phycol. Res.*, 51: 118–125.
- Brown, P.O & D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.*, 21: 33–37.
- Chen, J., L.K. Medlin, W. Kooistra, E. Graneli, B. Reguera, R. Raine, B. Edvarsen, J. Lewis, C. Elliot, Y. Pazos & L. Maranda. 2010. MIDTAL: WP1 & WP2: Enhancement of microarray hybridization signal for the detection of multi-species of toxic algae. En: *Abstracts 14<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae*, del 1-5 de Noviembre del 2010, Creta.
- Delbes, C., R. Moletta & J.J Gordon. 2000. Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.*, 2(5): 506–515.
- Elwood, H., G. Olsen & M. Sogin. 1985. The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha iwvz* and *Stylonychia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.*, 2(5): 399–410.
- Ghiglione, J.F., M. Larcher & P. Lebaron. 2005. Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microb. Ecol.*, 40: 229–240.
- Granados-Cifuentes, C. & M. Rodriguez-Lanetty. 2010. The use of high-resolution melting analysis for genotyping *Symbiodinium* strains: a sensitive and fast approach. *Mol. Ecol. Resour.*, DOI:10.1111/j.1755-0998.2010.02933.x.
- Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol.*, 32: 79–99.
- Herrera, A. 2008. *Diseño de métodos moleculares para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo*. Tesis de maestría. CIBNOR, La Paz, 122 p.
- John, U., A. Cembella, C. Hummert, M. Elbrächter, R. Groben & L.K. Medlin. 2003. Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur. J. Phycol.*, 38: 25–40.
- Kourkine, I.V., C.N. Hestekin & A.E. Barron. 2002. Technical challenges in applying capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism for routine genetic analysis. *Electrophoresis*, 23: 1375–1385.
- Kubista, M. 2008. Emerging real-time PCR applications. *Drug Discovery World*, 9: 57–66.

- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, L. Meier, H. Yadhukumar, A. Buchner, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reachel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode & K.H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.*, 32: 1363–1371.
- Medlin, L.K. 2009. MIDTAL microarrays for the detection of toxic algae EU-FP7-PROJECT. *Harmful Algae News*, 39: 10–11.
- Miller, P. & C.A Scholin. 1998. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species- specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J. Phycol.*, 34: 371–382.
- Nataraj, A., I. Olivos-Glander, N. Kusukawa & W. Highsmith. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *J. Electrophoresis*, 20: 1177–1185.
- Odell, I., J. Cloud, M. Seipp & C. Wittwer. 2005. Rapid Species Identification Within the *Mycobacterium chelonae*-abscessus Group by High-Resolution Melting Analysis of hsp65 PCR Products. *Microbiology and Infectious Disease*, DOI: 10.1309/WDR082X9FFJBQQGB.
- Ramírez, J., L. Chávez, J.L. Santillán & S. Guzmán. 2003. En: *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII. Fac. Medicina, UNAM, México, D.F. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
- Ren, J. 2000. High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *J. Chromatogra.*, 741: 115–128.
- Ririe, K.M., R.P. Rasmussen & C.T. Wittwer. 1996. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during polymerase chain reaction. *Anal. Bioch.*, 245(2): 154–160.
- Sar, E.A., M.E. Ferrario & B. Reguera. 2002. *Floraciones Algales Nocivas en El Cono Sur Americano*. Instituto. Español de Oceanografía, Madrid, 311 p.
- Scholin, C., M. Herzog, M. Sogin & D. Anderson D. 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, C., P. Miller, K. Buck, F. Chavez, P. Harris, P. Haydock, J. Hoard, & G

- Cangelosi. 1997. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.*, 4265: 1265–1272.
- Scholin, C., R. Marin III & P. Miller. 1999. DNA probes and receptor-binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophytaceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.*, 35: 1356–1367.
- Smith, J.C., P. Odense, R. Angus, S.S. Bates, C.J. Bird, P. Cormier, A.S.W. de Freitas, C. Leger, D. O’Neil, K. Pauley & J. Worms. 1990. Variation of domoic acid levels in *Nitzschia* species: implications for monitoring programs. *Bull. Aqua. Assoc. Canada*, 90: 27–31.
- Stoeck, T., A. Zuendorf, H. Breiner & A. Behnke. 2007. A molecular approach to identify active microbes in environmental eukaryote clone libraries. *Microb. Ecol.*, 53: 328–339.
- Suárez, B. & L. Guzmán. 1998. *Mareas Rojas y Toxinas Marinas*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, 56 p.
- Talmi-Frank, D., A. Nasereddin, L.F. Schnur, G. Schönian, S.O. Töz, C.L. Jaffe & G. Baneth. 2010. Detection and identification of old world Leishmania by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 24: 581.
- Töbe, K., D. Tullis, M. Gladstone, D. Anderson & L.K. Medlin. 2010. Detecting intact algal cells with whole cell hybridization assays, 55–66. En: Karlson, B., C. Cusack & E. Bresnan (Eds.) *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis*. IOC Manuals and Guides, no. 50, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, París.
- West, N., I. Oberbisterer, O. Zemb & P. Lebaron. 2008. Major differences of bacterial diversity and activity inside and outside of a natural iron-fertilized phytoplankton bloom in the Southern Ocean. *Environ. Microbiol.*, 10: 738–756.
- Wu, Y., Y. Chen, C. Zhu, B. Wang, H. Yang, F. Yuan & B. Xu. 2009. Multiple PCR-capillary electrophoresis-SSCP used to identify food borne pathogens. *Eur. Food Res. Technol.*, 228: 511–518.
- Zinger, L., J. Gury, F. Giraud, S. Krivobok, L. Gielly, P. Taberlet, & R.A. Geremia. 2007. Improvements of PCR and CE-SSCP methods in microbial ecology: towards a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb. Ecol.*, 54: 203–216.