



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**DESARROLLO DE SONDAS PARA LA
DETECCIÓN DE *Chattonella* spp.
(RAPHIDOPHYCEAE) MEDIANTE
HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU***

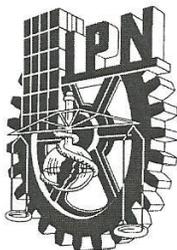
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

ARMANDO MENDOZA FLORES

LA PAZ, B.C.S, DICIEMBRE DE 2013



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 25 del mes Noviembre del año 2013
el (la) que suscribe BM. ARMANDO MENDOZA FLORES alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A120348 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"DESARROLLO DE SONDAS PARA LA DETECCIÓN DE *Chatonella* sp. (Raphidophyceae)

MEDIANTE LA HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *in situ*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: armando mf2000@yahoo.com.mx - cjband@yahoo.com - bgonzal@ipn.mx
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. ARMANDO MENDOZA FLORES

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

A las becas otorgadas del CONACYT a la becas PIFI. A los proyectos CONACYT 178227 y SIP 20110590, 20121152, 20130942 del Instituto Politécnico Nacional por financiar el trabajo de tesis.

A mis directores de tesis Dra. Christine J. Band Schmidt y Dra. Bárbara González Acosta, por la asesoría y guía durante todo el trabajo de tesis.

A los integrantes de mi comité revisor: Dr. David Siqueiros, M.C. Ismael Gárate Lizárraga, Dr. Sergio Martínez Díaz.

Al PhD. Carmelo Tomas por proporcionar las cepas que se utilizaron en el proyecto y a la Dra. Anidia Blanco por su asesoría en el diseño de las sondas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
GLOSARIO.....	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS.....	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2. 1. Estudios sobre <i>Chattonella</i> en México	4
2. 2. Identificación de especies de <i>Chattonella</i> mediante el uso de técnicas moleculares.....	6
2. 3. Uso de la Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i> en fitoplancton	7
3. HIPÓTESIS	9
4. OBJETIVO.....	9
4. 1. Objetivos particulares.....	9
5. MATERIAL Y MÉTODO	10
5. 1. Cepas.....	10
5. 2. Medio de cultivo	10
5. 3. Condiciones de cultivo	10
5. 4. Prueba de fijación	11
5. 5. Diseño de las sondas.....	12
5. 6. Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	16
6. RESULTADOS	17
6.1. Preservación de células en cultivo de <i>Chattonella</i>	17

6.2. Sondas diseñadas para identificar <i>Chattonella marina</i> y <i>Chattonella subsalsa</i>	24
6. 3. Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	25
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIÓN	46
9. BIBLIOGRAFÍA	48

GLOSARIO

Fijación: toda manipulación sobre un ser vivo, o bien sobre parte de él, que tiene por objeto mantener su arquitectura tanto estructural como química lo más inalterada posible, de tal forma que sus componentes celulares mantengan las mismas características que cuando dicho ser o tejido estaban vivos.

Florecimiento algal nocivo: es un incremento masivo en el número de células fitoplanctónicas que puede consumir el oxígeno o los nutrientes del agua, indispensables para otros organismos, y así afectar a la biota acuática. También pueden ocasionar daños físicos a otros organismos y/o causar intoxicaciones a través de la producción de sustancias químicas (toxinas), alterando la fisiología de los organismos afectados.

Fluorescencia: es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente.

Fluorocromo: moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión.

Hibridación: proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencias de bases complementarias.

Hibridación *in situ*: hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias a ADN/ARN celular. Es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. Provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas

Lisis: destrucción de una célula, normalmente por rotura de la membrana celular mediante un agente específico o un proceso físico.

Sonda molecular: es un fragmento de ADN o ARN de pequeño tamaño usado en biología molecular como herramienta para detectar la presencia de ADN o ARN de secuencia complementaria parecida o igual.

T_m: es la temperatura de desnaturalización, a la cual la mitad del ADN está presente en cadena sencilla (forma desnaturalizada).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras secundarias de secuencias de la región ITS-1 – 5.8S – ITS-2 del ARN ribosomal de A) <i>Chattonella marina</i> y B) <i>Chattonella subsalsa</i>	14
Figura 2. Células de <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> A) viva; y fijadas con B) paraformaldehído al 0.001%, C) paraformaldehído al 0.002%, D) etanol salino al 25%, E) glutaraldehído/paraformaldehído al 0.001% y F) glutaraldehído al 0.001%. 18	18
Figura 3. Células de <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> A) vivas y fijadas con B) paraformaldehído 0.001%, C) paraformaldehído 0.002%, D) etanol salino 25%, E) paraformaldehído/glutaraldehído 0.001% y F) glutaraldehído 0.001%.....	19
Figura 4. Células de <i>Chattonella subsalsa</i> A) viva y fijadas con B) paraformaldehído 0.001%, C) paraformaldehído 0.002%, D) etanol salino 25%, E) paraformaldehído/glutaraldehído 0.001% y F) glutaraldehído 0.001%.....	20
Figura 5. Comparación entre las concentraciones celulares (cel mL ⁻¹) de las cepas de a) <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> , b) <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> y c) <i>Chattonella subsalsa</i> vivas, fijadas con paraformaldehído, etanol salino y lugol.....	23
Figura 6. Lisis celular de cepas de <i>Chattonella</i> fijadas con paraformaldehído 0.001%.	26
Figura 7. Autofluorescencia de cepas de <i>Chattonella subsalsa</i> fijadas con a) etanol salino 25% y b) paraformaldehído 1%.....	27
Figura 8. Pruebas de SYBR en cepas de <i>Chattonella subsalsa</i> fijadas con a) paraformaldehído 1% y b) etanol salino 25%.	28
Figura 9. Pruebas de fluorescencia con las sondas diseñadas para detectar <i>C. subsalsa</i> en varias cepas de <i>Chattonella</i> y en <i>Gymnodinium catenatum</i>	30
Figura 10. Eficiencias de hibridación de la sonda Csub-ITS en secuencias de A) <i>Chattonella subsalsa</i> y B) <i>Chattonella marina</i> , en la parte superior de cada gráfica se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda diseñada en las secuencias.	32
Figura 11. Eficiencias de hibridación de la sonda Csub-SSU en secuencias de A) <i>Chattonella subsalsa</i> y B) <i>Chattonella marina</i> , en la parte superior de cada gráfica se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda diseñada en las secuencias.	33

Figura 12. Eficiencia de hibridación de la sonda Cm-5.8S en secuencia de *Chattonella marina* en donde se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda en las secuencias. 34

Figura 13. Estructura secundaria de la región ITS1-5.8S-ITS2 de *Chattonella marina* en donde se muestran los sitios de unión de las sondas Csub-ITS y Cm-5.8S. 36

Figura 14. Estructura secundaria de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las secuencias de *Chattonella subsalsa* en donde se muestra los sitios de unión de las sondas Csub-ITS y Cs-5.8S. 37

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Oligonucleótidos seleccionados para el diseño de la sonda de <i>Chattonella subsalsa</i>	15
Tabla II. Sondas diseñadas a para la hibridación fluorescente <i>in situ</i> en células de <i>Chattonella</i>	25
Tabla III. Combinaciones de temperaturas de hibridación, lavado y concentración de formamida utilizadas para la pruebas de hibridación.	27

RESUMEN

El género *Chattonella* es un grupo de microalgas que poseen metabolitos secundarios tóxicos que afectan principalmente a los peces. Ya que carecen de una estructura rígida que las proteja, son frágiles a los métodos tradicionales de preservación y fijación. Aunado a ello, muchas de sus características morfológicas cambian bajo condiciones de estrés o con las condiciones de cultivo, dificultando su identificación por medio de la microscopía de luz. Una identificación más precisa se logra con ayuda de técnicas moleculares, mediante el diseño de sondas que permitan el reconocimiento de regiones específicas de ARNr; estas sondas unidas a un marcador fluorescente permiten una identificación más fácil mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), proveyendo de una herramienta útil para el monitoreo de florecimientos algales nocivos (FAN) de especies de *Chattonella*. Debido a esta problemática se busca desarrollar sondas moleculares para la cuantificación e identificación a nivel de especie de cepas de *Chattonella*, mediante microscopía de fluorescencia. Así se utilizaron las cepas CMPV-1, COPV-1 y CSNAV-1 aisladas del Golfo de California, además se probaron cepas aisladas provenientes de Japón y EUA. Para determinar cuál es el fijador más adecuado para el FISH se probaron los fijadores: glutaraldehído, paraformaldehído, la combinación de ambos y alcohol salino. Para evaluar la lisis causada por efecto de la fijación, se contaron células antes y después de la fijación. Las sondas se diseñaron a partir de secuencias de la región 5.8S, ITS1 y SSU del ARNr de cepas aisladas del Golfo de California, para poder diferenciar entre *Chattonella subsalsa* y *Chattonella marina*. El paraformaldehído a una concentración del 0.001% fue el fijador que presentó un menor efecto de lisis. Las densidades celulares para CMPV-1, COPV-2 y CSNAV-1 fueron de 11570, 11170 y 15750 cel mL⁻¹ antes de ser fijadas (en vivo), y de 27750, 29400 y 59980 cel mL⁻¹ fijadas con paraformaldehído, respectivamente. Las sondas Cm – 5.8S para *C. marina* y Cs-5.8S para *C. subsalsa* no lograron hibridar a ninguna de las condiciones probadas. A diferencia de las sondas Csub-ITS y Csub-SSU diseñadas para identificar a *C. subsalsa* para la cual sí hubo una señal de fluorescencia, pero estas no fueron específicas ya que también hibridaron con cepas de *C. marina*. La región ITS1-5.8S-ITS2 resulta no ser lo suficiente variable como para desarrollar sondas específicas para diferenciar especies de *Chattonella*. Con base en lo anterior, se podría considerar el hacer el diseño de las sondas a partir de secuencias que solo incluyan la región ITS2 y también el dominio hipervariable D2 de la sub unidad grande (LSU) del ARN ribosomal ya que estas secuencias muestran una gran variabilidad que permite diferenciar entre especies de *Chattonella*.

Palabras clave: *Chattonella*, fijación, hibridación, ARNr, sonda molecular, lisis

ABSTRACT

The genus *Chattonella* is a group of microalgae with toxic secondary metabolites that mainly affect fish. By lacking a rigid structure for protection, they appear fragile to the traditional fixation and preservation methods. Moreover, many of their morphological characteristics change under stress or culturing conditions, causing difficulties in the species identification with light microscopy. A more accurate identification can be accomplished using molecular tools through the design of probes that allow recognition of rRNA specific regions; these probes, together with a fluorescent marker, enable an easier identification by fluorescence *in situ* hybridization technique (FISH), providing a useful tool for monitoring harmful algal blooms (HAB) caused by these species. Due to this identification and preservation problems, development of molecular probes for the quantification and identification to species level of *Chattonella* strains using fluorescence microscopy is pursued in this research. The strains CMPV-1, COPV-1, and CSNAV-1 isolated from the Gulf of California were used; additionally, isolated strains from Japan and USA were tested. Determination of the most suitable fixation method for FISH was done testing the following fixatives: glutaraldehyde, paraformaldehyde, the combination of both, and saline ethanol. To evaluate lysis caused by the fixation effect, cells were quantified before and after fixation. Probes were designed from the 5.8 S rRNA region sequences obtained from isolated from the Gulf of California to discriminate between *Chattonella subsalsa* and *Chattonella marina*. Fixation with paraformaldehyde (0.001% concentration) showed the lowest lysis effect. The cell densities for CMPV-1, COPV-2, and CSNAV-1 were 11570, 11170, and 15750 cell mL⁻¹ respectively before fixation done (live cells), and 27750, 29400, and 59980 cell mL⁻¹ when preserved with paraformaldehyde. The probe Cm – 5.8 S for *C. marina* and Cs-5.8 S for *C. subsalsa* did not accomplish hybridization with none of the proven conditions. In contrast, probes Csub-ITS and Csub-SSU designed to identify *C. subsalsa* presented a fluorescence signal, however, it resulted in non-specific species probe given that it also hybridized with *C. marina* strains. The region ITS1-5.8 S-ITS2 is not variable enough to develop specific probes for the discrimination of *Chattonella* species, the design of probes from sequences that only include ITS2 region could be considered in further investigations, as well as the hypervariable dominion D2 of large sub-unit (LSU) rRNA given these sequences show greater variability that could allow discriminate between *Chattonella* species.

1. INTRODUCCIÓN

Los reportes sobre incidencias de florecimientos algales nocivos (FAN) ha tenido un incremento a nivel mundial. Dichos eventos han tenido un impacto negativo en la acuicultura, pesquerías y turismo; así como en el ambiente y la salud pública (Chen *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, se ha observado que hay una aparente ampliación del rango geográfico tanto regional como a escala mundial de ciertas especies nocivas del fitoplancton (Walsh *et al.*, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2003).

Por esta razón en muchas regiones del mundo se han implementado programas de monitoreo para proteger la salud pública principalmente y reducir las pérdidas económicas que ocasionan dichos florecimientos en diversos sectores de la sociedad (acuicultura, pesca, turismo y salud pública). Estos programas ofrecen un aviso acerca de un potencial florecimiento y su vez provee mayor información sobre el conocimiento de la dinámica local del fitoplancton tóxico en la zona (MacKenzie *et al.*, 2004; Karlson *et al.*, 2010).

La identificación de especies tóxicas o no tóxicas mediante microscopía de luz y por microscopía electrónica es un trabajo minucioso y que requiere de mucho tiempo la mayoría de las muestras son enviadas a laboratorios especializados donde el fitoplancton es identificado y cuantificado por especialistas. El enviar y procesar las muestras crea retrasos en alertar a los acuicultores de un potencial florecimiento algal nocivo. Un problema común pasa cuando la especie de interés es solamente un componente minoritario de la comunidad; otro es no poder diferenciar entre especies o cepas porque son muy parecidas morfológicamente. La identificación puede realizarse en menor tiempo y también ser más precisa, diferenciando entre familias, géneros y especies con ayuda de técnicas moleculares lo que permitiría hacer un diagnóstico más rápido y certero (Walsh *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008).

Desde hace tiempo se han realizado estudios filogenéticos moleculares, utilizando las secuencias de la familia de genes del ARN ribosomal (5.8S, 18S, 28S) y la región del espaciador interno transcrito 1 y 2 (ITS1 e ITS2), mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual ha sido útil para poder discernir sobre la taxonomía a nivel intraespecífico y niveles taxonómicos mayores. Considerando el uso de marcadores genéticos basados en datos filogenéticos moleculares, es posible diseñar sondas que permitan el reconocimiento de regiones específicas de ARNr de una amplia variedad de microorganismos; de tal forma se pueden identificar grupos de diferentes niveles taxonómicos o ser selectivas a nivel de identificación de especies. Cuando estas sondas se unen a un marcador fluorescente, el organismo blanco puede identificarse fácilmente mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) la cual se ha utilizado para la detección de algunas especies de microalgas, representando una técnica útil para el monitoreo de los florecimientos algales nocivos (Scholin *et al.*, 1994; Miller & Scholin, 1998; Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006).

El fundamento de la técnica FISH se basa en el principio general de la hibridación de ácidos nucleicos, la sonda se une a un blanco específico del ARN ribosomal de las células, resultando en un marcado brillante del alga entera por la gran cantidad de ribosomas objetivo dentro de la célula. La unión de la sonda al ácido nucleico se detecta mediante microscopía de epifluorescencia a una longitud de onda determinada por el fluorocromo utilizado para el marcaje de la sonda. Las condiciones del ensayo como son la concentración de formamida, la temperatura y el tiempo de hibridación deben optimizarse para favorecer la emisión de una señal fuerte de fluorescencia (Metfies *et al.*, 2006; Töbe *et al.*, 2010).

Un aspecto fundamental para la utilización de FISH es la técnica utilizada para la fijación de la muestra, ya que la fijación de la misma además de preservar la forma de la célula, reduce la autofluorescencia y favorece la permeabilidad de la membrana celular (Metfies *et al.*, 2006; Katano *et al.*, 2009; Töbe *et al.*, 2010).

Las especies del género *Chattonella* son productoras de ictiotoxinas; principalmente sustancias hemolíticas, compuestos hemoaglutinantes y metabolitos tipo brevetoxinas. Además poseen especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y radicales hidroxilo, así como ácidos grasos poliinsaturados libres de cadena larga (Oda *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994; Ishimatsu *et al.*, 1996; Twiner & Trick, 2000; Kim *et al.*, 2001). Las especies de este género tienen una distribución en zonas tropicales, subtropicales y templadas, y debido a esto han causado daños en la industria pesquera de E.U.A., India, China, Brasil y sobre todo en Japón y Australia, países que han tenido pérdidas importantes en la industria de la acuicultura (Imai *et al.*, 1998; Marshall & Hallegraeff, 1999; Tiffany *et al.*, 2001; Imai & Yamaguchi, 2012).

La fijación celular es una técnica básica e importante para el estudio de las microalgas, fijadores como el formol, glutaraldehído y la solución de lugol han sido utilizados ampliamente para estos fines (Katano *et al.*, 2009). La membrana celular de especies del género *Chattonella* posee un glicocálix en la superficie que al carecer de una estructura rígida que las proteja las hace muy frágiles a los métodos tradicionales de recolecta y a la preservación, lo que en algunas ocasiones las destruye y deforma debido a los cambios osmóticos producidos durante el proceso de fijación, dificultando su identificación por medio de la microscopia de luz. (Bravo-Sierra, 2004; Katano *et al.*, 2009).

Consecuentemente existe una confusión considerable en lo que respecta a la taxonomía del grupo y en algunos casos se han asignado a otras clases de algas. En el caso del género *Chattonella* su pared celular frágil y otras características morfológicas cambian en condiciones de estrés y/o bajo las condiciones de cultivo (Hallegraeff & Hara, 1995; Band-Schmidt *et al.*, 2004; Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006). Aunado a esto, durante su ciclo de vida presentan diferentes formas, en el caso de *Chattonella marina*, durante la fase de crecimiento exponencial generalmente tiene una forma ovoide y en la fase estacionaria presenta una forma más alargada, dificultando su identificación a nivel de especie (Gall *et al.*, 2008).

El desarrollo de sondas moleculares que permitan una identificación precisa de especies de *Chattonella* en complemento con la identificación por microscopía de luz, ayudará a implementar programas de monitoreo específicos para este grupo fitoplanctónico y contribuir a un mayor conocimiento sobre la dinámica y los factores que favorecen su proliferación en diversos ambientes marinos.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Estudios sobre *Chattonella* en México

En México los estudios sobre las especies de *Chattonella* se han enfocado principalmente en los registros de florecimientos; los cuales se han enfocado en un principio a la identificación y recuento de las especies, y la relación que presentan con las condiciones hidrográficas presentes.

En el Golfo de California recientemente se han tenido incidencia de especies del género *Chattonella* que, en algunos casos, han causado la mortandad de peces. En las costas de Sonora se observó mortandad de peces y algunas especies de almejas y pepinos de mar asociadas a un florecimiento de *Chattonella marina* y *C. ovata* en el 2003 (Barraza-Guardado *et al.*, 2003). Además, se tiene el primer registro de *Chattonella marina* dentro de la Bahía de La Paz en 2005, en el cual se reportaron densidades entre 1.9 a 3.5×10^6 cel L⁻¹ (Band-Schmidt *et al.*, 2005). En Sinaloa se tienen dos registros de floraciones, uno en la Bahía de Navachiste en el que se observó a *Chattonella subsalsa* y un segundo florecimiento a lo largo de la costa del estado por *Chattonella marina* y *C. ovata* ocasionando una mortandad de peces de entre 12 y 15 toneladas (Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2006).

No solo en el Golfo de California se ha registrado la presencia de estas especies, también se han reportado en el Golfo de México y en costas del Pacífico acompañadas de *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo*, especies pertenecientes a la Clase Raphidophyceae, misma a la que pertenece *Chattonella* (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Rodríguez-Palacios *et al.*, 2011).

Si bien se ha observado la presencia de *Chattonella* a lo largo del Golfo de California formando florecimientos, es una especie que se encuentra con abundancias altas durante Abril y Mayo y se ha registrado su presencia hasta octubre con densidades menores a las de primavera (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005). También se ha reportado un florecimiento multiespecífico en la Bahía de La Paz dominada por *Chattonella* spp. en enero, mes para el que no se tenía reporte de presencia de este género en años anteriores (Verdugo-Díaz *et al.*, 2013). Además, no es raro el que las especies de este género se encuentren asociados a otros grupos del fitoplancton; en este sentido se ha reporto un florecimiento en la que co-ocurrieron *Gymnodinium catenatum* y *Chattonella marina*, habiendo una dominancia de esta última sobre el dinoflagelado (López-Cortés *et al.*, 2011).

Recientemente se confirmó la presencia de *Chattonella subsalsa*, *C.marina*, y *Fibrocapsa japonica* en las costas del Golfo de California mediante el uso de genes ribosomales y del gen COI, además de que las cepas del Golfo presentan el radical superoxido y peroxidación lipídica. Además tienen la composición típica de ácidos grasos de la clase Raphidophyceae y la producción de un compuesto parecido a la brevetoxina (Band-Schmidt *et al.*, 2012).

Se comprobó el potencial ictiotóxico en las fases iniciales de *Paralabrax maculatofasciatus*, demostrando que son altamente sensibles a la exposición a cepas de *Chattonella* en un tiempo corto, además de que no es necesario una exposición directa para causar la mortalidad de las larvas, y el efecto tóxico es mayor cuando los embriones están recién eclosionados (Pérez-Morales *et al.*, 2014).

2. 2. Identificación de especies de *Chattonella* mediante el uso de técnicas moleculares

Debido a los problemas de la identificación por medio de microscopía de luz se ha tenido el interés en desarrollar técnicas que permitan tener una rápida y certera identificación de las especies de Raphidophyceae; además, se propone que se haga una revisión taxonómica del género *Chattonella* debido a que las secuencias de ADN ribosomal no son lo suficiente variables para separar en especies distintas a *C. marina*, *C. antiqua* y *C. ovata* (Edwardsen & Imai, 2006).

En un principio se utilizaron los anticuerpos monoclonales para diferenciar entre *Chattonella marina* y *C. antiqua* (Hiroishi *et al.*, 1988), no así con el perfil de ácidos grasos y esteroides que si bien puede separar entre *Heterosigma* y *Chattonella*, no son lo suficientemente específicos para poder distinguir entre *C. marina* y *C. antiqua* (Marshall *et al.*, 2002).

La familia de genes del ARNr ha sido utilizada para estudios filogenéticos de *Chattonella*, así como para la revisión completa de la clase Raphidophyceae, observándose que *Chattonella marina*, *C. antiqua* y *C. ovata* tienen secuencias idénticas (Bowers *et al.*, 2006; Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006). El gen COI y el gen *rbcL* también han sido utilizados para el desarrollo de microsátelites, así como para hacer la revisión taxonómica del género, con la cual se propone una nueva clasificación, en donde *C. ovata* y *C. antiqua* pasan a ser variedades de *C. marina*, debido a la similitud de sus secuencias y sus características morfológicas (Kamikawa *et al.*, 2007; Demura *et al.*, 2009).

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido de las más utilizadas. *E. gr.*, la técnica del PCR en tiempo real para la identificación y cuantificación de muestras de campo de las especies *Chattonella subsalsa* y *Heterosigma akashiwo* pudiendo diferenciar entre ambas especies (Coyne *et al.*, 2005); también por medio de la misma técnica se buscó la cuantificación simultánea de *H. akashiwo*, *C. verruculosa* y *C. subsalsa* (Handy *et al.*,

2005). Asimismo, se ha utilizado de la técnica de PCR en tiempo real a partir de muestras de cultivos de *C. subsalsa*, *C. marina*, *H. akashiwo* y *Fibrocapsa japonica* (Bowers *et al.*, 2004). El PCR de una célula (single cell-PCR) se ha utilizado para la detección de especies de rafidofíceas *Heterosigma akashiwo*, *C. marina* y *C. ovata*, para emplear esta técnica no se requiere una biomasa grande de la especie objetivo para su identificación (Kai *et al.*, 2006).

2. 3. Uso de la Hibridación Fluorescente *In Situ* en fitoplancton

La técnica de la hibridación fluorescente se ha utilizado principalmente para distinguir e identificar grupos del fitoplancton que se caracterizan por comprender especies que son similares morfológicamente y en donde su discriminación por medio de la microscopía de luz es difícil. Esta se caracteriza por preservar intacta la célula, al contrario de otras técnicas moleculares que solo es necesario el material genético, ya que la hibridación se lleva a cabo (*in situ*) dentro de la célula (Anderson *et al.*, 2005; Metfies *et al.*, 2006).

El poder discriminar entre especies morfológicamente parecidas permite distinguir entre especies que pueden producir toxinas y otras que no tienen un efecto tóxico. Como en el caso de las diatomeas del género *Pseudo-nitzchia*, ya que algunas de las especies producen ácido domoico (Bates & Douglas, 1993; Lundholm *et al.*, 1994). Así, se han desarrollado sondas específicas a partir de la sub unidad grande (LSU) del ARN ribosomal para la identificación de *Pseudo-nitzchia australis*, la cual es potencialmente tóxica y poder así diferenciarla de sus congéneres en muestras de cultivo; se ha observado que la sonda diseñada sí diferencia a *P. australis* de las demás especies (Scholin *et al.*, 1996). No obstante, en algunos casos las sondas diseñadas no resultan ser lo suficientemente específicas como para poder discriminar entre especies, una sonda diseñada para diferenciar a *P. subpacificica* reaccionó con cepas de *P. fraudulenta* y *P. heimii*; de igual manera, la

sonda diseñada para *P. pungens* no pudo distinguir cepas de la misma especie (Miller & Scholin, 1998).

Esta misma problemática existe con dinoflagelados del género *Alexandrium*; las especies *Alexandrium tamarense*, *A. fundyense* y *A. catenella* son similares morfológicamente y algunos autores los agrupan en el “complejo *tamarense*”, y existiendo además diferencias geográficas en las secuencias del ARN ribosomal (Scholin *et al.*, 1994; Scholin *et al.*, 1995).

Aunado a lo anterior se han desarrollado sondas que permiten distinguir entre las distintas especies y sondas para la identificación de *A. fundyense*, además del uso de anticuerpos para utilizarlos en distintas etapas de crecimiento (Anderson *et al.*, 1999). También se han diseñado sondas para identificar a *A. tamarense* y *A. catenella*, determinando que las sondas diseñadas para estas especies sí son específicas, al demostrar que no tienen reacción con otras especies del mismo género (Sako *et al.*, 2004). Dado que se puede distinguir una diferencia geográfica con las secuencias de ARN ribosomal, se han hecho sondas que permiten distinguir cepas de distintas áreas geográficas (John *et al.*, 2005).

Para Raphidophyceae también se han desarrollado sondas moleculares que permitan una detección rápida de las especies, ya que se han asociado a mortandades de peces. Se han diseñado sondas a partir de la sub unidad grande (LSU) del ARN ribosomal para la detección de *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* y así facilitar la identificación, dada la fragilidad que tienen estas especies (Tyrrell *et al.*, 2001). Además de estas sondas, también se diseñaron unas a partir de la sub unidad chica y de la región ITS1 solamente para la detección de *Heterosigma akashiwo* en cepas de Corea, teniendo una eficiencia de entre el 70 y 80% en la detección de las cepas en todo su ciclo de crecimiento (Chen *et al.*, 2008).

3. HIPÓTESIS

Dado que las regiones del ARN ribosomal son lo suficientemente variables para diferenciar entre especies, el desarrollar sondas moleculares a partir de las regiones 5.8S, ITS1 y SSU del ARNr y por medio de la hibridación fluorescente *in situ* permitirá distinguir entre las especies *Chattonella marina* y *Chattonella subsalsa*, facilitando su identificación y cuantificación.

4. OBJETIVO

Desarrollar sondas moleculares para la identificación y cuantificación de especies de *Chattonella* mediante la hibridación fluorescente *in situ*.

4. 1. Objetivos particulares

Seleccionar un fijador que permita mantener la forma de la célula y la permeabilidad de la membrana para las cepas de *Chattonella*.

Desarrollar una sonda molecular a partir de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ARNr de las cepas de *Chattonella* del Golfo de California para su identificación y cuantificación.

Optimizar las condiciones de temperatura y tiempo de hibridación para favorecer una emisión de fluorescencia definida.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5. 1. Cepas

Se utilizaron las cepas COPV – 2 aislada de Bahía de La Paz y CMCV – 1 aislada de Bahía Concepción, las cuales corresponden a la especie *Chattonella marina*. La cepa CSNAV – 1 de Bahía Navachiste, México la cual está identificada como *Chattonella subsalsa*.

Además de estas cepas de México, se utilizaron cepas de la *C. subsalsa* de: Florida Cha9706-1, California Cha9706-1 de E.U.A. y una de Singapur Cha0409-1. Además se utilizó una cepa de *C. antiqua* de Japón Cha0605-1.

5. 2. Medio de cultivo

Las cepas se mantuvieron en medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001). Este medio consiste en una solución de nutrientes (nitratos y fosfatos), vitaminas, metales traza y extracto de suelo, adicionados en agua de mar previamente filtrada y esterilizada.

5. 3. Condiciones de cultivo

Las condiciones de los cultivos fueron: temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad, con una irradiancia de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una salinidad de 34 ups. Las cepas se mantuvieron en tubos de 50 mL con 20 mL de medio.

5. 4. Prueba de fijación

Los fijadores a probar fueron glutaraldehído (GA), paraformaldehído (PFA), la combinación de ambos (GA/PFA) y una solución de etanol salino. Para hacer la solución stock de paraformaldehído al 10% se calentó agua destilada a 65°C en una plancha con un agitador magnético; una vez caliente el agua se le añadió el paraformaldehído en polvo, durante la agitación se le fueron agregando unos mililitros de NaOH (10 M) hasta que se disolviera el paraformaldehído; ya disuelto se hizo una dilución para tener una concentración final al 1%. La solución stock fue congelada a -18°C. Se utilizó una solución de glutaraldehído al 25% para microscopía electrónica (Sigma – Aldrich), de la cual se hizo la disolución para tener la concentración al 1%. Se utilizó una solución amortiguadora de Hepes (30 mM) en la que se hizo la dilución del glutaraldehído, paraformaldehído y la combinación de ambos (Katano *et al.*, 2009).

La solución de etanol salino se preparó a 22:5:3 volúmenes de etanol al 96%, agua destilada y solución amortiguadora SET 25X (3.75 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl y 25 mM EDTA, pH 7.8) respectivamente, se procuró que antes de adicionar el EDTA se tuviera un pH 8 ajustándolo con NaOH 10 M (Töbe *et al.*, 2010).

Antes de evaluar el efecto de los fijadores en las células, se determinó primero la concentración necesaria del fijador para cada muestra; para esto se fueron agregando alícuotas una mayor a una menor concentración de cada uno de los fijadores. Las cepas se cultivaron hasta la fase exponencial de crecimiento, en ella las células presentan la morfología característica de cada especie. Las concentraciones a probar fueron: 1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.002% y 0.001% de cada uno de los fijadores. Las muestras se mantuvieron por una hora con cada fijador y entonces se hicieron observaciones al microscopio.

Para este caso se realizó una evaluación cualitativa, observando principalmente que la membrana celular no estuviera rota, que la célula conservara la forma característica de la especie y la presencia del flagelo. Se buscó que la

totalidad de las células tuvieran las características anteriores. Se realizó un registro con una cámara ScopePhoto 3.0.

Después de obtener la concentración adecuada, se evaluó la lisis celular por efecto de la fijación realizando conteos antes (células vivas) y después de fijar las células. Los conteos se hicieron a los 9 días de crecimiento, tiempo en el cual se encuentran en la fase exponencial de crecimiento para cada una de las cepas. Se tomaron dos mililitros de muestra y se hizo una dilución 1:50, se les adicionó la cada uno de los fijadores elegidos ajustados a la concentración establecida anteriormente y se dejaron reposar durante una hora. Los conteos se realizaron por triplicado en una cámara de Sedgewick – Rafter. También se realizó una comparación con conteos utilizando lugol como fijador, el cual es usado habitualmente para fijar muestras de fitoplancton.

Los conteos se graficaron observar las diferencias en los conteos y se hizo un análisis de varianza para determinar si hay diferencias significativas entre los fijadores y los conteos en vivo, con el programa SigmaPlot 11.0

5. 5. Diseño de las sondas

Las sondas se diseñaron a partir de secuencias de la región 5.8S del ARN ribosomal del género *Chattonella*. Las secuencias utilizadas corresponden a cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California, E.U.A. y Japón las cuales se encuentran depositadas en la base de datos de GenBank. Se buscó que las secuencias fueran específicas para *Chattonella marina* y para *C. subsalsa*.

Las secuencias fueron alineadas con el programa Mega 5.1 utilizando clustal W, esto con el fin de obtener una secuencia consenso la cual fue utilizada para el diseño del oligonucleótido, la alineación fue revisada a mano.

La sonda se diseñó con el programa Primer3 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), la secuencia consenso obtenida de la alineación se introdujo al programa. Para el

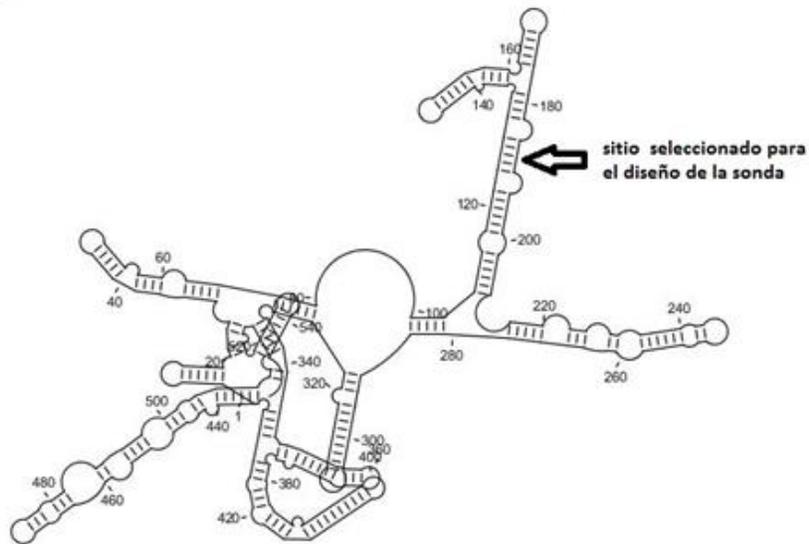
diseño se consideraron las siguientes características: tamaño de la sonda de 20 bases, porcentaje de guaninas (G) y citosinas (C) del 50%, una T_m (temperatura de fusión) 60°C. Las demás opciones presentes en el programa no se modificaron. El programa generó cuatro pares de oligonucleótidos.

Para comprobar cuál de los oligonucleótidos diseñados resultaba específico para *C. marina* y *C. subsalsa*, se compararon los 8 oligonucleótidos en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Este programa hace una búsqueda en toda la base de datos, para que un oligonucleótido sea seleccionado habría de tener una similitud del 100% de la secuencia y un valor de E cercano a cero.

También se realizó el diseño de las sondas a partir de secuencias de la región ITS-1 - 5.8S – ITS-2 del ARN ribosomal en ambas especies utilizando el programa CLC Main Workbench 6.8.4. Para este caso se construyó la estructura secundaria de la secuencia mediante el método de mínima energía libre (Zuker, 1989). El diseño de la sonda se hizo con base en las partes exteriores de la estructura secundaria (fig. 1), las cuales son las zonas con una mayor variabilidad. Las características que se indicaron en el programa fue que tuvieran una longitud de entre 18 – 20 bases y una temperatura de fusión entre 48 – 58°C, buscando que solo diseñara el oligonucleótido reversa. Se hizo el mismo procedimiento en BLAST descrito anteriormente para encontrar la secuencia que fuera lo más específica para cada una de las especies.

Secondary structure: $\Delta G = -204.5\text{kcal/mol}$

A



Secondary structure: $\Delta G = -199.4\text{kcal/mol}$

B

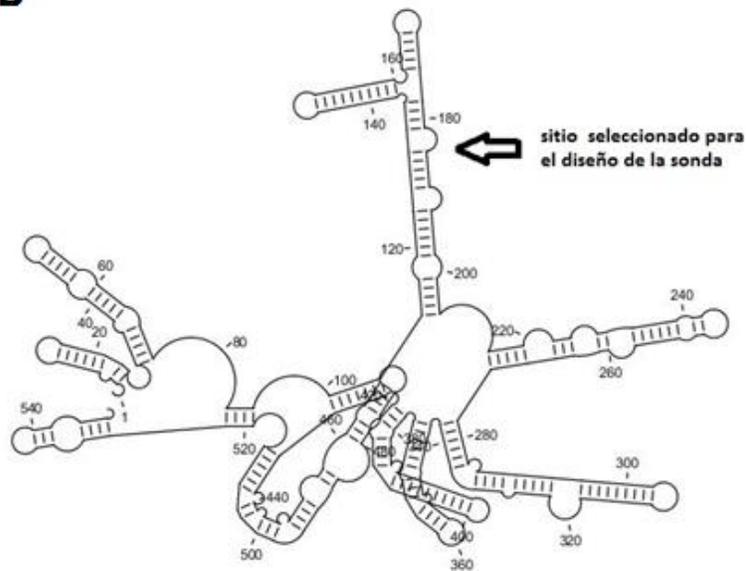


Figura 1. Estructuras secundarias de secuencias de la región ITS-1 – 5.8S – ITS-2 del ARN ribosomal de A) *Chattonella marina* y B) *Chattonella subsalsa*.

Por otra parte se hizo el diseño de una sonda para *Chattonella subsalsa* a partir de la región 18S del ARN ribosomal en el programa CLC Main Workbench 6.8.4. Primero se realizó la alineación de secuencias que correspondieran a esta región para obtener la secuencia consenso; una vez obtenida la secuencia consenso que es de 1,800 pares de bases, se seleccionó un fragmento de 350 pares de bases, tomando en cuenta los oligonucleótidos Cs 1350F y Cs 1750R (tabla 1); este fragmento corresponde a la zona variable de la región 18S (Coyne *et al.*, 2005). A partir de este fragmento se diseñaron los oligonucleótidos utilizando las características mencionadas anteriormente.

Tabla I. Oligonucleótidos seleccionados para el diseño de la sonda de *Chattonella subsalsa*.

ADN objetivo	Clave	Secuencia (5' – 3')
<i>Chattonella subsalsa</i> 18S ADNr	Cs 1350F	CTAAATAGTGTGGGTAATGCTTAC
	Cs 1750R	GGCAAGTCACAATAAAGTTCCAA

Además de las sondas diseñadas, se utilizaron las sondas UniC (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') como control positivo y UniR (5'-CAGCMGCCGCGGUAAUWC-3') como un control negativo (Embley *et al.*, 1992).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa Macrogen, realizando una síntesis automática mediante el Mermade 192 (Bioautomation E.U.A.) y una purificación PAGE, marcándose la región 5' con un fluorocromo FAM (6 – carboxifluoresceína), con una longitud de onda (λ) de excitación a los 492 nm y una emisión a los 518 nm de longitud de onda.

5. 6. Hibridación fluorescente *in situ*

Las sondas se prepararon a una concentración de $1 \text{ nmol } \mu\text{L}^{-1}$, posteriormente se hizo una dilución con TE (TrisHCl, EDTA) para obtener una concentración final de $200 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, se hicieron alícuotas y se congelaron. Se trabajó con un buffer de hibridación SET 5X (3.75 M NaCl, 0.5 M Tris HCl y 25 mM EDTA, pH 8), y el buffer de lavado SET 1X.

Las muestras se fijaron con paraformaldehído a una concentración de 0.001% y de 1%, y también con etanol salino al 25%, se utilizaron alrededor de 2 mL de muestra y se dejaron reposar una hora, después se hizo una dilución 1:50 con medio GSe para tener una concentración celular de alrededor de 300 cél mL^{-1} .

Se filtraron 2 mL de la muestra diluida a través de un filtro de policarbonato de $0.4 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, los filtros se pusieron en un portaobjetos. Para llevar a cabo la hibridación las membranas se cubrieron con $80 \mu\text{L}$ del buffer de hibridación el cual contenía las sondas a probar y formamida, los portaobjetos con los filtros fueron puestos a incubar. Las temperaturas de hibridación y lavado así como los tiempos de hibridación fueron optimizados para tener una fluorescencia específica intensa y remover la señal no específica. Para la prueba de tiempo de hibridación, se tomó un tiempo de 1 a 4 hrs., y las temperaturas de hibridación variaron entre $35 - 55^\circ\text{C}$ y de lavado entre $40 - 65^\circ\text{C}$. Además se probaron tres concentraciones de formamida 15%, 20% y 35%. Después de la incubación el filtro se lavó en 10 mL del buffer de lavado dejando incubar durante 20 minutos.

Todas las observaciones se efectuaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 con un filtro azul.

Para determinar que las sondas diseñadas son específicas para una especie, se hicieron pruebas cruzadas; esto es, se probó la sonda diseñada para *C. subsalsa* en muestras de *C. marina* y viceversa. Además se utilizaron muestras de *Gymnodinium catenatum* para confirmar la especificidad de las sondas.

6. RESULTADOS

6.1. Preservación de células en cultivo de *Chattonella*.

La respuesta de las cepas de *C. marina* var. *marina* y de *C. marina* var. *ovata* fueron diferentes de acuerdo a los fijadores y a la concentración de cada uno de ellos.

El glutaraldehído y la combinación de glutaraldehído y paraformaldehído a todas las concentraciones probadas causaron lisis en ambas cepas, por lo que no se pudo distinguir la membrana celular en la totalidad de las células evaluadas, deformándose y perdiéndose el flagelo de la célula (figs. 2E. 2F. 3E. 3F. 4E. 4F). Además, al agregar el fijador se formó una aglomeración de las células, que al observarse al microscopio se vio que había una agrupación de células deformadas rodeadas de mucus.

Se observó que el paraformaldehído en las concentraciones más bajas (0.005 y 0.001%) y en la concentración de 1% conserva de mejor manera la membrana celular y en algunos casos se puede observar todavía el flagelo. La forma de la célula se ve modificada, haciendo que la célula adquiera una forma redonda. En el caso de *C. marina* var. *ovata* (fig. 3b) se pueden distinguir las vacuolas, las cuales son una característica distintiva de esta variedad. En ambas cepas también se puede ver que el interior de la célula permanece intacto, ya que se pueden observar una gran cantidad de cloroplastos. En este caso no se observó la formación de mucus que aglomerara a las células.

Aunque a la concentración al 0.005% de paraformaldehído sí logra conservar a *Chattonella*, se observa que después de una hora, algunas células se desintegran; en otras el citoplasma sale de la célula y no se puede distinguir la membrana ni el flagelo. En cambio en la concentración al 0.001%, casi la totalidad de las células conservan la membrana intacta así como su flagelo.

La concentración de la solución de etanol al 25% permitió mantener la forma y la integridad de la membrana, así como al flagelo en las cepas de *C. marina* var. *marina* (fig. 2d). En caso contrario la cepa de *C. marina* var. *ovata* (fig. 3d) no pudo ser fijada con la solución de etanol salino en todas las concentraciones evaluadas se observó el efecto de lisis en la célula. Observándose que existen diferencias entre las cepas de una misma especie.

Con base en lo anterior el paraformaldehído a la concentración al 0.001% fue el fijador seleccionado para la prueba de hibridación al igual que la solución de etanol salino al 25%.

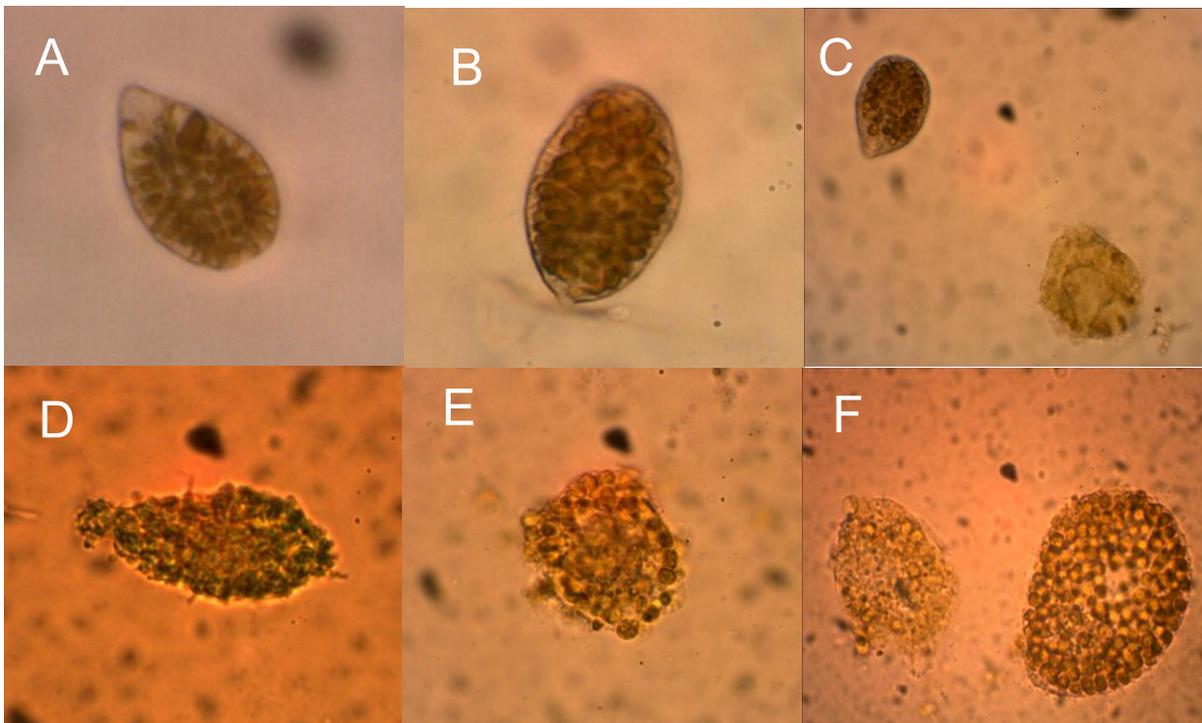


Figura 2. Células de *Chattonella marina* var. *marina* A) viva; y fijadas con B) paraformaldehído al 0.001%, C) paraformaldehído al 0.002%, D) etanol salino al 25%, E) glutaraldehído/paraformaldehído al 0.001% y F) glutaraldehído al 0.001%.

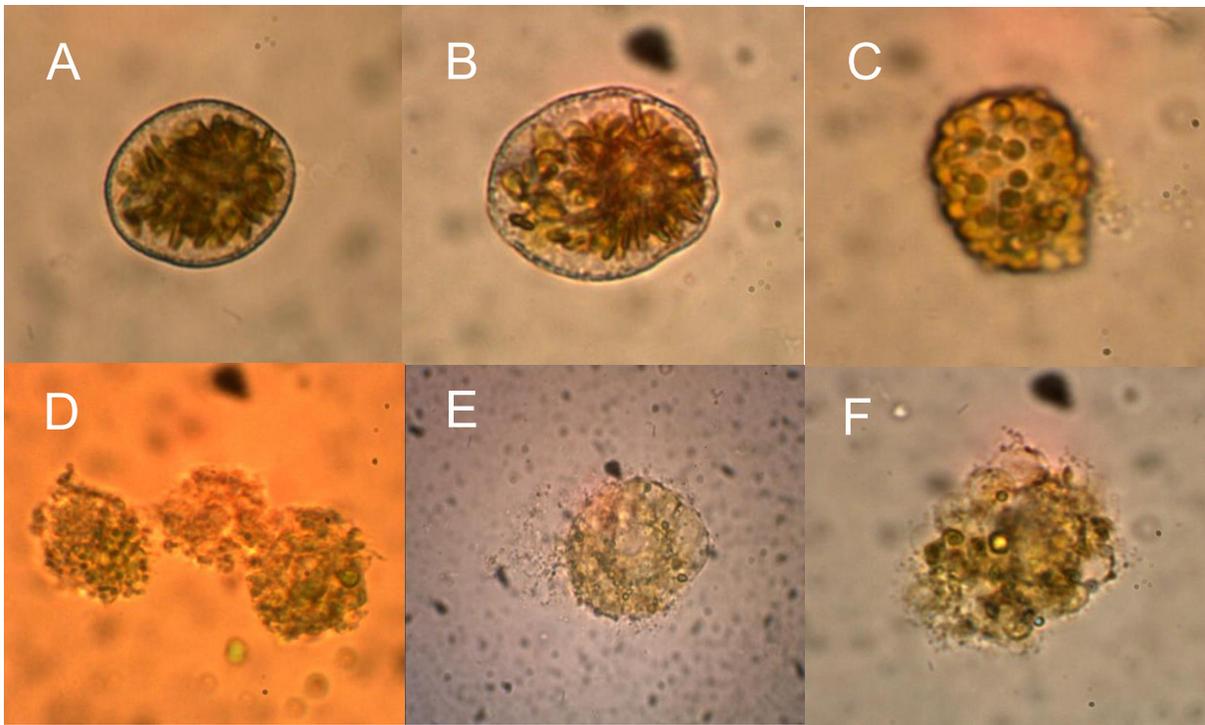


Figura 3. Células de *Chattonella marina* var. *ovata* A) vivas y fijadas con B) paraformaldehído 0.001%, C) paraformaldehído 0.002%, D) etanol salino 25%, E) paraformaldehído/glutaraldehído 0.001% y F) glutaraldehído 0.001%.

Las células de *C. subsalsa* tienen una respuesta distinta a los fijadores en comparación a las cepas anteriores. Con el glutaraldehído se observa lisis pero no es en la totalidad de las células, además de que se observa mucus alrededor de la membrana. La combinación del glutaraldehído y el paraformaldehído provoca el efecto de lisis en las células en todas sus concentraciones probadas.

El paraformaldehído en casi todas las concentraciones evaluadas fija a las células de *C. subsalsa* lográndose distinguir la membrana y el flagelo, aunque cambia un poco la forma todavía puede observarse la forma característica de la especie, siendo de una forma ovalada. La concentración al 0.001% de paraformaldehído es la concentración que mejor fija a la célula. En las concentraciones de 0.005% y de 0.002% con paraformaldehído no se ve un efecto de lisis, pero si una deformación ligera de la célula.

La solución de etanol salino al 25% es un buen fijador para *C. subsalsa*. En este caso no se conserva intacta la forma de la célula y cambian ciertas características del interior de la célula, además se puede distinguir la membrana celular, con este fijador la célula pierde el flagelo.

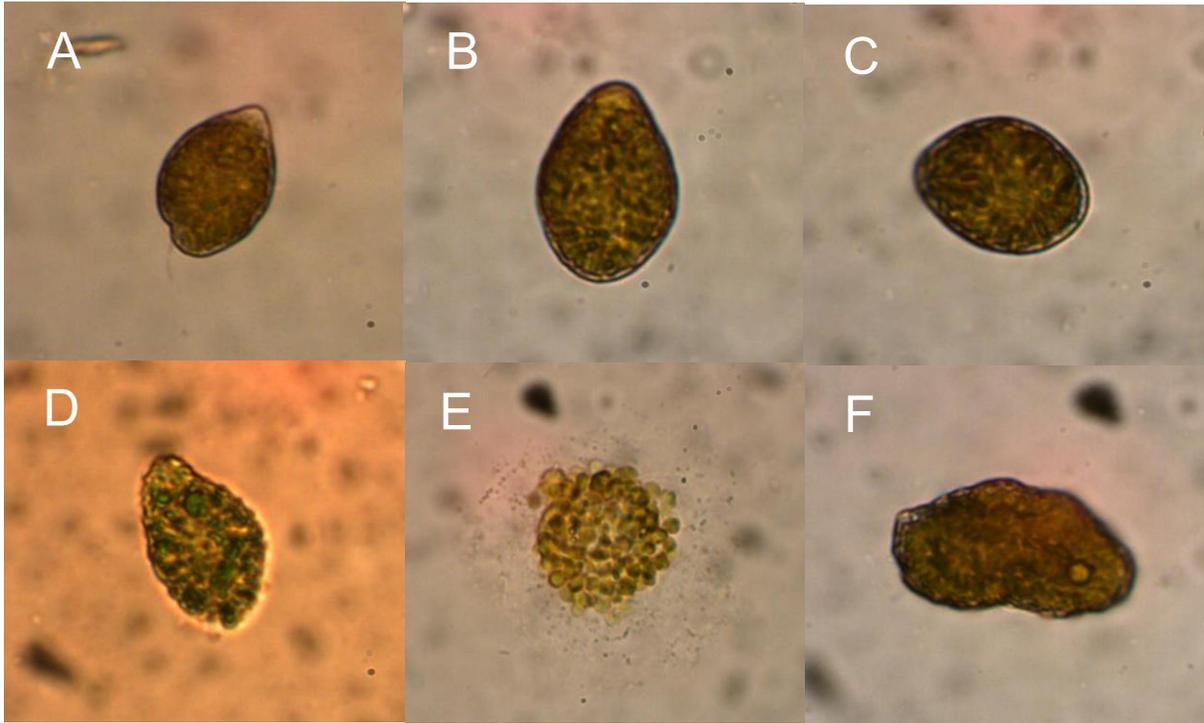


Figura 4. Células de *Chattonella subsalsa* A) viva y fijadas con B) paraformaldehído 0.001%, C) paraformaldehído 0.002%, D) etanol salino 25%, E) paraformaldehído/glutaraldehído 0.001% y F) glutaraldehído 0.001%.

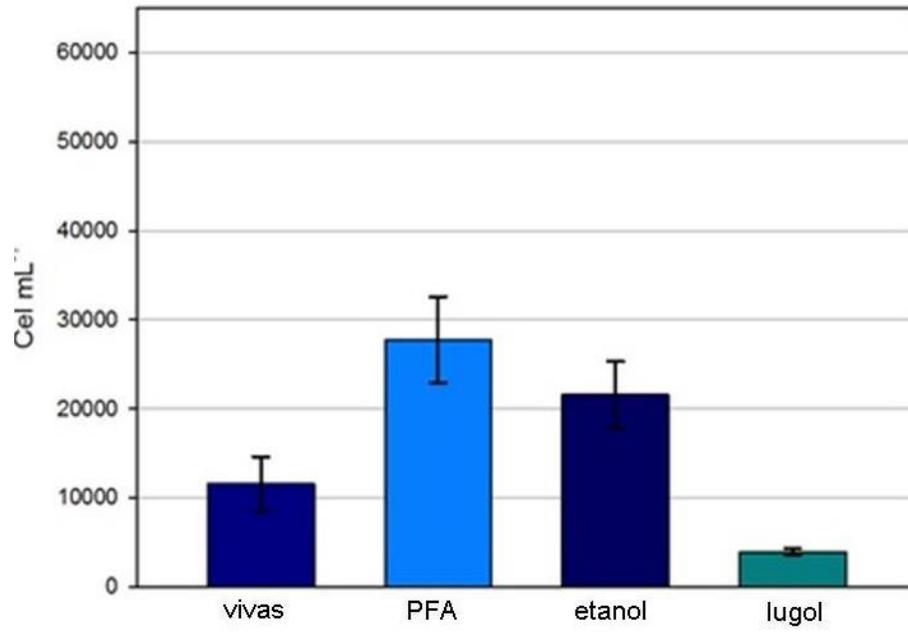
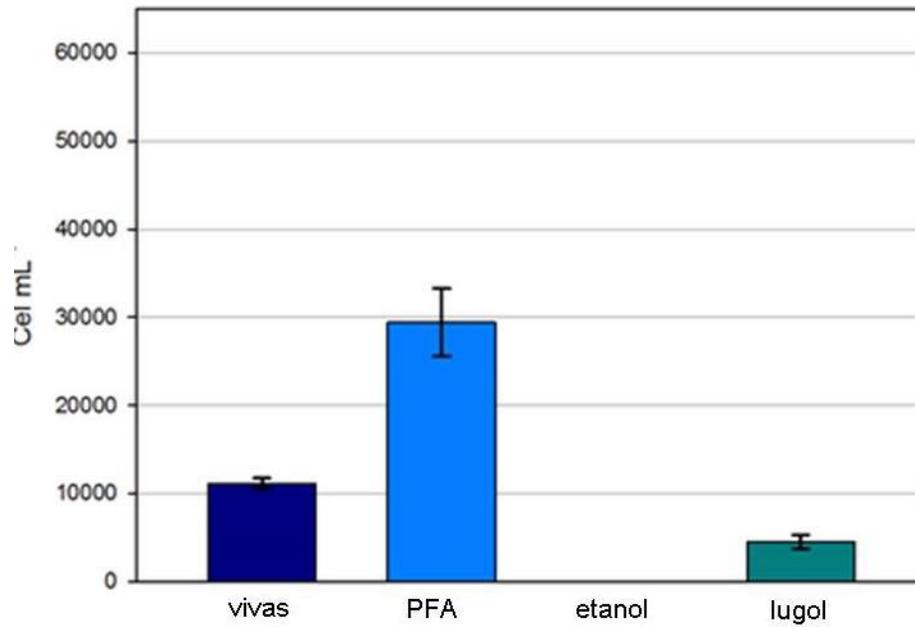
El paraformaldehído en la concentración del 0.001% y la solución de etanol a una concentración 25% fueron los fijadores que conservaron la forma y la integridad de la membrana de las células de *Chattonella*; fueron los seleccionados para hacer las comparaciones en los conteos celulares, entre las células vivas y fijadas, también se utilizaron conteos realizados con lugol.

En los conteos se observa que hay una diferencia cuando estos se hacen con las células fijadas en comparación con los realizados con las células vivas. Los conteos son mayores cuando se fijan con paraformaldehído, seguido por el etanol salino. Cabe resaltar que el lugol, siendo uno de los fijadores que más se utilizan en muestras de fitoplancton, es con el cual se obtiene una menor densidad celular.

Las densidades celulares de *C. marina* var. *marina* y *C. marina* var. *ovata* cuando se fijan con paraformaldehído son similares y se observa que esta densidad es mayor en comparación de los conteos con células vivas, hay una diferencia del 50% entre las células fijadas con el paraformaldehído en comparación con las células vivas (fig 5a y 5b). En el caso de *C. marina* var. *marina* con los conteos de células fijadas con etanol salino es mayor que las densidades de células vivas, pero menor que las densidades de células fijadas con paraformaldehído. Esto indica que hay una pérdida de células cuando se hace la fijación con la solución de etanol salino por un efecto de lisis celular (fig. 5a). Las densidades de *C. subsalsa* (60×10^3 cel mL⁻¹) fijadas con paraformaldehído son mayores (50% mayor) a las cepas de *C. marina* (fig. 5), pero cuando se comparan las densidades de células vivas son similares a las de *C. marina* al igual que las densidades fijadas con etanol salino.

Dado que la solución de etanol salino causaba lisis en las células de *C. marina* var. *ovata* no se realizaron conteos.

En las tres cepas analizadas, las densidades celulares de las muestras fijadas con lugol son menores a las demás densidades analizadas, esto quiere decir que el lugol no conserva de forma adecuada las células del género *Chattonella* debido a un efecto de lisis.

A**B**

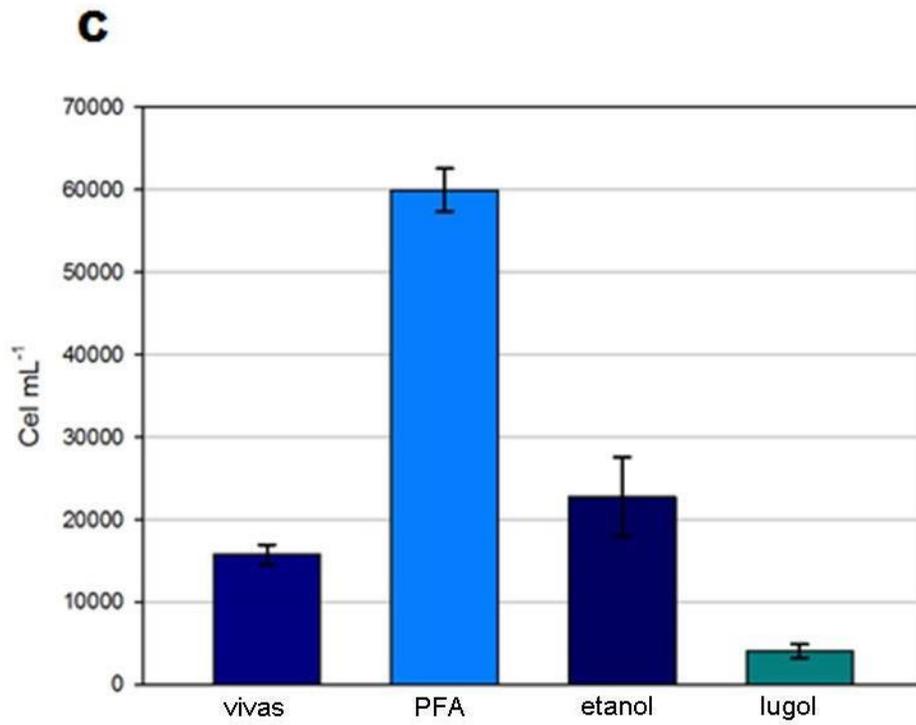


Figura 5. Comparación entre las concentraciones celulares (cel mL⁻¹) de las cepas de a) *Chattonella marina* var. *marina*, b) *Chattonella marina* var. *ovata* y c) *Chattonella subsalsa* vivas, fijadas con paraformaldehído, etanol salino y lugol.

6.2. Sondas diseñadas para identificar *Chattonella marina* y *Chattonella subsalsa*

El programa primer3 generó cuatro pares de oligonucleótidos de los cuales se seleccionaron dos secuencias (tabla II) que de acuerdo a la búsqueda que se realizó con el programa BLAST en la base de datos de GenBank, una resulta ser específicas para *Chattonella marina* y la otra para *C. subsalsa* a partir de secuencias del Golfo de California, Japón y E.U.A., estas secuencias son las que corresponden a la región 5.8S del ARN ribosomal.

Para el caso de las sondas diseñadas a partir de la estructura secundaria de la región ITS-1 – 5.8S – ITS-2, solo se seleccionó una secuencia la cual fue la que obtuvo un valor menor de E (Tabla II), el cual indica una mayor especificidad para la especie en ambos casos, y en donde la zona a partir de la cual se diseñó la sonda corresponde a la región ITS-1 en ambos casos.

Para la región SSU solo se pudo hacer el diseño para *Chattonella subsalsa* ya que los primers seleccionados del trabajo de Coyne *et al.* (2005) fueron diseñados para la identificación de esta especie, al igual que las sondas anteriores solo se seleccionó la sonda que tuvo el menor valor de E dado por el programa BLAST. Se intentó tomar la misma zona que cubrían estos primers para *Chattonella marina* pero de todas las secuencias formadas no resultaban lo suficientemente específicas como para discriminar *C. marina* de *C. subsalsa*.

La máxima diferencia que se obtuvieron con las sondas Csub-ITS y Csub-SSU comparando en el programa BLAST con secuencias de *C. marina* es de 95%. Esta diferencia del 95% va a corresponder a una sola base que no están reconociendo las sondas en los sitios de unión en las secuencias. Haciendo una búsqueda de la especificidad de las sondas en BLAST, se observó que la especificidad de las sondas Csub – ITS y Csub – SSU es del 95% para detectar a la especie *C. marina*, esto quiere decir que de las 20 bases que corresponden a la sonda, solamente una

va a ser la que varía y no reconoce el sitio de unión, sin embargo, esto no es determinante como para evitar que la sonda hibride con la secuencia de ARN.

Es importante señalar que el tamaño de las sondas diseñadas va a conferir una mayor especificidad disminuyendo el valor de E, por lo que el tamaño que se decidió utilizar fue de 20 bases, además de tener el tamaño adecuado para penetrar en la célula.

Tabla II. Sondas diseñadas a para la hibridación fluorescente *in situ* en células de *Chattonella*.

Especie objetivo	Región	Nombre	Secuencia 5' – 3'	Valor E
<i>Chattonella marina</i>	5.8S	Cm-5.8S	GCAACTACCGCCACTTCTTC	0.086
<i>Chattonella subsalsa</i>	5.8S	Cs-5.8S	TGGTCCAACAGACTCCAA	0.086
	ITS	Csub-ITS	GTCSAATGGGTTGGTTGGGT	0.086
	SSU	Csub-SSU	TAAAGTTCCAAGCCATAGTC	0.086

6. 3. Hibridación fluorescente *in situ*

Uno de los factores más importantes para realizar la hibridación fluorescente es la fijación de la célula. Para este trabajo se utilizó el paraformaldehído a una concentración de 0.001% y 1% así como la solución de etanol salino al 25%, estos fijadores y las concentraciones utilizadas corresponden a las analizadas en las pruebas de fijación.

En las primeras hibridaciones realizadas se observó que el paraformaldehído al 0.001% no conservaba la forma de la célula de manera eficiente, se observó lisis celular en la totalidad de las células tanto para las cepas de *C. marina* como para *C. subsalsa*. Por ello, no se pudo observar una fluorescencia específica, solo material celular y autofluorescencia.

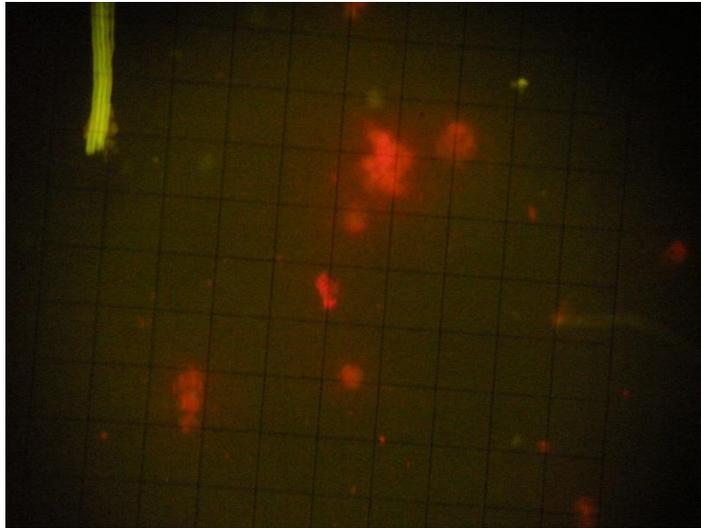


Figura 6. Lisis celular de cepas de *Chattonella* fijadas con paraformaldehído al 0.001%.

Con la solución de etanol salino se dio este mismo efecto de lisis para las cepas de *C. marina*. En caso contrario con *C. subsalsa* no se dio este efecto con la solución de etanol salino (Fig. 7), las células presentaron una forma redondeada y la membrana tenía una apariencia de estar hinchada.

Las células de *C. marina* y *C. subsalsa* tuvieron una mejor respuesta con el paraformaldehído al 1%, aunque se observó que la forma de la célula cambiaba de una forma ovalada que es característica del género, a una forma redondeada; la membrana celular se mantenía intacta y lo suficientemente permeable para permitir la entrada de la sonda.

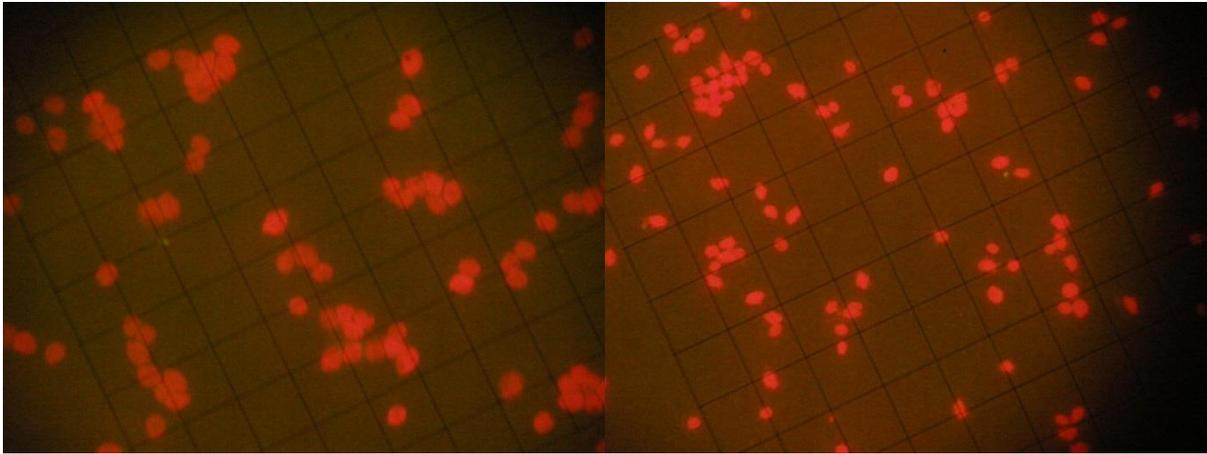


Figura 7. Autofluorescencia de cepas de *Chattonella subsalsa* fijadas con a) etanol salino 25% y b) paraformaldehído 1%.

Entonces el paraformaldehído al 1% fue el fijador seleccionado para continuar con las pruebas de hibridación para *C. marina* y *C. subsalsa*, y el etanol salino al 25% solamente para *C. subsalsa*.

Las primeras sondas a probar fueron las diseñadas para la región 5.8S del ARN ribosomal. Se hicieron distintas combinaciones entre las temperaturas de hibridación, lavado y las concentraciones de formamida (Tabla III).

Tabla III. Combinaciones de temperaturas de hibridación, lavado y concentración de formamida utilizadas para la pruebas de hibridación.

Temperatura hibridación	Temperatura lavado	Concentración formamida
35°C	40°C	35%
40°C	45°C	30%
45°C	50°C	20%
50°C	55°C	10%

No se observó fluorescencia de las células de ambas especies con las sondas diseñadas para la región 5.8S en todas las combinaciones especificadas anteriormente. Lo que se observa es la autofluorescencia de la clorofila que contienen las células. Aun con el control positivo, el cual está diseñado para hibridar con cualquier célula, tampoco mostro una señal de fluorescencia. En todos estos tratamientos el tiempo de hibridación fue de una hora.

Dado que no se observó fluorescencia se hizo una prueba de tinción de ácidos nucleicos con SYBR Gold, este fluorocromo se intercala entre las bandas de ADN. Esto se hizo para poder discriminar que la membrana no fuera lo suficientemente permeable como para permitir la entrada de la sonda a la célula. De acuerdo a esta prueba se observa que hay una señal de fluorescencia en los núcleos, lo cual indica que la membrana sí es permeable y permite la entrada de la sonda (Fig. 8).

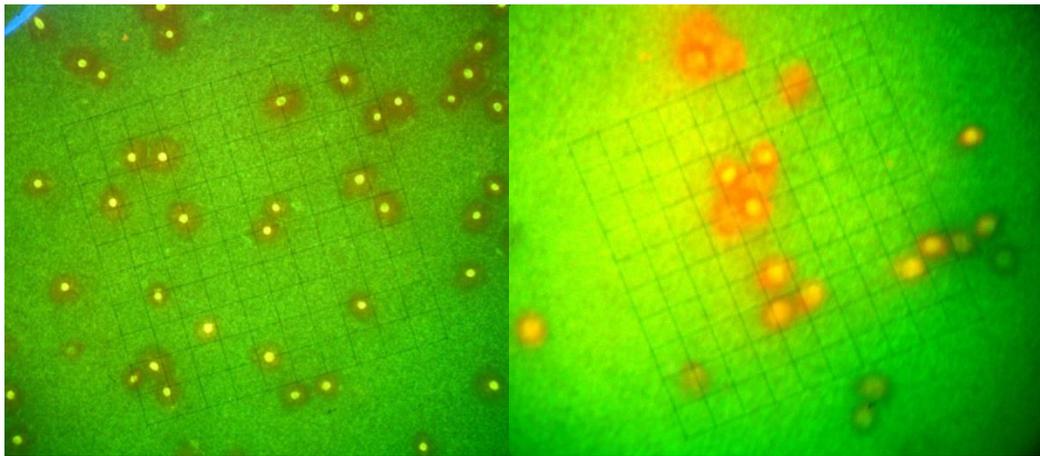


Figura 8. Pruebas de SYBR en cepas de *Chattonella subsalsa* fijadas con a) paraformaldehído 1% y b) etanol salino 25%.

Las sondas a probar diseñadas a partir de la región ITS – 1 y de la Sub Unidad Chica (SSU) del ARN ribosomal, la temperatura de hibridación y lavado fueron 40°C y 45°C respectivamente y la concentración de formamida de 15%. En estas pruebas lo único que se varió fue el tiempo de hibridación. Dado que una hora no fue considerado tiempo suficiente para la hibridación, se dejó hibridando durante

24 horas asegurando así que la sonda entre a la célula e hibride con los ribosomas. Dejando este tiempo se observó una señal de fluorescencia no muy intensa en el centro de la célula, indicando que las sondas sí habían hibridado con los ribosomas.

Lo siguiente fue reducir el tiempo de hibridación, se probaron cinco y tres horas. Con tres horas de hibridación se observa que hay una señal de fluorescencia pero esta es un poco menor a la que se observó dejando durante cinco horas, la cual es similar a la que se generó cuando se dejó hibridando durante 24 horas.

La señal de fluorescencia que se observa por la hibridación no es lo suficientemente intensa, se alcanzan a observar puntos definidos que posiblemente son los ribosomas, pero la señal se ve opacada por la autofluorescencia de la clorofila, o bien debido a que las células tienen una cantidad pequeña de ribosomas. En las muestras que hibridaron con la sonda Csub-SSU tiene una intensidad mayor en comparación a la sonda de la región ITS (Csub-ITS).

Con el fin de validar la especificidad de las sondas se realizaron pruebas cruzadas, las sondas diseñadas para diferenciar de *C. subsalsa* de *C. marina* no son lo suficientemente variables, al momento de hacer la hibridación con sondas para identificar *C. subsalsa* con cepas de *C. marina* se observa que hay una señal de fluorescencia. Esto quiere decir que las sondas no pueden diferenciar entre especies de un mismo género. Pero cuando se hizo la hibridación con *Gymnodinium catenatum*, no se generó una señal de fluorescencia utilizando las sondas diseñadas para *Chattonella subsalsa*.

Además de las cepas del Golfo de California se analizaron cepas de distintas regiones del mundo y en todos los casos se detectó una señal de fluorescencia, este resultado se generó también con cepas de *C. marina* var. *marina* y con *C. marina* var. *antiqua*, indicando que las sondas no son específicas para *C. subsalsa*, y que también permite el reconocimiento de cepas de distintas regiones del mundo con estas sondas; ello indica que las secuencias del ARN ribosomal son bastante conservados tanto entre especies como entre regiones geográficas.

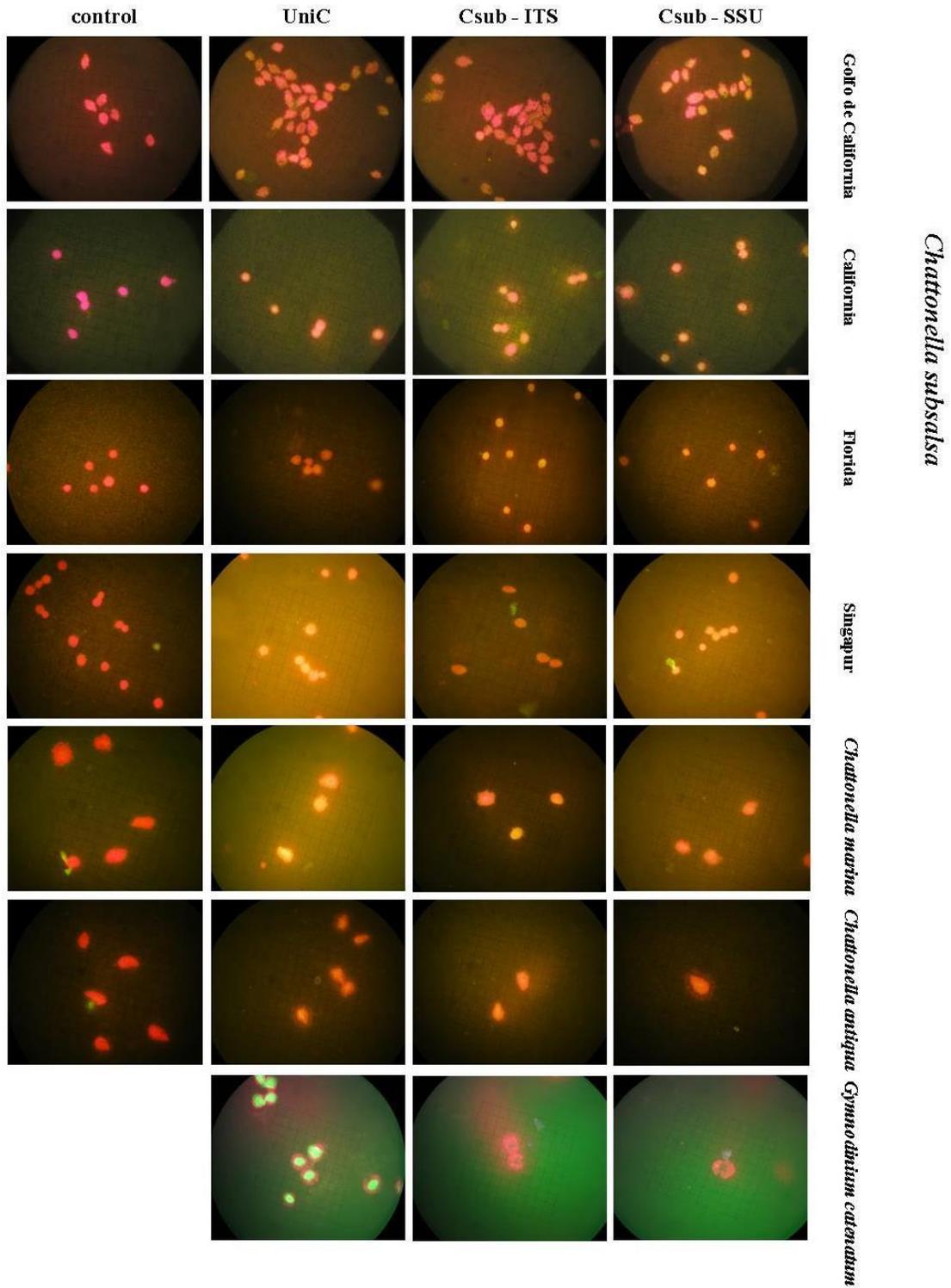


Figura 9. Pruebas de fluorescencia con las sondas diseñadas para detectar *C. subsalsa* en varias cepas de *Chattonella* y en *Gymnodinium catenatum*.

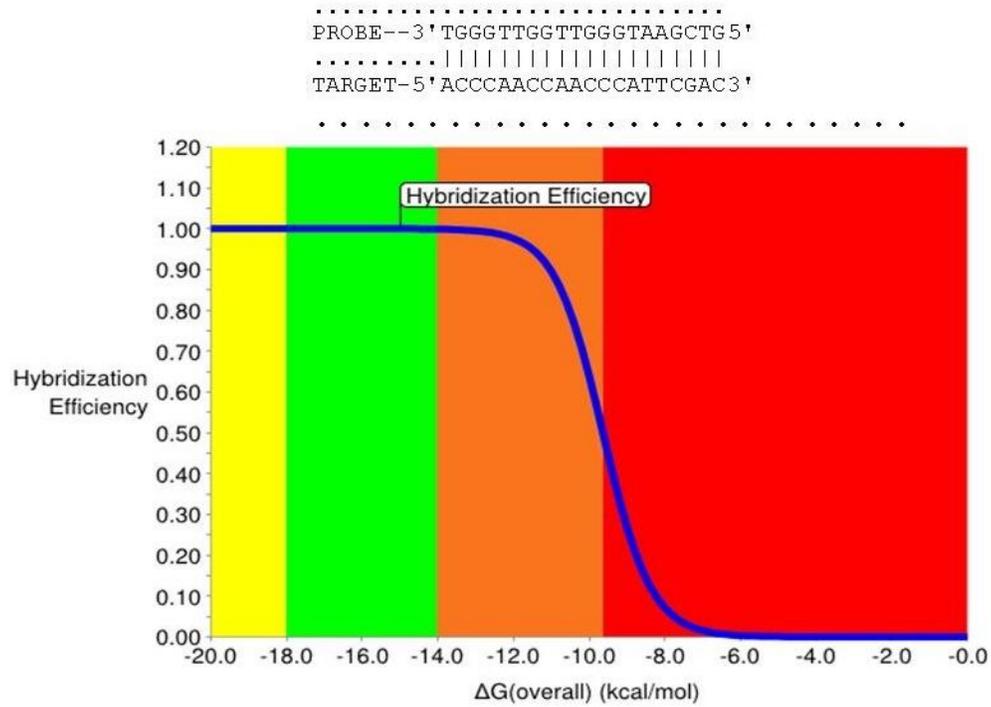
Para corroborar la especificidad de las sondas y su eficiencia de hibridación se realizaron las pruebas con el programa mathFISH (Yilmaz *et al.* 2011). Se observó que las sondas tenían una alta eficiencia de hibridación tanto con secuencias de *Chattonella subsalsa* como con *C. marina* (fig. 10) con las mismas condiciones de temperaturas de hibridación, y que el 95% de diferencia entre el sitio complementario que reconoce la sondas Csub-ITS y Csub-SSU solo es un cambio en una base; esto quiere decir, que aunque haya una base que no reconoce la sonda, cuando se lleva a cabo la hibridación la sonda va a tener un alto grado de que se una al sitio complementario en ambas especies, por lo que al momento de hacer las observaciones en el microscopio de fluorescencia se detecta una señal de fluorescencia en ambas especies.

Contrario a lo que pasa con las sondas de la región 5.8S (fig. 11), en este caso las eficiencias de hibridación para secuencias de *C. marina* como para *C. subsalsa* fueron bajas, lo que indica por qué al momento de hacer las pruebas de hibridación no se observó una señal de fluorescencia.

Las gráficas indican la relación entre la afinidad de la sonda y la eficiencia de hibridación, en cuanto más cercano a uno se encuentre es una mayor eficiencia, pero también el color indica la afinidad de la sonda, el color verde indica una alta afinidad de la sonda al sitio complementario de la secuencia, por esta razón las sondas Csub – SSU y Csub – ITS se observa una señal de fluorescencia en ambas especies.

El color naranja indica que la afinidad de la sonda es baja, las sondas de la región 5.8S para ambas especies tienen una baja afinidad al momento de llevar a cabo la simulación de hibridación, y esto explica por qué no se observó una señal de fluorescencia.

A



B

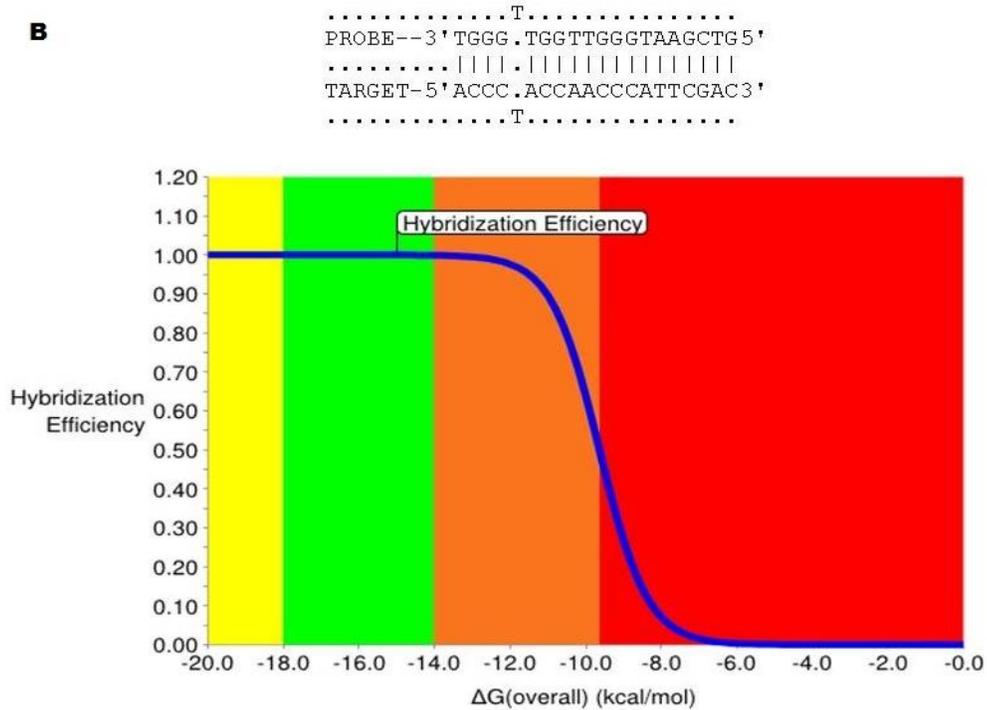


Figura 10. Eficiencias de hibridación de la sonda Csub-ITS en secuencias de A) *Chattonella subsalsa* y B) *Chattonella marina*, en la parte superior de cada gráfica se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda diseñada en las secuencias, el color indica el grado de eficiencia de hibridación.

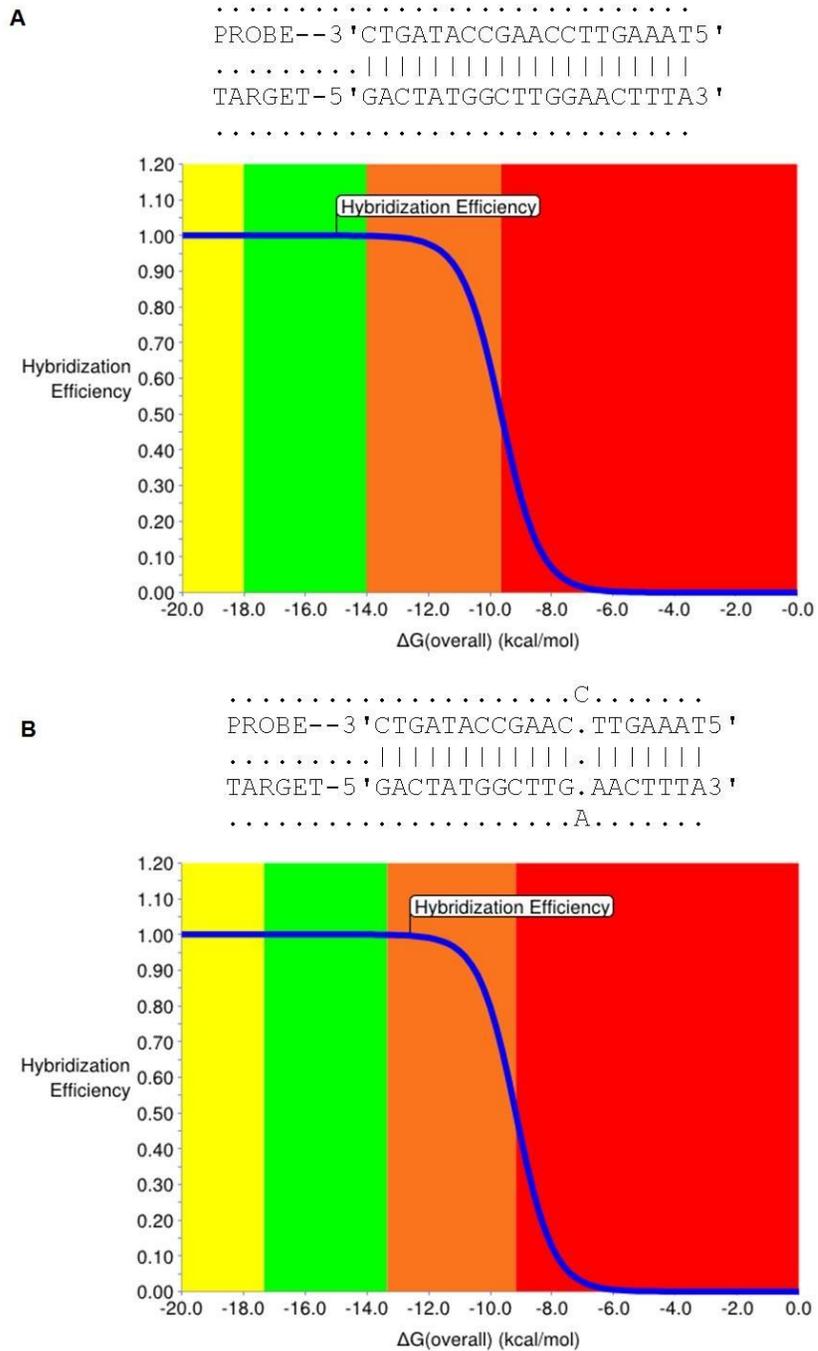


Figura 11. Eficiencias de hibridación de la sonda Csub-SSU en secuencias de A) *Chattonella subsalsa* y B) *Chattonella marina*, en la parte superior de cada gráfica se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda diseñada en las secuencias, el color verde indica un alto grado de eficiencia de hibridación.

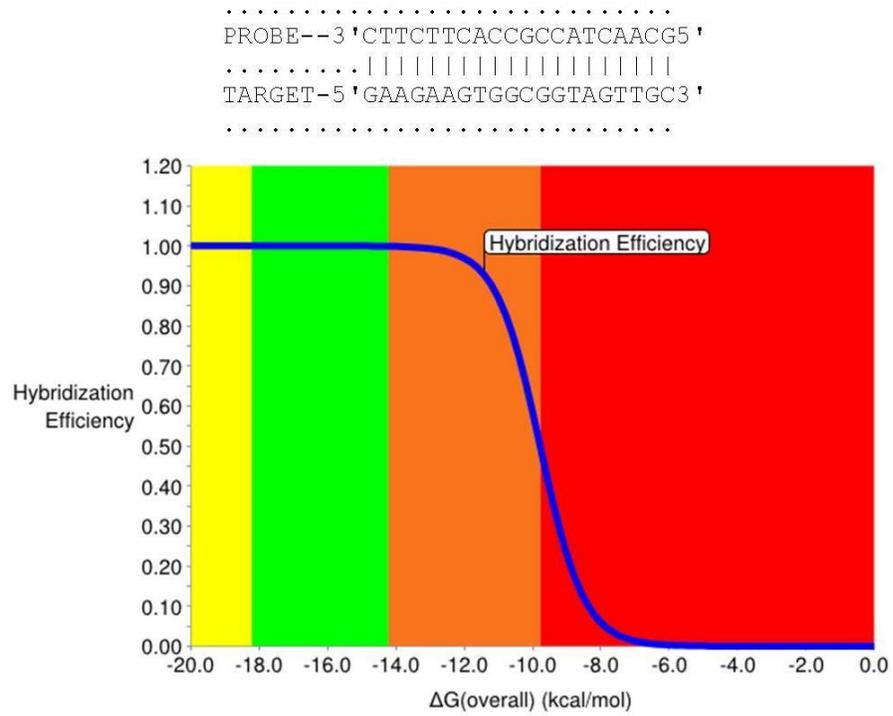


Figura 12. Eficiencia de hibridación de la sonda Cm-5.8S en secuencia de *Chattonella marina* en donde se muestra el sitio complementario que reconoce la sonda en las secuencias, el color naranja indica un bajo grado de eficiencia de hibridación.

El sitio complementario en el que se van a unir las sondas diseñadas es importante, sobre todo cuando se toma en cuenta la estructura secundaria ya que las partes externas de estas estructuras va a ser más variables que las zonas internas, que son regiones más conservadas (Töbe *et al.*, 2010).

Además de que dependiendo de cómo esté la estructura secundaria va a influir en la facilitación del reconocimiento de la sonda de su sitio complementario, ya que cuando se encuentran en zonas de difícil acceso va a complicar más el reconocimiento de la sonda al sitio. Para la sonda Csub-ITS se observó que el sitio complementario que reconoce la sonda se encuentra en un brazo de la estructura secundaria en ambas especies (Fig. 12. Fig. 13), lo que facilitaría el reconocimiento en ambas especies.

La sonda Cm-5.8S reconoce un sitio complementario que se encuentra en la zona interna de la estructura secundaria, por lo que se podría esperar que esto dificulte el acoplamiento de la sonda. En el caso de la sonda Cs-5.8S el sitio de reconocimiento se encuentra en un brazo de la estructura secundaria, en este caso se esperaría la sonda sí pudiera hibridar con las secuencias, pero en este caso se observó que no hubo una señal de fluorescencia lo que nos indica que no están reconociendo estos sitios.

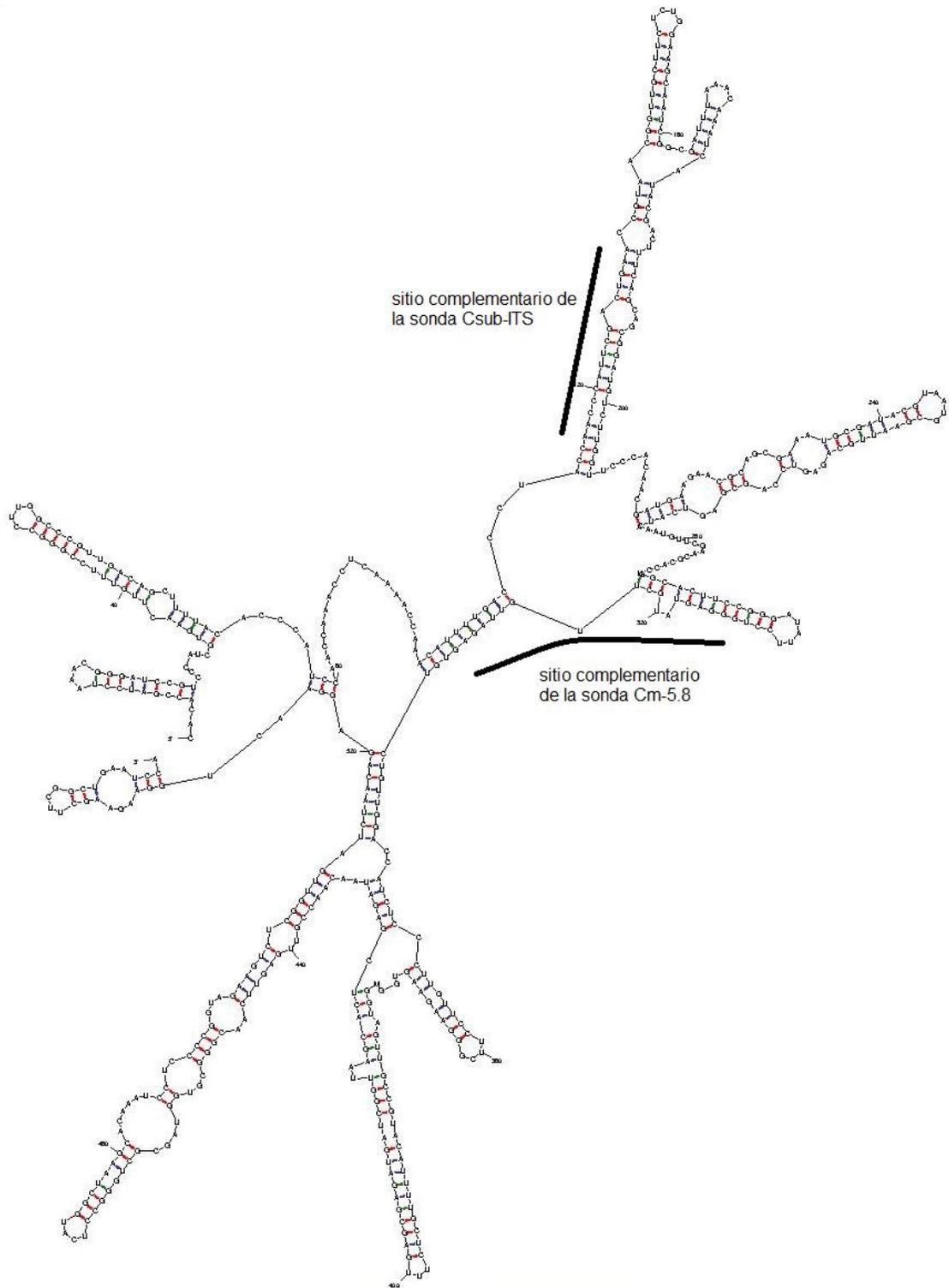


Figura 13. Estructura secundaria de la región ITS1-5.8S-ITS2 de *Chattonella marina* en donde se muestran los sitios de unión de las sondas Csub-ITS y Cm-5.8S.

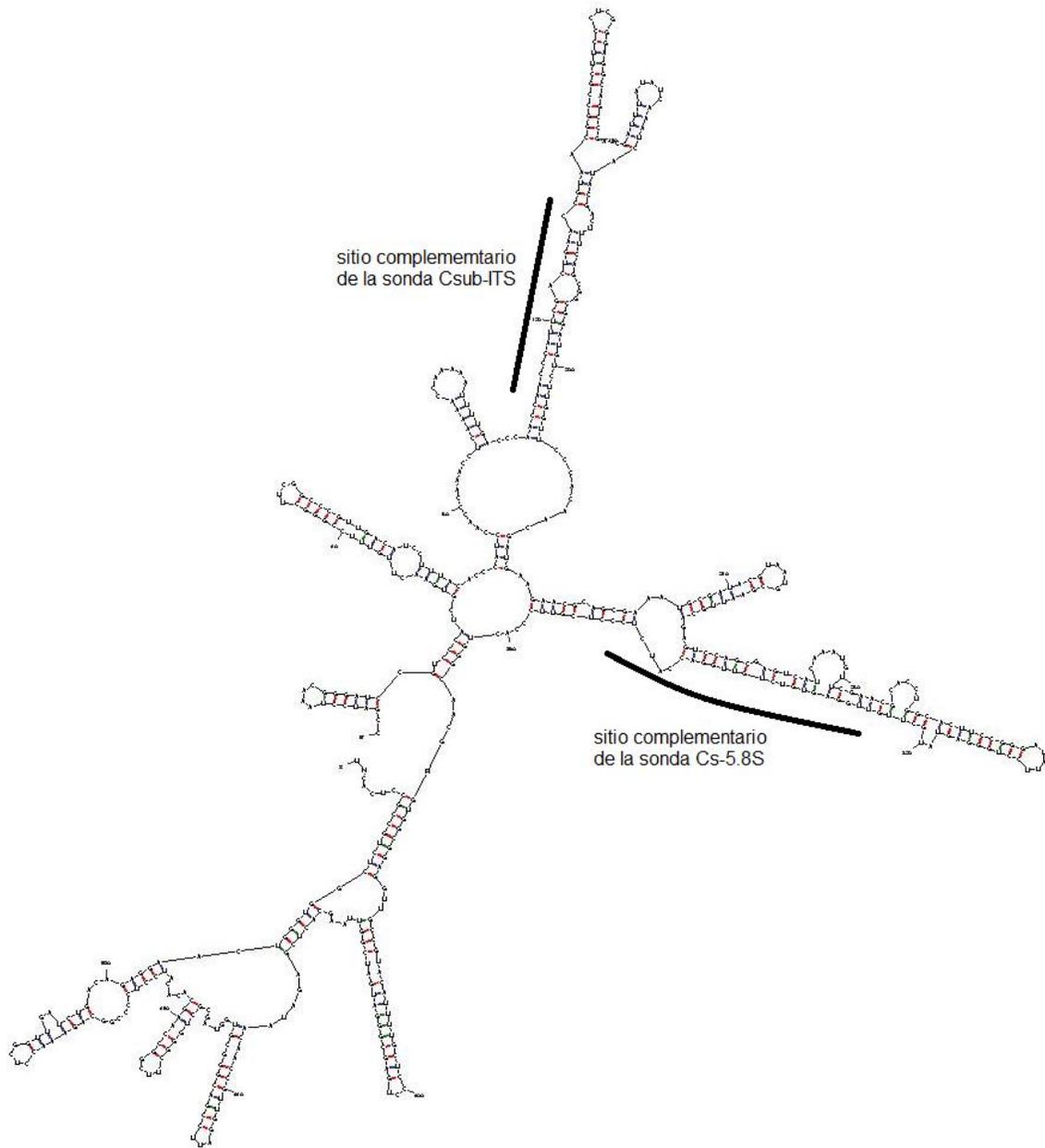


Figura 14. Estructura secundaria de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las secuencias de *Chattonella subsalsa* en donde se muestra los sitios de unión de las sondas Csub-ITS y Cs-5.8S.

7. DISCUSIÓN

El problema inicial que se tiene que resolver antes de intentar una hibridación fluorescente es el de preservar la célula para que la membrana sea lo suficientemente permeable y permita la entrada de la sonda. Es importante tomar en cuenta la concentración en que se utiliza el fijador y también el tiempo en que va a dejar la muestra, Lin & Carpenter (1996) en muestras de fitoplancton para hacer pruebas de epifluorescencia utilizaron el paraformaldehído a una concentración del 4%, resultando esta la concentración adecuada, misma que reprodujeron en varios grupos fitoplanctónicos, desde Chlorophyta hasta dinoflagelados; si bien en algunos de estos grupos presentan estructuras rígidas de protección la concentración que se utiliza es baja, y esto puede ser congruente por lo que el paraformaldehído al 1% tiene resultados óptimos al tratar de fijar las células de *Chattonella*, siendo una concentración menor ya que *Chattonella* carece de estructuras rígidas de protección, esta concentración es la adecuada ya que el fijador entra lo suficientemente rápido a la célula y hace que el cambio osmótico no provoque la lisis celular (Lindsay *et al.*, 1995).

Cuando se usa la solución de etanol salino se observa que hay una deformación de la células, estas se hacen redondas y se pierden los flagelos, dificultando su identificación por medio de la microscopía de luz, y esto mismo sucede con *Heterosigma akashiwo* una rafiidofícea que también presenta los mismos efectos de redondeo de las células y cambio morfológico, esto puede limitar su identificación y asegurar la eficacia de las sondas (Tyrrell *et al.*, 2001). *Heterosigma akashiwo* sometida a diferentes fijadores (Paraformaldehído 4%, formaldehído 4%, formailina 10%, glutaraldehído 2.5%, solución de etanol salino) tiene diferentes efectos, siendo la solución de etanol salino el que preserva de mejor manera a las células (Chen, 2008). Al igual que la especie *Heterosigma akashiwo* la solución de etanol salino sí fijo a las células de *C. subsalsa* y *C. marnina* var. *marina* observándose la misma deformación de la célula que se hacen redondas y aumentan su tamaño, pero a diferencia de *H. akashiwo* el paraformaldehído también funcionó

como fijador de las tres cepas de *Chattonella*, la diferencia en este caso fue la concentración y el buffer, en *H. akashiwo* se utilizó PBS (buffer de fosfato salino) y en este trabajo se usó una solución de Hepes.

Existe una problemática al momento de fijar células de plantas, ya que la presencia de las vacuolas hace a las células sumamente sensibles a los fijadores, si las condiciones no son las adecuadas las vacuolas pueden romperse y liberar enzimas hidrolíticas al citoplasma (Melan, 1999). Las células de *Chattonella marina* var. *ovata* presentan una gran cantidad de vacuolas alrededor de la membrana celular, y esto posiblemente es lo que esté ocasionando que con la solución de etanol salino no puedan ser fijadas por la ruptura de las vacuolas, las cuales liberan enzimas provocando la lisis celular.

En el trabajo de Katano *et al.* (2009) las densidades celulares para cepas de *Chattonella antiqua* fijadas con paraformaldehído al 1% fueron de 5,000 cel mL⁻¹ y en células vivas 8,000 cel mL⁻¹. La combinación de los resultados aquí obtenidos demuestra que las células de *Chattonella* tienen una mejor respuesta al paraformaldehído al 1% con densidades de 27,000 cel mL⁻¹ aproximadamente y para células vivas fueron de 11,000 cel mL⁻¹. En este caso con el paraformaldehído se tienen densidades superiores a las densidades obtenidas al contar células vivas.

Estas diferencias en las densidades también se pueden observar para cepas de *C. marina* y *C. subsalsa* las cuales fueron de 3168 ± 254 cel mL⁻¹ y 4592 ± 802, siendo fijadas con lugol (Band-Schmidt *et al.*, 2012). Estas disminuciones en las densidades las explican tanto Katano *et al.* (2009) y Band-Schmidt *et al.* (2012) al efecto de lisis que sufren las células al ser fijadas. Por esta razón se puede explicar el aumento en las densidades cuando se hacen los conteos con células vivas, ya que no hay una pérdida por el efecto de lisis.

La solución de etanol salino es ampliamente usada para la fijación de células en trabajos de hibridación *in situ*, y en la mayoría de los casos este fijador tiene buenos resultados para especies de *Pseudo-nitzschia*, *Alexandrium*, *Cochlodinium polikrykoides*, *Heterosigma akashiwo* (Scholin *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2005;

Chen *et al.*, 2008; Mikulski *et al.*, 2008). Aquí también se utilizó la solución de etanol salino con buenos resultados solamente para la fijación. Al momento de realizar las pruebas de hibridación, las cepas tuvieron una mejor respuesta con el paraformaldehído 1%, observándose una mejor señal de fluorescencia, además de que las cepas de *C. marina* var. *marina*, al momento de hacer la incubación las células se rompían.

Para obtener una mejor intensidad de la fluorescencia es importante tener las condiciones adecuadas de temperaturas de hibridación, lavado y además del tiempo de incubación de las muestras; estas condiciones varían de acuerdo con la microalga objetivo. En este caso se probaron cuatro intervalos de temperaturas: desde 35°C hasta 50°C de hibridación y de 40°C a 55°C de lavado con las sondas diseñadas para la región 5.8S, pero en ninguno de los casos se obtuvo una señal de fluorescencia debido a que el diseño de la sonda no fue el óptimo. Para células del género *Alexandrium* las condiciones de temperatura en donde se obtiene una mejor señal de fluorescencia son 40°C de hibridación y 50°C de lavado (Sako *et al.*, 2004). Para una rafiidofícea del género *Heterosigma* las temperaturas en las que se obtiene la mejor señal de fluorescencia son 45°C de hibridación y 55°C de lavado (Chen *et al.*, 2006). Estas temperaturas no varían mucho de acuerdo a las utilizadas para hacer la hibridación y el lavado utilizando las sondas Csub – ITS y Csub – SSU. En ambos casos se utilizaron 40°C de hibridación y 45°C de lavado, por lo que estas temperaturas pueden ser las adecuadas para distintas especies de varios grupos del fitoplancton.

El ADN se desnaturaliza entre 90° - 100°, y para la hibridación *in situ* implica que la preparación puede ser hibridada a 65 – 75° por periodos prolongados y esto puede deteriorar la morfología del ADN, por esta razón se utilizan solventes orgánicos reduciendo la estabilidad térmica de la cadena, por lo que la hibridación puede ser realizada a bajas temperaturas. La formamida puede reducir la temperatura de desnaturalización (Tm) en 0.6 – 0.72 °C por porcentaje de formamida (Raap *et al.*, 1986). La razón por la se utilizaron temperaturas mayores a las reportadas en otros trabajos es que se utilizaron concentraciones de formamida

relativamente bajas (15%), esto se realizó debido a que las células de *Chattonella* son frágiles, y con estas concentraciones bajas se quería evitar que las células fueran dañadas por este solvente orgánico.

El cambio importante que se puede ver en este trabajo es el tiempo de hibridación, ya que la sonda UniC seleccionada como control positivo no emitió una señal de fluorescencia con una hora de hibridación y se aumentó el tiempo que se dejarían hibridar, en este caso se estableció que con 5 horas se obtenía la mejor señal de fluorescencia, este tiempo es mayor al utilizado para *Heterosigma* el cual es de 1 hora y sobrepasa al utilizado para *Alexandrium* que con tan solo 5 minutos de hibridación genera una señal de fluorescencia bien definida (Sako *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). En este caso, las sondas van a tardar más en entrar a la célula y unirse con su complemento en el ribosoma, tal vez la permeabilidad de la membrana dificulta la entrada de la sonda o los sitios de reconocimiento no se encuentran tan expuestos como para que la sonda reconozca rápidamente los sitios complementarios.

Otro método que puede servir para aumentar la intensidad de la fluorescencia es hacer que el efecto de autofluorescencia de las células por la clorofila sea atenuado por medio de solventes que degraden la clorofila. En células de *Alexandrium* se utilizó acetona al 80%, etanol al 80% y metanol al 80% para disminuir esta autofluorescencia y se obtuvo que la acetona es el solvente que redujo este efecto (Hosoi – Tanabe & Sako, 2005). El principal problema que se tuvo con *Chattonella* es que la autofluorescencia es muy intensa y esto atenúa la señal de la fluorescencia de la sonda. Bien se podrían aplicar estos solventes para reducir este efecto, pero se estaría corriendo el riesgo de que las células se destruyan por la fragilidad que tienen; entonces se podrían aplicar concentraciones menores hasta poder disminuir la autofluorescencia evitando la lisis celular, el uso de metanol podría ser útil ya que se ha utilizado para disminuir la autofluorescencia de la clorofila en *C. marina var. antiqua* (Yamaguchi & Imai, 1994). Una alternativa al uso de solventes fue el guardar las muestras ya montadas en los portaobjetos a -4°C durante unos días. Así se observó que cuando se procedía a congelar las muestras había una

mejor señal de fluorescencia que cuando las observaciones se realizaron inmediatamente después de haber sido preparados.

La fase de crecimiento en la que se encuentran las microalgas es un factor importante que tiene que ver con la intensidad de la fluorescencia. En células de *Alexandrium fundyense* hay una mayor señal cuando las algas se encuentran en la fase exponencial de crecimiento en comparación con las que están en la fase estacionaria (Anderson *et al.*, 1999). El momento en que se hicieron las pruebas de hibridación con las cepas de *Chattonella* se procuró que fuera a los nueve días de crecimiento, cuando se encuentran en la fase exponencial de crecimiento; aunque no se muestra el dato, se observó que hacer las pruebas de hibridación con cultivos de más de nueve días era menos intensa la señal de fluorescencia, y esto puede deberse a que el material genético no es de buena calidad, con lo que se puede demostrar que la fase de crecimiento es importante para las pruebas de hibridación *in situ*, y es importante considerarlo cuando esta prueba se quiera implementar en muestras de campo.

El principal problema de identificación que se tiene con las especies del género *Chattonella* es su similitud morfológica, básicamente una de las formas para poder diferenciarlas por medio de microscopia de luz es el tamaño, y ciertas características como la punta anterior carente de cloroplastos en *C. marina*, la presencia de vacuolas en la periferia en *C. ovata* (Hallegraef & Hara, 1995). De ahí la justificación para diseñar marcadores moleculares que faciliten la diferenciación entre las especies. En el caso de *Chattonella* se ha demostrado que los genes ribosomales son sumamente conservados; en algunos casos, como por ejemplo las especies *C. marina*, *C. antiqua* y *C. ovata*, no existe una variación en las secuencias de los genes ribosomales 18S, 28S y 5.8S (Hosoi – Tanabe *et al.*, 2006), y ahí radica el problema de diseñar sondas específicas para poder diferenciar entre las especies. Las secuencias de *Chattonella* de la sub unidad chica del ARN ribosomal (SSU) son sumamente similares; según Bowers *et al.* (2006) las secuencias de *C. subsalsa* y de *C. marina* son similares en un 99%. Esto quiere decir que cualquier diseño de una sonda a partir de secuencias de la región SSU tiene una alta probabilidad de que no

sean específicas para una especie, por esta razón al momento de querer hacer el diseño de la sonda para *C. marina* no se podía diferenciar de entre las de *C. subsalsa* al momento de hacer la búsqueda en BLAST.

La región ribosomal ITS 1 – 5.8S – ITS 2 se caracteriza por tener una tasa de divergencia relativamente alta (Schlötterer *et al.*, 1994). Por ello resulta una referencia útil para poder hacer estudios geográficos entre especies y dentro de la misma especie, por lo que se seleccionó como primera opción para el desarrollo de una sonda específica. En trabajos de estudios filogenéticos de rafidofíceas se ha observado que la variación que tiene *C. marina* con respecto a *C. subsalsa* es del 10% aproximadamente (Bowers *et al.*, 2006; Hosoi – Tanabe *et al.*, 2006; Demura *et al.*, 2009; Band-Schmidt *et al.*, 2012). Se esperaba que la sonda Csub – ITS pudiera reconocer cepas de una misma especie de distintas regiones geográficas y además que fuera lo suficientemente variable como para distinguir entre distintas especies, ya que en las secuencias de esta región de *C. subsalsa* no hay variación (Bowers *et al.*, 2006; Band – Schmidt *et al.*, 2012). Por lo que sería un recurso útil para poder detectar una misma especie en diferentes partes del mundo, en este caso si puede hibridar con cepas que se encuentran geográficamente separadas; el problema es que no puede distinguir entre diferentes especies.

Una alternativa para el diseño de una sonda específica utilizando la región ITS1 – 5.8S – ITS2 podría ser el uso solamente del gen ITS2 por tres razones descritas por Schultz y Wolf (2009): 1) el análisis de la estructura secundaria extiende la aplicación taxonómica de este marcador. Considerando la rápida evolución de ITS2 resulta adecuado principalmente para análisis a nivel de especie o inferiores; al añadir la información estructural permitirá un análisis a rangos taxonómicos mayores, 2) los resultados del análisis de la estructura secundaria pueden mejorar la resolución filogenética obtenida de la estructura primaria, y 3) la información estructural pueden dar nueva información mediante el análisis de cambio de base compensatoria (CBC) y proveer de una referencia para la delimitación de especies. Y esto no solo podría ayudar para el desarrollo de una sonda molecular para la identificación de especies, sino también podría esclarecer muchas dudas que

se tienen acerca de la filogenia y taxonomía del género *Chattonella*, ya que en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) hay una cantidad considerable de secuencias del gen ITS2 para el género.

El considerar el uso de la sub unidad grande (LSU) del ARN ribosomal para el diseño de las sondas moleculares puede ser también otra alternativa, ya que esta región ha sido usada ampliamente para el diseño de sondas moleculares para su implementación en la hibridación *in situ* en especies del género *Alexandrium* y *Pseudo-nitzschia* (Scholin *et al.*, 1996; Miller & Scholin, 1998; Anderson *et al.*, 2005). La importancia que radica en esta región es que las secuencias del gen LSU contiene 12 dominios hiper-variables, de los cuales el dominio 2 (D2) es considerado la región más variable y altamente informativa en microalgas nocivas (Ki & Han, 2006). Considerar hacer un diseño de una sonda a partir de este dominio podría facilitar la identificación a nivel de especie del género *Chattonella*. No solamente permite el reconocimiento de distintas especies dentro de un mismo género; sino también ha permitido determinar diferencias geográficas en el complejo que forman las especies *Alexandrium catenella*, *A. tamarense* y *A. fundyense* distinguiendo entre cepas de América del Norte y de Asia (Scholin *et al.*, 1994).

Para el género *Chattonella* se tienen reportadas secuencias del dominio D1/D2 para las variedades de la especie *C. marina* y recientemente para *C. subsalsa* (Hosoi – Tanabe *et al.*, 2006; Klöpffer *et al.*, 2013); si bien en el primer trabajo solo se tienen secuencias de *C. marina* var. *marina*, *C. marina* var. *ovata* y *C. marina* var. *antiqua* se observa que hay ligeras diferencias con alguna substituciones de bases entre las variedades. Con el segundo trabajo que incluye a la especie *C. subsalsa*, de acuerdo con los árboles filogenéticos, se observan diferencias entre las especies similares a las obtenidas con el gen ITS. Esto quiere decir que el diseño a partir de secuencias utilizando el dominio 2 de la región 28S del ARN ribosomal permitirá obtener una sonda específica para cada especie.

Para el diseño de sondas específicas para las especies de *Chattonella* sería necesario el contar con un número grande de secuencias, pero en realidad no se cuentan con una gran cantidad de secuencias depositadas en las bases de datos para este género, sobre todo para secuencias de la región 28S del ARN ribosomal, en el cual se encuentra los dominios hipervariables D1/D2. Principalmente se han obtenido secuencias de cepas de Japón (Demura *et al.*, 2009; Imai & Yamaguchi, 2011). Lo que sería necesario es comenzar a generar una mayor cantidad de secuencias de diferentes regiones geográficas, esto con el fin de tener una mayor variabilidad para el diseño de las sondas y poder hacerlas específicas para cada especie. Como por ejemplo lo obtenido por Klöpffer *et al.* (2013) con cepas de *C. subsalsa* observaron que estas se diferencian de una cepa del Golfo de México de la misma especie.

8. CONCLUSIÓN

Las sondas diseñadas permitieron el identificar las cepas de *Chattonella* a nivel de género, pero no resultaron ser especie específica, habiendo una hibridación cruzada utilizando las sondas Csub – ITS y Csub – SSU; además de que estas sondas reconocen cepas aisladas de distintas regiones geográficas. Esto quiere que la región ITS1 – 5.8S – ITS2 del ARN ribosomal no es lo suficientemente variable como para poder diferenciar entre las especies de *Chattonella*. La variabilidad que presentan estas secuencias entre las especies de *Chattonella* parece no ser la suficiente como para poder desarrollar una sonda específica, pero se pueden seguir haciendo análisis con esta misma secuencia tomando en cuenta solamente la región ITS2, ya que esta muestra una mayor variabilidad y, considerando el uso de su estructura secundaria se podría evaluar si esta secuencia es adecuada para su uso como base para el diseño de una sonda molecular.

Tampoco se puede descartar la idea de usar secuencias de la sub unidad grande del ARN ribosomal, ya que se ha demostrado que ésta región tiene buenos resultados para la identificación en otros grupos del fitoplancton. Aunado a que en la bases de datos de GenBank ya se encuentran secuencias de este gen para especies de *Chattonella*.

La autofluorescencia de la clorofila fue uno de los efectos que inhibían una señal fuerte de fluorescencia por parte de la sonda que había hibridado con los ribosomas. El refrigerar las muestras ya montadas en el portaobjetos demostró ser un recurso para poder aumentar la señal de la fluorescencia, pero además de este proceso se puede considerar el uso de solventes que degraden la clorofila para disminuir la autofluorescencia, siendo el metanol uno de los solventes recomendados.

La hibridación fluorescente *in situ* es un recurso útil para poder identificar especies con las que se tienen problemas de identificación por medio de la microscopía de luz, e implementarla en programas de monitoreo. En este trabajo se buscó el adecuar el método descrito para la detección de especies de *Chattonella* y desarrollar una sonda que permita la identificación de estas especies. En este estudio se proporciona una evidencia de que el paraformaldehído 1% sirve para la fijación de estas células y es funcional con la hibridación, así también las temperaturas y tiempos de hibridación y lavado fueron adecuadas, pero se tiene que investigar una región del ARN ribosomal que sea lo suficientemente variable y que permita el desarrollo de una sonda específica, ya que la región ITS1 no resultó ser lo suficientemente variable como para poder diferenciar entre las especies de *Chattonella*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. M., D. M. Kulis & B. A. Keafer. 1999. Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labelling intensity with physiological condition. *J. Phycol.* 35: 870 – 883.
- Anderson, D. M., D. M. Kulis, B. A. Keafer, K. E. Gribble, R. Marin & C. A. Scholin. 2005. Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep-Sea Res. Pt. II.* 52: 2467 – 2490.
- Band-Schmidt, C. J., E. L. Lilly & D. M. Anderson. 2003. Identification of *Alexandrium affine* and *A. margaleffi* (Dinophyceae) using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assays. *Phycologia.* 42 (3): 261-268.
- Band-Schmidt, C. J., L. Morquecho, D. U. Hernández-Becerril, A. Reyes-Salinas & E. Bravo-Sierra. 2004. Raphidophyceans on the coasts of Mexico. *Hydrobiologia.* 515: 79-89.
- Band-Schmidt, C. J., A. Martínez-López & I. Gárate-Lizárraga. 2005. First record of *Chattonella marina* in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News.* 28: 6-7.
- Band – Schmidt, C. J., A. Martínez – López, J. J. Bustillos – Guzmán, L. Carreón – Palau, L. Morquecho, N. O. Olguín – Monroy, T. Zenteno – Savín, A. Mendoza – Flores, B. González – Acosta, F. H. Hernández – Sandoval & C. R. Tomas. 2012. Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia.* 693: 81 – 97.
- Barraza-Guardado, R., R. Cortés-Altamirano & A. Sierra-Beltrán. 2004. Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Ch. Cf. ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News.* 25: 7-8.

- Blackburn, S. I., C. J. Bolch, K. A. Haskard & G. M. Halegraeff. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*.40: 78-87
- Bowers, H., Tengs, T., Goto, S., Tomas, C., Ono, C., Yoshimatsu, S. & Oldach, D. (2004) Development of real-time PCR assays for the detection of *Chattonella* species in culture and environmental samples. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R. and Vargo, G.A. (eds.), *Harmful Algae* 2002. UNESCO. 231–233.
- Bravo-Sierra, E. 2004. Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Supl 1): 5-16.
- Chen, G. F., G. C. Wang, C. Y. Zhang, B. Y. Zhang, X. K. Wang & B. C. Zhou. 2008. Development of rRNA and rDNA-targeted probes for fluorescent *in situ* hybridization to detect *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 355: 66-75
- Cortés-Altamirano, R., R. Alonso-Rodríguez & A. Sierra-Beltrán. 2006. Fish mortality associated with *Chattonella marina* and *C. cf. ovate* (Raphidophyceae) blooms in Sinaloa (México). *Harmful Algae News*.31: 7-8.
- Coyne K. J., S. M. Handy, E. Demir, E. B. Whereat, D. A. Hutchins, K. J. Portune, M. A. Doblin & S. C. Cary. 2005. Improved quantitative real-time PCR assays for enumeration of harmful algal species in field samples using an exogenous DNA reference standard. *Limnol. Oceanogr. Methods*.3: 381-391
- Demura, M., M. H. Noël, F. Kasai, M. M. Watanabe & M. Kawachi. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* y *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia*.48 (6): 518-535.
- Embley T. M., B. J. Finlay, R. H. Thomas & P. L. Dyal. 1992. The use of rRNA sequence and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of

- the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1479-1487
- Gall, M., F. Hoe Chang, A. Bourdelais & D. Baden. 2008. Comparative studies of cell morphology, pigment composition and toxicity of two flagellates *Chattonella globosa* and *C. marina* (Class Raphidophyceae). En *13th international Conference on Harmful Algae*. Hong Kong.
- Gárate-Lizarraga, I., M. Muñetón-Gómez & V. Maldonado-Lopéz. 2006. Florecimiento del Dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Rev. Invest. Mar.* 27: 81-89
- Hallegraeff, G. M. & Y. Hara. 1995. Taxonomy of harmful marine Raphidophytes, 365-372. En Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson y A. D. Cembella (eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris.
- Handy S. M., D. A. Hutchins, S. C. Cary & K. J. Coyne. 2006. Simultaneous enumeration of multiple raphidophyte species by quantitative real-time PCR: capabilities and limitations. *Limnol. Oceanogr. Methods.* 4: 193-204
- Hiroishi S., A. Uchida, K. Nagasaki & Y. Ishida. 1988. A new method for identification of inter- and intra-species of the red tide algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae) by means of monoclonal antibodies. *J. Phycol.* 24: 442-444.
- Hosoi – Tanabe, S. & Y. Sako. 2005. Rapid detection of natural cells of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* (Dinophyceae) by fluorescence in situ hybridization. *Harmful Algae*.4: 319 – 328.
- Hosoi-Tanabe, S., I. Otake & Y. Sako. 2006. Phylogenetic analyses of noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, and *C. verruculosa* (Raphidophyceae) based on the rRNA gene family. *Fish Sci.* 72: 1200-1208.

- Imai, I., M. Yamaguchi & M. Watanabe. 1998. Ecophysiology, life cycle, and Bloom dynamics of *Chattonella* in the Seto Inland Sea, Japan. 95-112 pp. En: Anderson D. M., A. D. Cembella y G. M. Hallegraeef (eds.) *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag.Alemania.
- Ishimatsu, A., T. Oda, M. Yoshida & M. Ozaki. 1996. Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Chattonella marina*. *Fish. Sci.* 62: 836-837
- Kai A. K. L., Y. K. Cheung, P. K. K. Yeung & J. T. Y. Wong. 2006. Development of single-cell PCR methods for the Raphidophyceae. *Harmful Algae*. 5: 649-657.
- Kamikawa, R., I. Masuda, K. Oyama, S. Yoshimatsu & Y. Sako. 2007. Genetic variation in mitochondrial genes and intergenic spacer region in harmful algae *Chattonella* species. *Fish. Sci.* 73: 871-880.
- Karlson, B., A. Godhe, C. Cusack & E. Bresnan. 2010. Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. 5-12. En Karlson, B, C. Cusack y E. Bresnan (eds). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. IOC-UNESCO. Paris.
- Katano, T., M. Yoshida, J. Lee, M. Han & Y. Hayami. 2009. Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) using HEPES-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. *Phycologia*.48 (6): 473-479.
- Ki, J. S. & M. S. Han. 2006. A low – density oligonucleotide array study for parallel detection of harmful algal species using hybridization of consensus PCR products of LSU rDNA D2 domain. *Biosens. Bioelectron.* 21: 1812 – 1821.
- Kim, D., T. Okamoto, T. Oda, K. Tachibana, K. S. Lee, A. Ishimatsu, Y. Matsuyama, T. Honjo & T. Muramatsu. 2001. Possible involvement of the glycocalyx in the ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae): immunological approach using antiserum against cell surface structures of the flagellate. *Mar. Biol.* 139: 625-632.

- Klöpffer, S., U. John, A. Zingone, O. Mangoni, W. H. C. F. Kooistra & A. D. Cembella. 2013. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? *Eur. J. Phycol.* 48: 79 – 92.
- Lin, S. & E. J. Carpenter. 1996. An empirical protocol for whole-cell immunofluorescence of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 32: 1083 – 1094.
- Lindsay M. R., R. I. Webb, H. M. Hosmer & J. A. Fuerst. 1995. Effects of fixative and buffer on morphology and ultrastructure of a freshwater planctomycete, *Gemmata obscuriglobus*. *J. Microbiol. Meths.* 21: 45-54
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval & E. J. Núñez-Vázquez. 2011. Co-ocurrencia de *Chattonella marina* y *Gynodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiológica.* 21: 185-196
- Mackenzie, L., M. de Salas, J. Adamson & V. Beuzenberg. 2004. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae.*3: 71-92.
- Marshall, J. A., P. D. Nichols & G. M. Hallegraef. 2002. Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae. *J. App. Phycol.* 14: 255-256.
- Martínez-López, A., C. J. Band-Schmidt, D. Escobedo-Urías & A. E. Ulloa-Pérez. 2006. Bloom of *Chattonella subsalsa* in an impacted coastal lagoon in the Gulf of California. *Harmul Algae News.*31: 1-5.
- Melan, M. A. 1999. Overview of Cell Fixatives and Cell Membrane Permeants. 45 – 55. En L. C. Javois (Ed). *Methods in Molecular Biology, Vol. 115: Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press Inc. EUA.
- Metfies, K., K. Töbe, C. Scholin & L. K. Medlin. 2006. Laboratory and field applications of ribosomal RNA probes to aid the detection and monitoring of

- harmful algae. 311-325. En: Granéli E. & J. F. Turner (Eds.). *Ecology of harmful algae*. Springer. Holanda.
- Miller, P. E. & 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.
- Mikulski, C. M., Y. T. Park, K. L. Jones, C. K. Lee, W. A. Lim, Y. Lee, C. A. Scholin & G. J. Doucette. 2008. Development and field application of rRNA – targeted probes for the detection of *Cochlodinium polykrikoides* Margalef in Korean coastal waters using whole cell and sandwich hybridization formats. *Harmful Algae*.7: 347 – 359.
- Moss, G. I. 1996. Glutaraldehyde as a Fixative for Plant Tissues.
- Park, B. S., S. H. Baek, J. S. Ki, R. A. Cattolico & M. S. Han. 2012. Assessment of EvaGreen – based quantitative real – time PCR assay for enumeration of the microalga *Heterosigma* and *Chattonella* (Raphidophyceae). *J. Appl Phycol.* 24: 1555 – 1567.
- Perez-Morales, A, C. J. Band-Schmidt, J. L. Ortíz-Galindo & A. S. Sobrino-Figueroa. 2014. Mortality in the initial ontogeny of *Paralabrax maculatofasciatus* (Serranidae) (Actinopterygii, Perciformes) caused by *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). *Hydrobiologia.* 722: 247-261
- Raap A. K., J. G. J. Marijnen, J. Vrolijk & M. van der Ploeg. 1986. Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry.* 7: 235-242
- Rodríguez-Palacios, M. C., L. Crisóstomo-Vázquez, S. Álvarez-Hernández & C. Lozano-Ramírez. 2011. Strains of toxic and harmful microalgae, from waste water, marine, brackish and fresh water. *Food Addit. Contam.* 29: 304-313.

- Sako Y., S. Hosoi – Tanabe & A. Uchida. 2004. Fluorescence *in situ* hybridization using rRNA – targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*. *J. Phycol.* 40: 598 – 605.
- Schlötterer, C., M. Y. Hauser, A. von Haeseler & D. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molec Biol Evolut.* 11: 513 – 522.
- Scholin, C. A., M. Herzog, M. Sorgin & D. M. Anderson. 1994. Identification of Group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analyses of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.* 30: 999-1011.
- Scholin, C. A., K. R. Buck, T. Britschgi, G. Cangelosi & F. P. Chavez. 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA - targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia*.35: 190 – 197.
- Schultz, J. & M. Wolf. 2009. ITS2 sequence – structure analysis in phylogenetics: A how – to manual for molecular systematics. *Molec. Phylo. Evolut.* 52: 520 – 523.
- Tanaka, K., Y. Muto & M. Shimada. 1994. Generation of superoxide anion radicals by the marine phytoplankton organism *Chattonella antiqua*. *J. Plankton Res.* 16: 161-169.
- Tiffany M. A., S. B. Barlow, V. E. Matey & S. H. Hulbert. 2001. *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia*.466: 187-194.
- Töbe, K, D. Kulis, D. M. Anderson, M. Gladstone & L. K. Medlin. 2010. Detecting intact algal cells with whole cell hybridization assays. 55-66. En Karlson, B, C. Cusack y E. Bresnan (eds). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*.IOC-UNESCO. Paris.

- Twiner, M. J. & C. G. Trick. 2000. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *J. Plankton Res.* 22: 1961-1975.
- Tyrrell J. V., P. R. Bergquist, P. T. Bergquist & C. A. Scholin. 2001. Detection and enumeration of *Heterosigma akashiwo* and *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) using rRNA – targeted oligonucleotide probes. *Phycologia*. 40: 457 – 467.
- Verdugo-Díaz, G., A. Martínez-López & C. Hakspiel-Segura. 2013. Proliferación de fitoplancton en Bahía de La Paz, Enero de 2013. En XII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortes y VII Simposium Internacional sobre el Mar de Cortes. Ensenada, México.
- Walsh, D., R. A. Reeves, D. J. Saul, R. D. Gray, L. Mackenzie, P. R. Bergquist & P. L. Bergquist. 1998. Heterogeneity of SSU and LSU rDNA sequences of *Alexandrium* species. *Biochem. System. Ecol.* 26: 495-509.
- Yamaguchi, M. & I. Imai. 1994. A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia*. 33: 163 – 170.
- Yilmaz, L. S., S. Parkernar, & D. R. Noguera. 2011. mathFISH, a Web Tool That Uses Thermodynamics-Based Mathematical Models for In Silico Evaluation of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microb.* 77: 1118-1122.
- Zuker, M. 1989. The use of dynamic programming algorithms in RNA secondary structure prediction. *Mathematical Methods for DNA Sequences*. 159 – 184.