



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



**DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TÓXICOS ASOCIADOS A
MACROALGAS
EN LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S.**

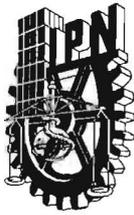
TESIS

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

PRESENTA

MÉLANY SEPÚLVEDA VILLARRAGA

LA PAZ, B.C.S., MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 08 del mes de Diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TÓXICOS
ASOCIADOS A MACROALGAS EN LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S."**

Presentada por el alumno:

| | | |
|------------------|-------------------|---------------|
| SEPÚLVEDA | VILLARRAGA | MÉLANY |
| Apellido paterno | materno | nombre(s) |
| Con registro: | | |
| A | 1 | 6 |
| 1 | 0 | 1 |
| 2 | | |

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis



DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT
Directora de Tesis



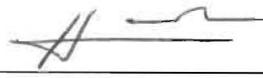
DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA
2º. Director de Tesis



DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA



DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ



M en C. ISMAEL GÁRATE LIZÁRRAGA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



**I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN**



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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes de Diciembre del año 2017

El (la) que suscribe BM. MÉLANY SEPÚLVEDA VILLARRAGA Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A161012 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 DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

ASOCIADOS A MACROALGAS EN LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S."

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: melany_sepulveda@hotmail.com - cjband@yahoo.com - ileyvalencia@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. MÉLANY SEPÚLVEDA VILLARRAGA

Nombre y firma del alumno

GLOSARIO

RELACIÓN DE FIGURAS

RELACIÓN DE TABLAS

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Planteamiento del problema..... | 5 |
| 1.2 Justificación..... | 6 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 8 |
| 3. OBJETIVOS..... | 8 |
| 3.1 Objetivo General | 8 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 8 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 9 |
| 4.1 Área de colecta..... | 9 |
| 4.2 Trabajo de Campo | 10 |
| 4.3 Trabajo de laboratorio | 11 |
| 4.3.1 Aislamiento | 11 |
| 4.3.2 Mantenimiento de cepas | 12 |
| 4.3.3 Escalamiento..... | 12 |
| 4.3.4 Curva de crecimiento | 12 |
| 4.3.5 Identificación morfológica..... | 13 |
| 4.3.6 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación..... | 13 |
| 4.3.6.1 Extracción del ADN genómico..... | 13 |
| 4.3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 14 |
| 4.3.6.3 Electroforesis | 15 |
| 4.3.6.4 Análisis y edición de secuencias | 15 |
| 4.4 Toxinas lipofílicas | 16 |

| | |
|---|----|
| 5. RESULTADOS | 17 |
| 5.1 Especies aisladas | 17 |
| 5.2 Caracterización taxonómica | 18 |
| 5.2.1 <i>Coolia malayensis</i> | 18 |
| 5.2.2 <i>Ostreopsis</i> cf. <i>lenticularis</i> | 20 |
| 5.2.3 <i>Amphidinium</i> cf. <i>carterae</i> | 22 |
| 5.2.4 <i>Prorocentrum</i> cf. <i>rhathymum</i> | 23 |
| 5.3 Análisis filogenético..... | 24 |
| 5.4 Curvas de crecimiento..... | 29 |
| 5.5 Toxinas lipofílicas | 31 |
| 6.1 Cultivos..... | 32 |
| 6.2 Especies estudiadas..... | 35 |
| 6.2.1 <i>Ostreopsis</i> | 35 |
| 6.2.2 <i>Coolia</i> | 40 |
| 6.2.3 <i>Amphidinium</i> | 41 |
| 6.2.4 <i>Prorocentrum</i> | 42 |
| 6.3 Curvas de crecimiento..... | 45 |
| 6.4 Análisis de toxinas | 46 |
| 7. CONCLUSIONES | 47 |
| 8. RECOMENDACIONES | 48 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

Fig. 1. Esquema de tabulación de placas tecales de dinoflagelados (tomado de Hoppenrath *et al.* 2014).

Figura 2. Zonas de colecta de macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S.

Figura 3. Célula vegetativa de *C. malayensis*, N) Núcleo. F) Flagelo, cloroplastos. Aumento 40x.

Figura 4. *Coolia malayensis*. Epiteca (Izquierda) Complejo del poro apical (compuesto por 1' y 6"). Hipoteca (derecha), Aumento 40x.

Figura 5 . Célula vegetativa de *O. cf. lenticularis*, 40x.

Figura 6. *Ostreopsis* cf. *lenticularis*. Hipoteca (Izquierda), Po, Poro apical, Epiteca (Derecha). Aumento 40x.

Figura 7. Célula vegetativa de *Amphidinium* cf. *carterae*. 40x.

Figura 8. Célula vegetativa de *Prorocentrum* cf. *rhathymum*. 20x

Figura 9. Árbol filogenético con 25 caracteres de alineación de secuencias de especies de dinoflagelados del género *Coolia* y *Ostreopsis* (DB1 y OLMS), usando el marcador 28S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Figura 10. Árbol filogenético con 9 caracteres de alineación de secuencias de *Ostreopsis* con el marcador 5.8S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Figura 11. Árbol filogenético con 10 caracteres de alineación de secuencias de *Ostreopsis* usando el marcador 18S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Figura 12. Árbol filogenético con 20 caracteres de alineación de secuencias de *Prorocentrum* usando el marcador 28S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Figura 13. Curva de crecimiento de *C. malayensis* en medio GSe diluido al 50% (línea azul) y medio f/2 (línea roja) a 24 °C. Valores promedio y desviación estándar.

Figura 14. Curva de crecimiento de *O. cf. lenticularis* en medio GSe diluido al 50% (línea azul) y medio f/2 (línea roja), a 24 °C. Valores promedio y desviación estándar.

Figura 15. Células vegetativas de A. *Ostreopsis lenticularis*, B. *Coolia malayensis*, C. *Prorocentrum* cf. *rhathymum*. Las imágenes de la izquierda corresponden a células vegetativas reportadas por Leaw *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2017) y las de la derecha son las cepas aisladas en este estudio.

Tabla 1. Programa de amplificación empleado para las muestras de ADN de dinoflagelados epífitos.

Tabla 2. Lista de cepas de dinoflagelados epifitos analizados mediante la técnica HPLC-MS/MS, para detectar tipos de toxinas

Tabla 3. Dinoflagelados aislados de macroalgas de la Bahía de La Paz. Clave, número de cepas, zona de colecta, especie de macroalga y fecha de aislamiento.

Tabla 4. Características morfológicas destacadas que diferencian a *P. mexicanum* y *P. rathymum*. Tomado de Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003).

DEDICATORIA

A mis padres María Eujenia Villarraga y Roberto Sepúlveda quienes son mis pilares, mi fortaleza y mi vida, y a mis hermanas Catheryne y Natalia, por siempre brindarme su amor y energía para seguir andando. Gracias por hacerme caer en cuenta que todo lo que nos pasa en la vida es para aprender y ser mejores. Y si nacimos para ser felices. Los amo.

GLOSARIO

ADN ribosomal: Secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo, estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación.

Antapical: Región de la hipoteca que contiene las tecas que adyacentes al área sulcal.

Apical: Región de la epiteca que contiene las tecas que adyacentes al poro apical.

Bentónico: Que forma parte del fondo marino.

Cebador: Secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa.

Ciguatera: Enfermedad que contrae los peces y crustáceos por bioacumulación de toxinas paralizantes de fitoplancton y que producen perniciosos efectos a las personas que los consumen.

Curva de crecimiento: Grafico que indica el número total de organismos de una población e informa acerca de la tasa de crecimiento poblacional y la capacidad de reproducirse en distintas condiciones ambientales.

Dinocarión: Núcleo característico de célula típica eucariota

Dinoflagelado: Son un extenso grupo de protista flagelados; el nombre proviene del griego “dinos” girar y del latin “flagellum” látigo; describiendo el movimiento rotatorio propio de estos organismos.

Epiteca: Estructura celular superior del dinoflagelado.

Florecimientos algal nocivo: Incremento masivo en el número de células fitoplanctónicas que puede consumir el oxígeno o los nutrientes del agua y causando intoxicaciones a través de la producción de sustancias químicas (toxinas) afectando la fisiología de los organismos afectados.

Hipoteca: Estructura celular inferior de un dinoflagelado

Macroalga: son una agrupación de células características por presentar pigmentos para realizar procesos fotosintéticos, de esta forma pueden ser pardas, rojas, verdes, y con formas filamentosas, filiformes, ciliadas.

Marcador molecular: Es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida.

Pares de bases (pb): Unión de dos nucleótidos opuestos y complementarios en la cadena de ADN que están conectados por puentes de hidrógeno, por ejemplo Adenina y Timina, así como Guanina y Citosina.

Placa tecal: Es la cobertura del anfragma que exhibe diversas formas en la morfología externa dependiendo de la especie y a veces de la etapa del dinoflagelado.

Poro apical: Hendidura localizada en una placa apical nombrada como 2', la cual colinda con la placa 1', y están ubicadas dentro de la epitoca.

Secuencia: Técnica de laboratorio para determinar la secuencia del ADN del genoma de un organismo.

Sulcus: Región ventral de la hipoteca que aloja el flagelo longitudinal.

Tabulación tecal: Estudio de las placas; Kofoid (1909) desarrolló un sistema de nomenclatura de las placas en base a que éstas se disponen en series ecuatoriales. Dentro de cada serie, las placas se numeran, a partir de la parte ventral, hacia la izquierda, o lo que es lo mismo, en visión apical, en sentido contrario a las agujas del reloj. A aquellas placas que están en contacto con la placa del poro apical, les llama apicales y se nombran numeradas con una comilla. Las de la serie previa al cíngulo, son las precingulares y se nombran con números con dos comillas. Aquellas que pueda haber entre las dos series, son intercalares anteriores y se denominan con un número seguido de la letra «a».

Tasa de crecimiento: Tasa a la que una población aumenta o disminuye durante determinado tiempo.

Toxigénicos: Microorganismos productores de toxinas que dan lugar a intoxicaciones.

Tóxico: Sustancia venenosa que puede causar trastornos o la muerte.

Toxinas lipofílicas: Sustancia toxica diarreica.

Resumen

Se aislaron e identificaron especies de dinoflagelados asociados a macroalgas de la Bahía de La Paz. Para ello, se tomaron muestras mensuales de *Sargassum horridum* y *Dictyota cervicornis* en San Juan de la Costa e Isla Gaviota. Se establecieron cultivos monoalgales de cuatro especies de dinoflagelados, las cepas se mantuvieron en medio GSe diluido al 50%, a 24 ± 1 °C, a una salinidad de 34, en un ciclo luz: oscuridad 12h: 12h y a una intensidad luminosa de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Mediante características morfológicas se identificaron como *Ostreopsis* cf. *lenticularis*, *Coolia malayensis*, *Amphidinium* cf. *carterae* y *Prorocentrum* cf. *rhathymum*. Utilizando marcadores moleculares de la subunidad mayor de la región 28S del ADNr, se corroboró la identidad de *C. malayensis*. Con este marcador la cepa de *Ostreopsis* mostró una estrecha relación filogenética con *O. lenticularis*, las secuencias de los marcadores 5.8S y 18S, no coinciden con la identificación molecular de las secuencias del 28S. Sin embargo los caracteres morfológicos concuerdan con la descripción de *O. lenticularis*. Con el marcador 28S la cepa de *Prorocentrum* tuvo una estrecha afinidad filogenética con el complejo *P. rhathymum*/*P. mexicanum*, no obstante sus caracteres morfológicos corresponden a *P. rhathymum*. Con la cepa de *Amphidinium* cf. *carterae* se logró extraer ADN genómico, sin embargo con los cebadores utilizados para su identificación molecular no se logró la amplificación de secuencias parciales que permitieran confirmar su identidad taxonómica. *Ostreopsis* cf. *lenticularis* y *Coolia malayensis* no presentaron diferencias significativas en la biomasa máxima y las tasas de crecimiento al cultivarlas en medio GSe diluido y f/2. No se detectaron toxinas lipofílicas en *Amphidinium* cf. *carterae*, *Ostreopsis* cf. *lenticularis*, ni en *Prorocentrum* cf. *rhathymum*. Este trabajo contribuye a las primeras secuencias del ADN ribosomal de *Ostreopsis* cf. *lenticularis*, *C. malayensis* y *Prorocentrum* cf. *rhathymum* de la Bahía de La Paz.

Abstract

Different species of dinoflagellates produce toxins and can affect diverse marine organisms and public health. In Bahía de La Paz, benthic species have been associated with the production of lipophilic toxins, such as *Prorocentrum lima* (dinofisistoxins, ocadaic acid), *Ostreopsis siamensis* (palitoxins), and *Gambierdiscus toxicus* (ciguatoxins). In this study, dinoflagellates associated with macroalgae from the Bahía de La Paz were isolated and taxonomically identified. Samples of *Sargassum horridum* and *Dictyota cervicornis* macroalgae were collected monthly in San Juan de la Costa and Isla Gaviota.. The cultures of four species of dinoflagellates were established, the strains were maintained in diluted GSe medium (50%), at 24 ± 1 ° C, salinity of 34, in a light cycle:darkness 12:12, and a irradiance of $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Based on the morphological characteristics the strains were identified as *Ostreopsis cf. lenticularis*, *Coolia malayensis*, *Amphidinium cf. carterae*, and *Prorocentrum cf. rathymum*. Using sequences of the long subunit of the 28S region of the ribosomal DNA we could confirm the identification of *C. malayensis*; and the strain of *Ostreopsis* presented a high phylogenetic relationship with *O. lenticularis*, coinciding with the morphological characteristics of the cells. Sequences of the 5.8S and 18S region of *Ostreopsis* did not coincide with the molecular identification of the 28S region, nevertheless the morphological characteristics coincide with *O. lenticularis*. The sequences of the region 28S of the strain of *Prorocentrum* had a close affinity with *P. rathymum/mexicanum*, however the morphological characteristics correspond to *P. rathymum*. With the strain identified morphologically as *Amphidinium cf. carterae* we could extract genomic ADN, but with the primers we used we could not amplify the partial sequences to confirm the taxonomic identity. *Ostreopsis cf. lenticularis* and *C. malayensis* did not present significant differences in maximum cell abundance and growth rates when cultivated in diluted GSe and f/2 media. No lipophilic toxins were detected in *Amphidinium cf. carterae*, *Ostreopsis cf. lenticularis* and *Prorocentrum cf. rathymum*. This study contributes with the first ADN ribosomal sequences of *Ostreopsis cf. lenticularis*, *C. malayensis* and *Prorocentrum cf. rathymum* from Bahía de La Paz.

1. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados marinos han sido un grupo ampliamente estudiado por ser conspicuos productores primarios o debido a que algunas especies planctónicas o bentónicas se caracterizan por ser toxigénicas. De esta forma ha incrementado el interés por estudiar este grupo en su función ecológica, taxonomía, efectos tóxicos, cambios evolutivos y biogeografía.

Los dinoflagelados bentónicos son uno de los grupos taxonómicos más abundantes y diversos del bentos, Las células presentan estructuras únicas como su núcleo o dinocarión, que se caracteriza por tener un genoma que carece de las histonas típicas de eucariotas. Además no pierden la membrana durante la división mitótica y los filamentos de cromatina permanecen condensados (Gómez *et al.*, 2011). Los dinoflagelados son autótrofos, mixotrófos o heterótrofos habitando aguas continentales y/o oceánicas (Gómez *et al.*, 2011; Almazán-Becerril *et al.*, 2012). Dentro del hábitat bentónico existen especies epífitas de macroalgas, pastos marinos, sedimentos y corales. Algunas de las especies que se asocian a este tipo de sustratos producen toxinas lipofílicas, tales como el ácido okadaico (AO), las pectenotoxinas (DTX), las brevetoxinas (PbTX), las ciguatoxinas (CTX), las yesotoxinas (YTX), los azáspirácidos (AZA), los espirolípidos (SPX), las gymnodiminas (GYM) y las pinnatoxinas (PNT). Debido a su naturaleza liposoluble las biotoxinas se bioacumulan en los tejidos grasos de los organismos (Lehane y Lewis, 2000; Reguera *et al.*, 2011). De esta forma al ser consumidas por peces y moluscos pueden producir intoxicaciones y efectos negativos en la salud humana y otros organismos marinos (Valerio y Díaz, 2007). Estas toxinas son responsables de diversos síndromes como DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*) y CFP (*Ciguatera Fish Poisoning*). En varios artículos se ha documentado que personas que han consumido peces o moluscos con estas toxinas pueden sufrir trastornos gastrointestinales, neurológicos, cardiovasculares y, en casos extremos, fallos respiratorios y muerte (Yasumoto *et al.*, 1985; Murata

et al., 1987; Lehane y Lewis, 2000; Heredia-Tapia *et al.*, 2002; Baden *et al.*, 2005; Reguera *et al.*, 2011).

Los dinoflagelados bentónicos tienen una alta abundancia en la zona intermareal, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Se ha indicado que diferentes variables como la temperatura, la salinidad, la intensidad lumínica, la turbulencia y la concentración de nutrientes, influyen sobre el crecimiento de estos, además se ha establecido que al asociarse los dinoflagelados a macroalgas, estas les proveen refugio ante depredadores (Mahfuzur *et al.*, 2013).

Las macroalgas son unos de los sustratos más frecuentemente utilizados por los dinoflagelados bentónicos. Las macroalgas rojas (Rhodophyceae) de los géneros *Jania* y *Amphiroa*; pardas (Phaeophyceae) del género *Turbinaria* y las macroalgas verdes (Chlorophyceae) calcáreas articuladas del género *Halimeda* son sustratos adecuados para los dinoflagelados epifitos (Reguera *et al.*, 2011). Éstas son comunes en zonas arrecifales. Otro tipo de macroalgas particularmente abundantes en zonas arrecifales son las rodofíceas del género *Dichotomaria* y las feofíceas de los géneros *Sargassum* y *Dictyota* (Reguera *et al.*, 2011).

Adachy y Fukuyo (1970) iniciaron el estudio sobre dinoflagelados bentónicos registrando a *Gambierdiscus toxicus*, una especie epifita productora de ciguatoxinas (Yasumoto *et al.*, 1977), a partir de entonces se despertó la curiosidad de otros autores que profundizaron en estudios ecológicos, taxonómicos y toxicológicos de otras especies de dinoflagelados bentónicos toxigénicos (Yasumoto *et al.*, 1980; Fukuyo, 1981; Hallegraeff, 1991; Faust y Gullledge, 2002; Parsons *et al.*, 2002).

Se han destacado los estudios sobre la caracterización e identificación de distintas especies de dinoflagelados bentónicos, enfatizando en sus caracteres morfológicos que han permitido destacar que existe un problema en cuanto a la ambigüedad taxonómica lo que ha llevado a los investigadores a usar técnicas moleculares para corroborar la identificación de especies, a reasignar muchos taxa, reconocer especies crípticas o pseudo crípticas y descubrir y describir nuevas especies (Gómez *et al.*, 2011; Hoppenrath *et al.*, 2014).

Para realizar la identificación de las especies con base a los caracteres morfológicos, se han establecido sistemas como el planteado por Kofoid en 1909, el cual fue modificado por Balech en 1951, en el que a partir de una nomenclatura predeterminada se hace una tabulación de las placas estableciendo un patrón basado en la disposición, forma, tamaño y ornamentaciones de las tecas (Fig. 1).

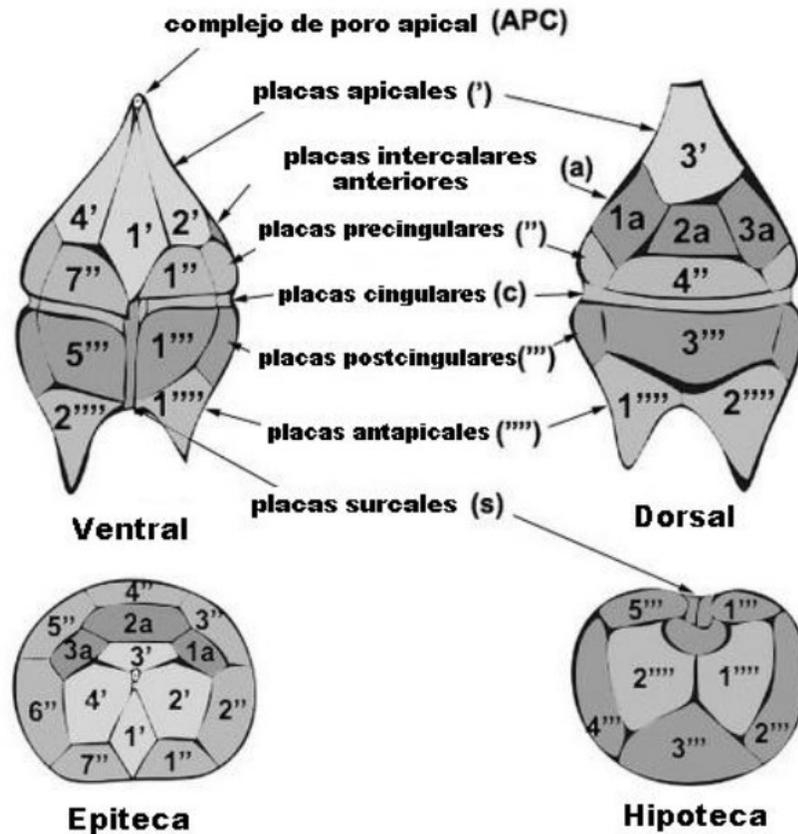


Fig. 1. Esquema de tabulación de placas tecaes de dinoflagelados (tomado de Hoppenrath *et al.* 2014).

Algunos géneros de dinoflagelados bentónicos nocivos o tóxicos asociados a macroalgas son: *Ostreopsis*, *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* (Mohammad-Noor *et al.*, 2007). En la Bahía de La Paz, se han descrito distintas especies pertenecientes al grupo de los dinoflagelados bentónicos, tales como *Prorocentrum concavum*, *P. lima*, *Ostreopsis siamensis*, *O. ovata*, *Gambierdiscus toxicus* y *Amphidinium carterae* (Heredia-Tapia *et al.*, 2002; Okolodkov y Gárate-

Lizárraga, 2006; Gárate-Lizárraga, 2012). De igual forma dentro del género *Prorocentrum* se han registrado un total de 21 especies en el Pacífico mexicano (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006) y 16 especies en la Bahía de La Paz (Nienhuis, 1979; Gárate-Lizárraga y Martínez-López, 1997; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2009, 2012).

En la Bahía de La Paz BCS, la primera intoxicación documentada fue en la isla El Pardito en la cual la comunidad se vio afectada por ingerir pescado contaminado perteneciente a la familia Lutjanidae, los síntomas que presentaron fueron: diarrea, náusea, temblores, entre otros. Esto condujo a llevar a cabo un estudio en la zona en donde se había registrado un Florecimiento Algal Nocivo (FAN) de *Prorocentrum lima* del que se tomaron muestras para establecer cultivos del dinoflagelado, demostrando que es una especie productora de ácido ocadaico y dinofisistoxinas (Heredia-Tapia *et al.*, 2002).

En el monitoreo encabezado por el Dr. Leyva en la Bahía de La Paz, se detectaron toxinas lipofílicas como azaspirácidos, ácido ocadaico, gymnodiminas, pinnatoxinas, pectenotoxinas y yesotoxinas en bajas concentraciones, pero que estuvieron presentes durante todo el año, en extractos de especies de moluscos de importancia comercial: *Dosinia ponderosa* (almeja blanca), *Atrina maura* (callo de hacha) y *Megapitaria squalida* (almeja chocolata). Además, en la Tesis de maestría de Hernández-Castro (2017) se mencionan distintas especies de dinoflagelados bentónicos colectados en la columna de agua que han sido asociados con la producción de este tipo de toxinas.

Con el propósito de profundizar en el estudio del grupo de los dinoflagelados epifitos en la zona, el objetivo de este estudio fue identificar a dinoflagelados epifitos potencialmente tóxicos asociados a macroalgas de la Bahía de la Bahía de La Paz, B.C.S., mediante técnicas morfológicas y moleculares, así como, confirmar que tipo de toxinas, empleando métodos cromatográficos de alta resolución.

1.1 Planteamiento del problema

Se han realizado diversos estudios en México donde se ha demostrado el efecto tóxico que tienen algunos dinoflagelados en diversos ecosistemas marinos, así como los efectos que producen sobre distintos organismos (Band-Schmidt *et al.*, 2011; Gárate-Lizárraga, 2012). Sin embargo aún son limitados los estudios con dinoflagelados bentónicos asociados a macroalgas.

El primer trabajo realizado en México con un dinoflagelado bentónico es el de Heredia-Tapia *et al.* (2002). Estos autores aislaron a *Prorocentrum lima* de la isla el Pardito en Baja California Sur confirmando que es una especie productora de ácido ocaidaico y dinofisitoxina, asociando a esta especie a la intoxicación de personas de la isla por el consumo de peces contaminados.

Una revisión bibliográfica realizada de 1940 a 2011 Band-Schmidt *et al.* (2011), además de *P. lima* mencionan a otras especies de dinoflagelados bentónicos tóxicos presentes en los litorales de Baja California Sur, tales como: *Ostreopsis* spp., especie asociada a la producción de palitoxinas; *Amphidinium* spp. asociado a la actividad hemolítica en peces; así como a *G. toxicus* productor de ciguatoxinas (Núñez-Vázquez *et al.*, 2003).

Posteriormente, en el 2012 Gárate-Lizárraga, en la región sur de la bahía (24.23°N; 110.34°W) reporta un florecimiento de *Amphidinium carterae* en diciembre de 2011. La presencia de este dinoflagelado y otras especies de diatomeas se atribuyó a surgencias influenciadas por vientos del noreste. La temperatura durante el florecimiento de esta especie fue de 20°C. En la misma bahía, Muciño-Márquez *et al.* (2015), determinaron la distribución y abundancia de especies del género *Prorocentrum* durante un ciclo anual, registrando a 12 especies: *P. compressum*, *P. dactylus*, *P. emarginatum*, *P. gracile*, *P. lima*, *P. koreanum*, *P. minimum*, *P. rhathymum*, *P. rostratum*, *P. shikokuense*, *P. triestinum* y *P. vaginula*, de las cuales, ocho de ellas se han catalogado como formadoras de FAN. Recientemente, se han reportado tres especies del mismo género: *P. mexicanum*, *P. robustum* y *P. sigmoides* (Gárate-Lizárraga, 2014).

Los florecimientos de las especies bentónicas del género *Prorocentrum* y *Gambierdiscus*, han causado impacto en los ecosistemas y en el sector acuícola. En Sinaloa se han reportado efectos por proliferaciones de *P. minimum* en camarones en cultivo (Cortés- Altamirano y Agraz, 1994; Cortés- Altamirano *et al.* 1997, 1999). En Cabo Pulmo, B.C.S. se asoció la mortandad de distintas especies de peces (*Holacanthus passer*, *Canthigaster punctatissima*, *Diodon holanthus*, *Abudefduf troschelii*, *Microspathodon dorsalis*, *Thalassoma lucasanum*, *Scarus sp.*, *Halichoeres sp.*, *Prionurus sp.* y *Balistes sp.*) en 1998 con un florecimiento de *Prorocentrum sp.* (PROFEPA y SEMARNAT, 1998).

1.2 Justificación

La problemática evidenciada por la intoxicación al consumir productos marinos afectados por microalgas tóxicas ha generado una gran inquietud dentro de la comunidad científica por sus implicaciones ambientales, sociales y económicas. Por estas razones, surgió la necesidad de realizar estudios para identificar especies de dinoflagelados bentónicos que puedan dar origen a estas intoxicaciones, además se ha podido establecer que existe una ambigüedad taxonómica lo cual crea confusiones al identificar a las especies de estos géneros, ya que presentan un patrón tabular de las tecas muy similar, lo cual ha llevado usar técnicas moleculares para confirmar la identificación de las especies.

Este estudio está enfocado a identificar taxonómicamente a las especies de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos asociados a macroalgas. Los dinoflagelados bentónicos pueden ser consumidos por fauna epibionte y peces, bivalvos o crustáceos que los consumen al alimentarse de las macroalgas. Cuando los dinoflagelados bentónicos tóxicos se encuentran en altas abundancias pueden causar efectos letales o subletales en mamíferos marinos, peces, aves y en el hombre. Se ha identificado que las toxinas producidas por los dinoflagelados bentónicos son de naturaleza liposoluble lo que permite que se acumulen en los tejidos grasos de distintos organismos, pasando a través de la trama trófica y llegando a afectar a mamíferos marinos y al humano al consumir dichos organismos.

En la Bahía de La Paz se ha demostrado la presencia de toxinas diarreicas, tales como el ácido ocadaico, azaspirácidos, gymnodiniminas, yesotoxinas, palitoxinas, dinofisistoxinas y pinnatoxinas (Heredia-Tapia *et al.*, 2002; Leyva, 2016; Hernández-Castro, 2017). Sin embargo, aún se desconoce la toxicidad de muchas especies bentónicas reportadas en la región y no se han realizado estudios taxonómicos detallados sobre los dinoflagelados asociados a macroalgas. Las especies de dinoflagelados bentónicos estudiados en la zona han sido registradas a partir de muestras tomadas en la columna de agua, por esta razón es necesario enfatizar en el estudio de este grupo de dinoflagelados, obtenidas directamente de las macroalgas, así como en el establecer sus cultivos los cuales van a proporcionar elementos para poder hacer pruebas de toxicidad, moleculares y estudios de ecofisiología que brindarán información detallada sobre las diversas especies.

Debido a la plasticidad fenotípica de los dinoflagelados bentónicos al mantenerlas en condiciones de cultivo, suele dificultarse su identificación a nivel de especie solo con base a sus caracteres morfológicos, en este estudio se realizó la identificación molecular de las especies aisladas utilizando marcadores de ADN ribosomal, para corroborar su identidad taxonómica.

Debido a la falta de información de dinoflagelados bentónicos-epifitos es necesario incrementar el número de estudios en nuestra región, ya que se ha demostrado que existe una gran variedad de toxinas lipofílicas en moluscos de importancia comercial en la Bahía de La Paz y aún se desconoce cuáles son las especies responsables de producir estas toxinas. Por eso es necesario obtener muestras de macroalgas en sitios cercanos a los bancos de moluscos de importancia comercial e informar a distintas cooperativas de la zona quienes trabajan en el repoblamiento de moluscos que se comercializan dentro y fuera de la zona de la Bahía de La Paz, para comunicarles la posible problemática ocasionada por este grupo de dinoflagelados.

2. HIPÓTESIS

Dado que en la columna de agua de la Bahía de La Paz se han reportado diversas especies epifitas potencialmente tóxicas, se espera que especies de dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum*, *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia* y *Amphidinium* proliferen sobre macroalgas recolectadas en la bahía, particularmente de los grupos Phaeophyta y Rhodophyta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Identificar dinoflagelados epifitos potencialmente tóxicos asociados a macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Establecer cultivos monoalgales de dinoflagelados epifitos asociados a macroalgas.
- 2.- Describir morfológicamente a los dinoflagelados epifitos aislados.
- 3.- Identificar mediante técnicas moleculares a las cepas aisladas con la obtención de secuencias de las regiones 28S, 18S y 5.8S pertenecientes a la subunidad larga del ADN ribosomal.
- 4.- Determinar las curvas de crecimiento y parámetros poblacionales de las cepas aisladas en dos medios de cultivo.

5.- Determinar la presencia de toxinas lipofílicas en las cepas aisladas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de colecta

La Bahía de La Paz está localizada aproximadamente a 180 km de la boca del Golfo de California, entre los 24°6' y 24°48' N y los 110°12' a 110°48' W, en la costa sur oriental de la Península de Baja California. De enero del 2016 a enero de 2017 se realizó un muestreo mensual en dos sitios de la Bahía: Boca Sausozo e Isla Gaviota en el que se colectaron diferentes especies de macroalgas pertenecientes al grupo Phaeophyceae y Rodophyceae, con el fin de aislar dinoflagelados epifitos asociados a estas (Fig. 2).

Los sitios de muestreo fueron seleccionados, dado a que presentan una alta cobertura algal, además a una corta distancia de estos se encuentran bancos de moluscos de interés comercial en la zona, y cerca a Isla Gaviota existe una granja de engorda de atún.

Boca Sausozo se encuentra en San Juan de la Costa, es una zona rocosa con mucha grava, que presenta un bosque de *Sargassum* los cuales se hacen frondosos en la época de primavera. El bosque se extiende desde pocos metros de la línea de costa. En esta zona se encuentran diferentes especies de macroalgas dentro de las cuales prevalecen las del grupo de las Phaeophyceas, además cerca de esta zona se practica la pesca ribereña.

La Isla Gaviota que es un sitio que también presenta una zona rocosa, tiene fondo arenoso y una amplia cobertura coralina que empieza a pocos metros de la formación rocosa. La cobertura algal es menor que en el Sausozo, pero cerca de esta zona se encuentran bancos de bivalvos que son de interés comercial.

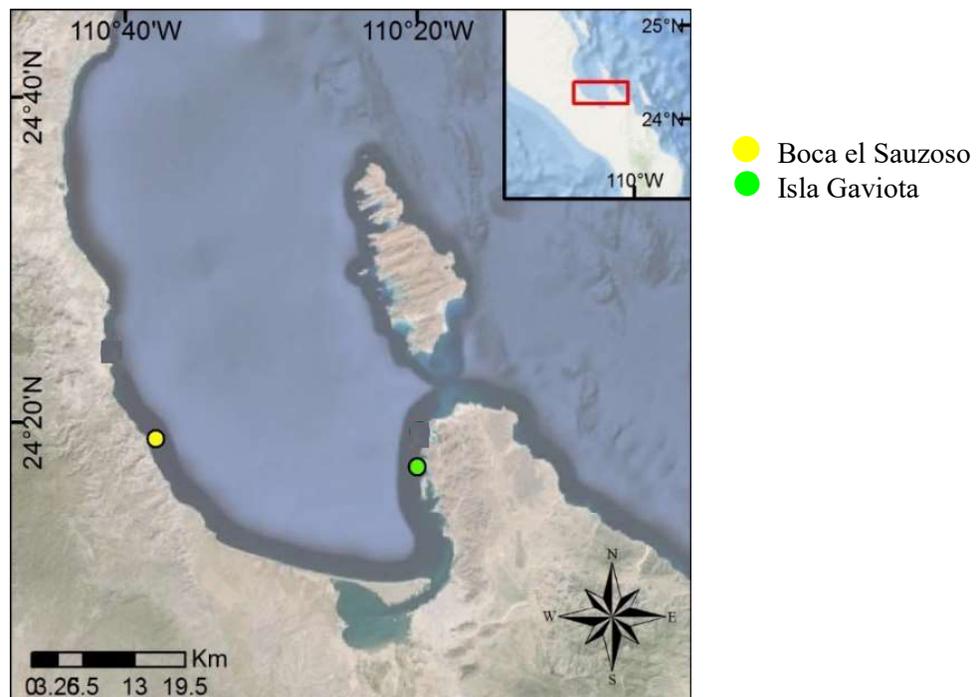


Figura 2. Zonas de colecta de macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S.

4.2 Trabajo de Campo

Se colectaron macroalgas en los puntos de muestreo mencionados. El muestreo se llevó a cabo de una forma paralela a la línea de costa, a nivel superficial en la zona intermareal, a profundidades entre 1 y 3 m. Las muestras de macroalgas fueron colectadas mediante buceo autónomo.

Se colectaron de 50 a 100 g de distintas especies de macroalgas del grupo de las Rodophyceas y Phaeophyceas, tales como: *Sargassum horridum*, *Dyctiota cervicornis*, *Hypnea* sp. *Laurencia papilosa* y *Padina turvillei*. Se colocó alrededor de la macroalga una bolsa plástica para evitar la pérdida de material adherido a ella en el momento en el que se desprendía del sustrato. Seguido a esto, se colocaron las bolsas con las macroalgas en una nevera de unicel la cual tenía dentro geles

congelados para preservar las muestras mientras se transportaron al laboratorio (Reguera *et al.*, 2011).

4.3 Trabajo de laboratorio

En el laboratorio cada una de las bolsas con las muestras de macroalgas fueron agitadas vigorosamente durante 2 min para desprender a los dinoflagelados epífitos. Posteriormente se retiró la macroalga, y se filtró el agua de mar contenida en la bolsa, a través de tres tamices de 110 μm , 50 μm y 25 μm . Por último se recogió lo que quedo en el tamiz de 25 μm (Reguera *et al.*, 2011). La suspensión que quedo después de procesar las muestras fue puesta en tarros de plástico previamente marcados con la información el lugar de muestreo y la fecha de colecta, se les agrego 20 mL de medio de cultivo y se colocaron los tarros a 24 °C a una intensidad luminosa de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y ciclo luz:oscuridad 12h:12h .

4.3.1 Aislamiento

Para el aislamiento de las células de dinoflagelados se tomaron alícuotas de 1 mL las cuales fueron puestas en portaobjetos. Las células vegetativas se aislaron mediante la técnica de micropipeta utilizando un microscopio invertido Carl Zeiss, estas fueron pasadas por un portaobjetos que tenía tres gotas de medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001) diluido al 50%. Las células se pasaron de gota en gota para eliminar otras células asociadas a ella, y tener la certeza de que se establecía un cultivo monoclonal y disminuir la carga bacteriana. Posteriormente cada una de las células fue transferida una placa de 96 pozos, los cuales se habían llenado previamente con 150 μl de medio GSe diluido. Se mantuvieron las cepas a 24 \pm 1°C, salinidad de 34, con un ciclo de luz: oscuridad (12h: 12h) a una intensidad luminosa de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Una vez que se obtuvo una densidad celular adecuada, las cepas se transfirieron a placas de 24 pozos y luego a una placa de 6 pozos. Finalmente las cepas se pasaron a tubos de cultivo de 50 mL con 20 mL de medio GSe diluido.

4.3.2 Mantenimiento de cepas

Los cultivos se mantuvieron por duplicado en medio GSe diluido, a 34 ups, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con iluminación continua de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en tubos de vidrio de 50 mL de capacidad con 20 mL de cultivo. Los cultivos se resembraron cada 15 días

4.3.3 Escalamiento

Para realizar las curvas de crecimiento se escalaron cada una de las cepas en matraces de 300 mL con 125 mL de medio GSe diluido y f/2 por triplicado en las condiciones previamente mencionadas. Las cepas se aclimataron a los diferentes medios de cultivo durante un mes.

4.3.4 Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento solo se realizaron con *Ostreopsis cf. lenticularis* y *Coolia malayensis* debido a que las cepas de *Prorocentrum cf. rhathymun* y *Amphidinium cf. carterae* presentaron muy baja biomasa (500 cel/mL). Las curvas se realizaron por triplicado, se iniciaron con 1700 cel/mL y cada tres días se tomaron 2 mL y se fijaron con lugol. Los conteos se hicieron en una cámara Sedgewick-Rafter bajo un microscopio invertido Zeiss y se realizaron hasta que las cepas alcanzaron la fase de declinación.

Para cada cepa se determinó la tasa de crecimiento exponencial (μ) y el tiempo de duplicación o generación (t_g) (Guillard, 1973). La fórmula que se utilizó fue la siguiente:

$$\mu_e = \ln (X_2 / X_1) / (t_2 - t_1)$$

En donde X representa la concentración de la biomasa (cel / mL) y t, es el tiempo en días. El tiempo de duplicación y/o de generación (t_g), es el tiempo necesario para que se duplique la población (Guillard, 1973). Se calcula como:

$$t_g = \ln 2 / \mu_e = 0.693 / \mu_e$$

4.3.5 Identificación morfológica

La identificación de las especies se realizó por medio de la caracterización de las tecas, usando el método de la tabulación introducido por Kofoid (1909, 1911), el cual fue modificado por Balech (1980) bajo un microscopio invertido Olympus CK2 (Olympus Optical Co. LTD., Tokio, Japón). Se midió el ancho y largo de las células ($n=3$). Al igual que la longitud de las tecas diagnósticas como la 1' y 2' las cuales están en contacto con el complejo del poro apical.

De los diferentes cultivos establecidos se tomaron muestras de 2 mL, a las que se les agregó 1 μ L de Fluorocromo Calcofluor-white para teñir las estructuras compuestas por celulosa en este caso las tecas, seguido a esto las células fueron observada bajo el microscopio invertido Carl Zeiss Modelo Axiovert 40 CFL equipado con luz ultravioleta. Las imágenes se tomaron con una cámara imager AxioCam ICc 1 y con el software Axiovision (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania), bajo un aumento de 40 x (Lawrence *et al.*, 1985).

4.3.6 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

4.3.6.1 Extracción del ADN genómico

Para la extracción de ADN de las cepas aisladas las células se cosecharon por centrifugación en una centrífuga LW Scientific E8 a 3,500 rpm por 15 min, en tubos de polipropileno de 15 mL. El pellet de células se mantuvo a -18°C hasta la realizar la extracción de ADN.

A cada pellet se le agregaron 200 μ L de CTAB buffer, se calentaron los tubos a 60°C , y se agitaron en un vortex cada 10 min durante una hora. Seguido a esto se adicionaron 800 μ L de CTAB buffer y se incubaron nuevamente a 60°C por 1 hora. Al finalizar la hora se agregaron 800 μ L de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Ausubel *et al.*, 2002). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se pasó a tubos nuevos

a los cuales se les agregaron 400 µl de isopropanol frío y 40 µl de acetato de amonio. Nuevamente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 20 min. Finalmente se tomó el sobrenadante y se le agregaron 500 µL de etanol frío al 70%, y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. Al pellet resultante se le extrajo el sobrenadante y se le agregaron 50 µL de TE y 0.5 µL de ARNasa (Sambrook *et al.*, 1989).

Al finalizar el procedimiento de extracción de ADN, los tubos se incubaron a temperatura ambiente. Con el fin de verificar la presencia e integridad del ADN y la eliminación del ARN, se corrió en un gel de agarosa al 1.5%, en una electroforesis con buffer TBE 1X, para verificar la adecuada extracción del ADN, los viales que contenían el ADN concentrado se almacenaron en el congelador a una temperatura de -18°C (Doyle y Doyle, 1990; Baker *et al.*, 2008).

4.3.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó la subunidad larga del 28S con el primer F: ACCCGCTGAATTTAAGCATA y el primer R TGGTCCGTGTTTCAAGAGACT (Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006). De igual forma se usó el marcador 18S F: ACCTGGTTGATCCTGCCAGT Y R: TGATCCTTCTGCAGGTTTAC y 5.8 con el primer F: TATCCTTAAATTCACCGGGT y R: GTGAACCTGCAGAAGGTCA. a partir de esto las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL con una concentración final de 1X de Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.12 mM de dNTP, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.02 U de Invitroplatinum Taq DNA polimerasa, 5 ng de ADN y de DMSO al 0.5% (Doyle y Doyle, 1990; Baker *et al.*, 2008), en un termociclador (TECHNE) Prime, con las condiciones de amplificación indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Programa de amplificación empleado para las muestras de ADN de dinoflagelados epífitos.

| Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|------------------|--------|------------------|
| 94 | 4 min | 1 |
| 94 | 30 seg | 35 |
| 50 | 1'30'' | 35 |
| 72 | 1'30'' | 35 |
| 72 | 10 min | 1 |
| 10 | 5 min | 1 |

4.3.6.3 Electroforesis

Se corroboró la amplificación de los productos obtenidos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, el cual se preparó con 75 mL de buffer TBE 1X y 1.1 g de agarosa. De cada uno de los productos se tomó 3 μ L y se mezcló con 1 μ L de buffer de carga de azul de bromofenol y GelRed. Se llevó a cabo la electroforesis en una fuente de poder (BIORAD Molecular Imager, Gel DOC™ XRT, Modelo Universal Hooll) a 70 voltios y 400 mA por 40 min. Posteriormente el gel se observó y se digitalizó la imagen bajo un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad. Los productos positivos se enviaron para su secuenciación a la compañía de Macrogen en Corea.

4.3.6.4 Análisis y edición de secuencias

Las secuencias de la región 28S del LSU del ADNr fueron editadas con el programa de Edición SECUENCHER 4.1.4, alineadas con el programa Clustal X (Gouy *et al.*, 2010), y se compararon con secuencias de otras regiones geográficas obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se seleccionaron secuencias de la misma región de ADN que presentaban un porcentaje de similitud entre el 90 y el

100% para construir los árboles filogenéticos (Tabla 2). Posteriormente los árboles se realizaron con inferencia Bayesiana para las secuencias obtenidas de *Ostreopsis* y *Coolia* con el marcador 28S, el modelo de sustitución nucleotídica seleccionado con el programa Modeltest 3.7. fue el GTR+G. Para *Ostreopsis* con los marcadores moleculares 18S y 5.8S el modelo seleccionado para 18S fue el HKY+I+G, mientras que para 5.8S el modelo fue el HKY+G. Para las secuencias de la cepa de *Prorocentrum* con el marcador 28S el modelo seleccionado fue el TrN+G. Los arboles filogenético fueron reconstruidos con el programa Mr Bayes 3.1.2. con 600 pares de bases.

4.4 Toxinas lipofílicas

Para el análisis de toxinas lipofílicas se escalaron las cepas de *Ostreopsis*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* progresivamente de tubos de 50 mL a matraces Erlenmeyer de 1-2 L con 1-1500 mL de medio GSe diluido o medio f/2 (Tabla 2). Las cepas se cosecharon en la fase exponencial tardía por centrifugación a 5000 rpm a 15°C, por 15 min en una centrifuga. Posteriormente se secaron las muestras en una liofilizadora Labconcomarcy modelo Freezone 2.5, bajo condiciones de presión de 0,12 Mbar y temperatura de -40°C, por 48 horas y se enviaron al Alfred Wegener Institute en Bremerhaven, Alemania para la detección de azaspirácidos, ácido ocadaico, gymnodiminas, pinnatoxinas, pectenotoxinas y yesotoxinas mediante HPLC-MS/MS de acuerdo a la metodología propuesta por Krock y colaboradores (2008).

Tabla 2. Lista de cepas de dinoflagelados epifitos analizados mediante la técnica HPLC-MS/MS, para detectar tipos de toxinas

| Cepa | Volumen cosechado o (mL) | Abundancia (cel/ml) | Medio de cultivo |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------|------------------|
| <i>Ostreopsis</i> | 1280 | 1564 | GSe al 50% |
| <i>Prorocentrum</i> | 320 | 1174 | f/2 |
| <i>Amphidinium sp.</i> | 640 | 785 | GSe al 50% |

5. RESULTADOS

5.1 Especies aisladas

Se estableció el cultivo de cuatro especies pertenecientes a los géneros *Amphidinium*, *Coolia*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum*, los cuales en la literatura se han caracterizado por tener representantes toxigénicos. Las cepas fueron aisladas de distintas muestras de macroalgas pertenecientes al grupo de las Phaeophyceas y Rodophyceas (Tabla 3). Las cepas de *O. cf. lenticularis*, *C. malayensis* y *P. cf. rhathymum*, cultivadas en este trabajo presentaron cambios morfológicos, perdiendo así la forma característica, sin embargo no se observó que esto influyera sobre el crecimiento de la población.

| Dinoflagelado | Clave | Número de cepas | Estación | Macroalga | Fecha de aislamiento | Responsable del aislamiento |
|---|-------|-----------------|--------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| <i>Prorocentrum</i> cf. <i>rhathymun</i> | MS28 | 2 | Isla Gaviota | <i>Hypnea</i> sp. | Febrero 2017 | C. Band-Schmidt |
| <i>Ostreopsis</i> cf. <i>lenticularis</i> | OLMS | 10 | Isla Gaviota | <i>Dictyota cervicornis</i> | Marzo 2016 | C. Band-Schmidt |
| <i>Coolia</i> <i>malayensis</i> | DB1 | 4 | Boca Sauzoso | <i>Sargassum horridum</i> | Junio 2016 | M. Sepúlveda-Villarraga |
| <i>Amphidinium</i> cf. <i>carterae</i> | AC | 2 | Isla Gaviota | <i>Hypnea</i> sp. | Noviembre 2016 | M. Sepúlveda-Villarraga |

Tabla 3. Dinoflagelados aislados de macroalgas de la Bahía de La Paz. Clave, número de cepas, zona de colecta, especie de macroalga y fecha de aislamiento.

5.2 Caracterización taxonómica

5.2.1 *Coolia malayensis*

Se aislaron cuatro cepas pertenecientes a la especie *Coolia malayensis* aisladas de la macroalga *Sargassum horridum*, a las que se identificaron en base a la tabulación tecal propuesta por Balech (1980) y por sugerencia de diferentes autores, se realizó su confirmación mediante técnicas moleculares realizando un análisis filogenético

usando 14 secuencias de otras especies del género *Coolia* (Penna *et al.*, 2005; Dolapsakis *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2008).

Las características morfológicas utilizadas para identificar las diferentes especies en este género son similares a las descritas para *Ostreopsis*. Presenta una forma

lenticular, se destaca la arquitectura de las placas por la ornamentación de sus tecas que son lisas y con poros. Las células tienen una talla pequeña de 23 a 26 μm , están comprimidas antero-posteriormente y son ovaladas. Referente al patrón de las placas tecaes, se tiene en cuenta la forma de la cuarta teca apical 4' y la sexta precingular 6'' y la longitud del poro apical (Po) (Ten-Hage *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010).

Las cepas de *C. malayensis* aisladas en este estudio presentaron una longitud entre 27 y 31 μm y un ancho de 25 a 28 μm , las tecas son lisas y con poros. La primera placa apical 1' se caracteriza por ser estrecha y alargada. Una de las placas adyacentes es la 2' en la cual se encuentra el poro apical y mide 5.6 μm . La sexta placa precingular 6'' esta adyacente a la 1' (Figura 4) y es más ancha que está y que las otras placas que constituyen la epiteca. En la hipoteca la placa más ancha es la tercera placa postcingular 3''', la cual ocupa casi la mitad de la hipoteca. El núcleo se ubica en la parte dorsal de la hipoteca (Figura 3). La fórmula tecal de esta especie es Po, 3', 7'', 6 (c), 6 (s), 5''', 2'''' (Leaw *et al.*, 2010).

C. malayensis es similar a *C. monotis* en cuanto a su forma, sin embargo *C. malayensis* es más pequeña, en *C. monotis* la placa 3''' y 4''' son iguales en tamaño, a diferencia de *C. malayensis* donde la 3''' es la teca postcingular más larga y de mayor tamaño en la hipoteca, además esta presenta poros en las tecas con notables perforaciones (Mohadmmad- Noor *et al.*, 2013, Leaw *et al.*, 2016)



Figura 3. Célula vegetativa de *C. malayensis*, N) Núcleo. F) Flagelo, cloroplastos. Aumento 40x.

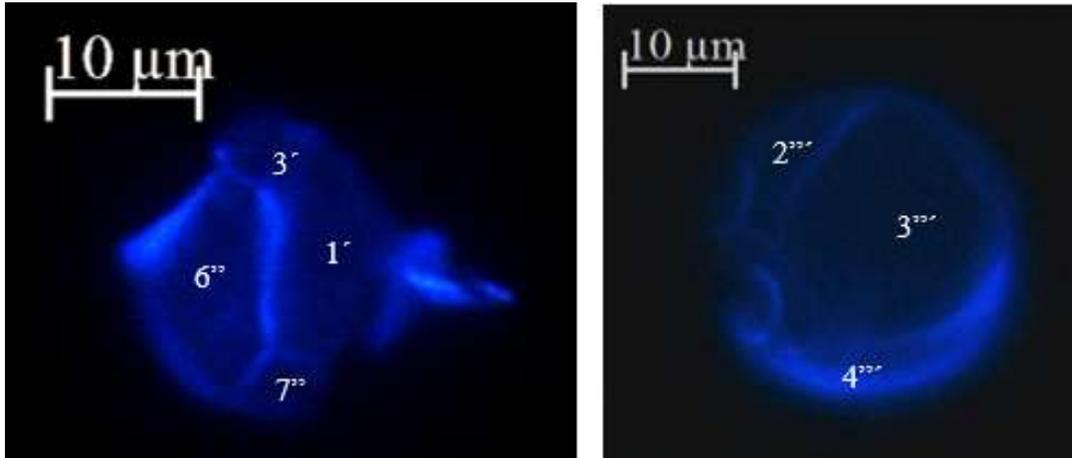


Figura 4. *Coolia malayensis*. Epiteca (Izquierda) Complejo del poro apical (compuesto por 1' y 6''). Hipoteca (derecha), Aumento 40x.

5.2.2 *Ostreopsis cf. lenticularis*

Ostreopsis (Schmidt, 1901) es un género que fue descrito por primera vez con la especie *Ostreopsis siamensis* en 1901. Posteriormente Fukuyo en 1981 identificó a otras dos especies: *O. ovata* y *O. lenticularis*. A partir de este estudio se le ha prestado gran importancia a este género, dado a su naturaleza bentónica, complejidad morfológica y la presencia de algunas especies que se caracterizan por ser tóxicas y/o nocivas, las cuales producen palytoxinas (PLTX) que están relacionadas con la CFP (Nakajima *et al.*, 1981; Faust y Morton, 1995; Penna *et al.*, 2005; Carnicer *et al.*, 2016).

Las células de *Ostreopsis cf. lenticularis* asiladas de la macroalga *Dyctiota cervicornis* presentan una talla de 73 µm, lo que concuerda con Zhang y

colaboradores (2017) que reportan una talla para *O. lenticularis* de 68 a 113 μm . *O. lenticularis* tiene 11 placas en la epiteca, destacando en el área apical la placa 2' con una longitud de 40 μm donde se encuentra el poro apical (Po), alargado y que se dispone a manera de hendidura y enmarca en su totalidad la placa (Figura 3). Esta placa está situada adyacente a la teca 1' caracterizada por ser pentagonal e irregular (Figura 5), además presenta una serie de poros que están ampliamente distribuidos y son de dos tamaños diferentes, de igual forma el límite que separa esta dos placas está fuertemente pronunciado (Figura 1) (Fukuyo, 1981; Zhang *et al.*, 2017).

La hipoteca está constituida de ocho placas. En la zona antapical la teca intercalar 1p presenta una forma pentagonal asimétrica (Figura 6), se localiza en el centro y presenta tres tamaños de poros. La placa adyacente 2''' se caracteriza por ser pequeña y cuadrangular, con la región del sulcus, con base en estas características la formula tecal de esta especie en Po 3' 7'' 5''' 2'''' 1P (Penna *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017).

Dentro de este estudio se cultivaron nueve cepas pertenecientes identificadas como *Ostreopsis* cf. *lenticularis* (Figura 5). Dos de ellas se secuenciaron para confirmar a nivel molecular su identidad taxonómica.



Figura 5 . Célula vegetativa de *O. cf. lenticularis*, 40x.

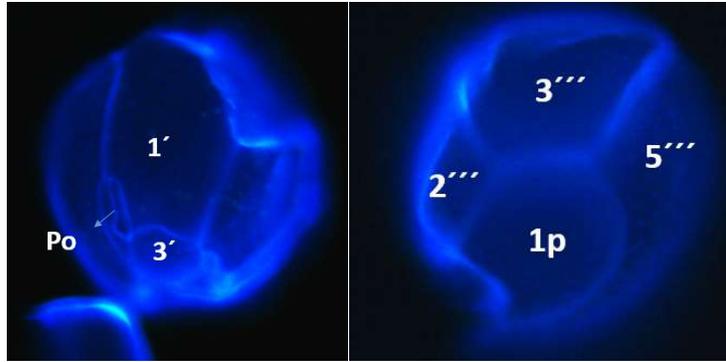


Figura 6. *Ostreopsis* cf. *lenticularis*. Hipoteca (Izquierda), Po, Poro apical, Epiteca (Derecha). Aumento 40x.

5.2.3 *Amphidinium* cf. *carterae*

El género *Amphidinium* fue descrito por primera vez por Claparède y Lachmann en 1859 para designar a una especie de dinoflagelado (*A. operculatum*) descubierta en las cercanías de Bergen, Noruega. En la descripción original mencionan que la talla del epicono se encuentra “reducida al estado de una placa delgada, comparable a un opérculo” (Claparède y Lachmann, 1859). Sin embargo, los dinoflagelados del género *Amphidinium* carecen de placas de celulosa en la superficie de la célula y por tanto son desnudos.

En este trabajo se identificó *A.* cf. *carterae* una especie atecada que tiene una forma ovalada, una estructura característica llamada epicono en su parte apical que es muy reducido y abarca menos de la mitad de la longitud de la célula, de igual forma, el cloroplasto es multilobular, denso y centrado lo cual es un carácter diagnóstico para esta especie. Para identificar a esta especie fue necesario observar células vivas para analizar la inserción de los flagelos y la forma real de las células, ya que con los fijadores como el Lugol se produjeron ciertas deformaciones que dificultaron la identificación (Larsen, 2002; Jorgensen *et al.*, 2004; Escobar-Morales y Hernández-Becerril, 2015).

De la especie analizada en este estudio se cultivaron dos cepas con un ancho de 16.78 a 20 μm , una longitud de 23 a 25 μm . El epicono es de forma triangular de 5.32 a 6 μm de largo y 2.22 a 3 μm de ancho (Figura 7).

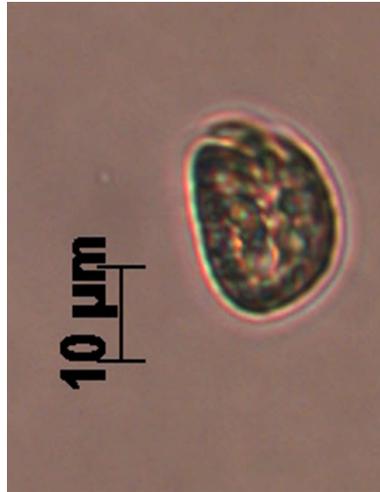


Figura 7. Célula vegetativa de *Amphidinium* cf. *carterae*. 40x.

5.2.4 *Prorocentrum* cf. *rhathymum*

Este género ha sido uno de los más estudiados, ya que se han registrado varias especies caracterizadas por ser potencialmente tóxicas, así mismo pueden presentar una alta abundancia en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Delgado *et al.*, 2002). *Prorocentrum* fue descrito por primera vez por Ehrenberg en 1834 siendo la especie tipo *P. micans*. Faust (1990, 1993a, 1993b, 1994), la caracterizó por ser una especie bentónica-epifita, encontrada en ambientes coralinos, manglares y macroalgas en el mar Caribe de Belice. Con base en este nuevo registro se estableció una serie de caracteres morfológicos claves para identificar las diferentes especies de este género, tales como la forma y talla de la célula, la zona periflagelar, el tipo de ornamentaciones y la arquitectura de la banda intercalar (Dodge, 1975; Faust *et al.*, 1999).

Dentro de las características que se han usado para identificar a las diferentes especies de *Prorocentrum*, están la forma ovalada – piriforme que presentan sus células; las valvas se diferencian porque una tiene forma de V y la otra es plana.

Prorocentrum cf. *rhathymum* Loeblich, Shirley et Schmidt 1979, es de forma oval o elipsoidal oblonga, con márgenes redondeados. Las medidas que presentaron las células aisladas en este estudio son una longitud de 31 a 37 μm y un ancho de 18 a 22 μm . El contorno de la teca es gruesa y circular. No fue posible ver el detalle de los poros y tampoco se pudo observar el pirenoide. Las células presentaron una espina apical de tamaño reducido ubicada a un lado de la zona periflagelar la cual es poco profunda (Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003).



Figura 8. Célula vegetativa de *Prorocentrum* cf. *rhathymum*. 20x

5.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético de las cepas pertenecientes a *C. malayensis* y *O.* cf. *lenticularis* con secuencias parciales de la región 28S del ADN ribosomal se realizó con un árbol de inferencia Bayesiana en el cual se muestra la relación que tienen las secuencias de nuestras cepas con las secuencias de cepas de otras regiones geográficas. Al comparar la secuencia obtenida de *Coolia* en este estudio con otras secuencias del Genbank se obtuvo 100% de soporte en la inclusión de la secuencia de la cepa **DB1**, dentro del clado de *C. malayensis* con cepas de Malasia y China (Figura 9).

La secuencia obtenida con el marcador 28S para la cepa **OLMS** de *Ostreopsis* mostró 100% de soporte al ser incluida en un subclado con una secuencia de

Ostreopsis sp., pero ambas secuencias muestran una mayor afinidad filogenética con cepas de *O. lenticularis* originarias de Malasia y Nueva Zelanda (Figura 8).

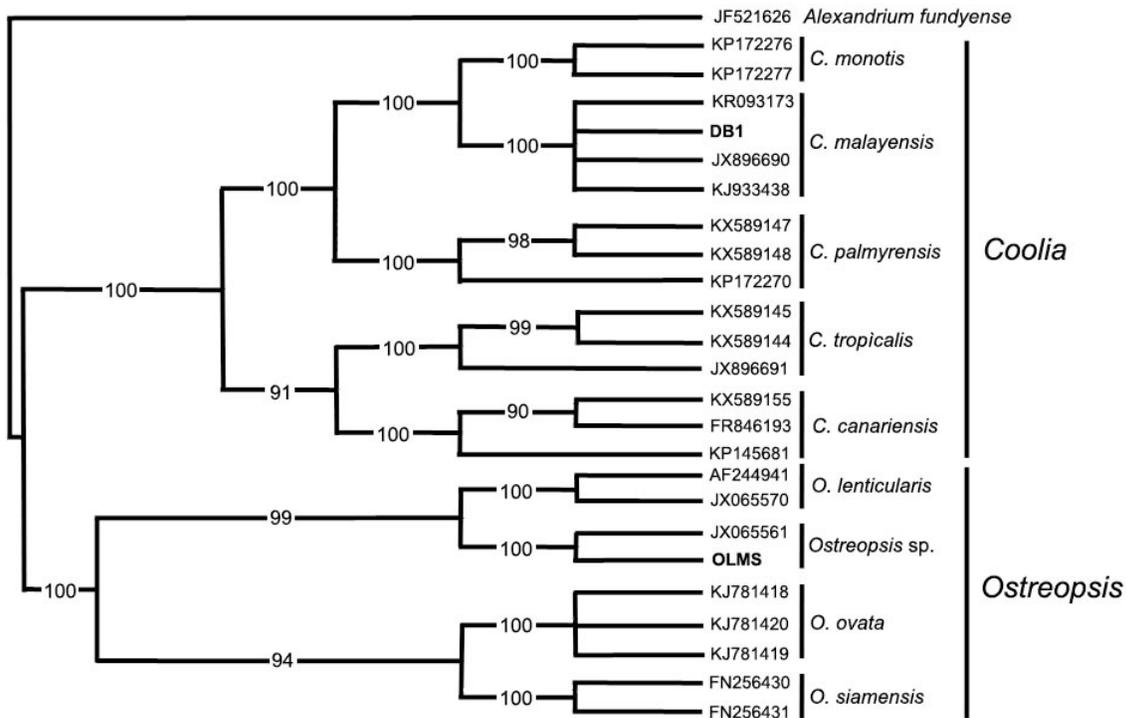


Figura 9. Árbol filogenético con 25 caracteres de alineación de secuencias de especies de dinoflagelados del género *Coolia* y *Ostreopsis* (**DB1** y **OLMS**), usando el marcador 28S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Al usar el marcador molecular 5.8S del ADNr (Fig. 10), al asociar la secuencia **OLMS** con otras secuencias pertenecientes al género *Ostreopsis*, se obtuvo la rama interna con un soporte de 70% con otra secuencia identificada como *Ostreopsis* sp. aislada de Honolulu, Hawaii está dentro del estudio donde se aisló y secuenció fue incluida dentro del clado de secuencias de *O. cf. lenticularis* obtenidas en el mar de China (Figura 9). Las secuencia AF218465 *O. lenticularis* y FM244728 *O. labens* presentaron un porcentaje de alineamiento más bajo con la secuencia obtenida en este estudio, por esta razón no la incluyen dentro del clado de estas dos secuencias ya mencionadas.

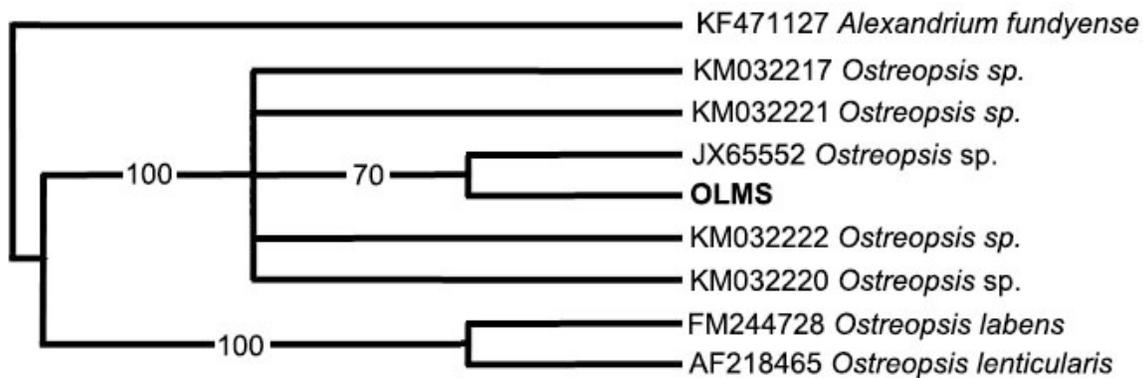


Figura 10. Árbol filogenético con 9 caracteres de alineación de secuencias de *Ostreopsis* con el marcador 5.8S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

El análisis filogenético con el marcador 18S mostró valores de soporte de bootstrap bajos, el árbol filogenético (Figura 11) presentó dos cladogramas principales, el primero incluyó a *O. rhodaseae* y *O. cf. siamensis*, mientras que el segundo clado estuvo formado por un subclado con dos cepas de *O. cf. ovata* y una de *Ostreopsis* sp. unido a la cepa **OLMS**, con un soporte del 54%. La secuencia de *O. cf. ovata* es de una cepa de España y *Ostreopsis* sp. está dentro de un complejo de secuencias de cepas obtenidas de Malasia al cual se les denominó *Ostreopsis* sp y *O. lenticularis*.

Es importante indicar que al revisar el alineamiento de la secuencia **OLMS** con el marcador molecular 18S, esta tiene 1176 pares de bases. El análisis BLAST con secuencias del GenBank mostró que la mayor identidad de esta secuencia (86%) se obtuvo con una denominada como *O. rhodesae* (KX055864), sin embargo al realizar el árbol filogenético se pudo observar que la secuencia **OLMS** no se incluyó dentro del clado de *O. rhodesae*, pero sí dentro del clado con *O. ovata* con quien tuvo un porcentaje de identidad del 92%, mostrado en el Blast del GenBank esto se puede atribuir a la cantidad de pares de bases que comparten, de esta forma al observar la alineación que se presentó entre las secuencias de *O. rhodesae* y *O. ovata* con la del presente estudio (**OLMS**). *O. rhodesae* tuvo 1112 Pb, pero de estas solo 1086 Pb fueron similares a 930 Pb de la secuencia de **OLMS** por esta razón el porcentaje de identidad fue de 86%, pero al observar el alineamiento con

O. ovata con 1079 Pb de estas, 772 Pb fueron similares con 713 Pb de **OLMS**, presentándose un 92% de identidad. Debido a que nuestra cepa comparte un mayor número de pares de bases con *O. ovata* quedaron dentro del mismo clado. Es importante resaltar que la cantidad de secuencias que se han obtenido con este marcador molecular han abarcado pocas especies dentro de este género y por lo tanto aún se denominan como *Ostreopsis* sp. (Figura 10).

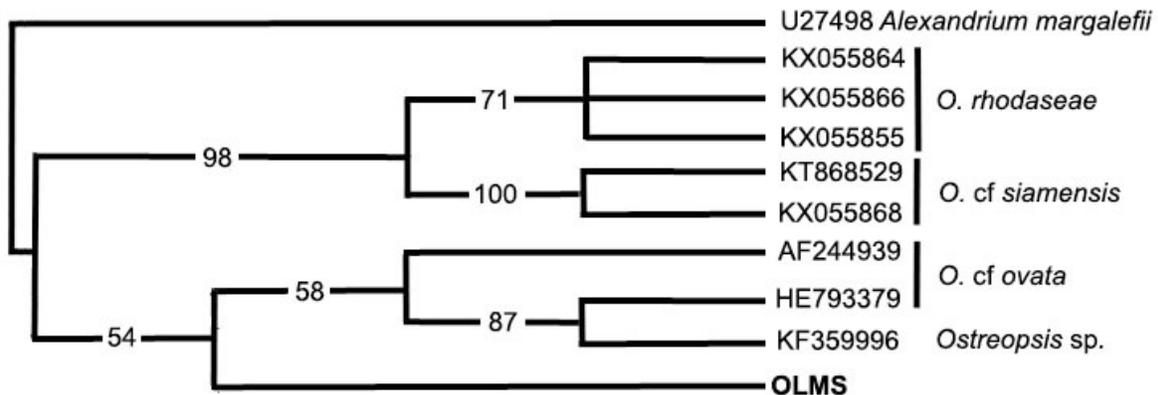


Figura 11. Árbol filogenético con 10 caracteres de alineación de secuencias de *Ostreopsis* usando el marcador 18S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

El análisis BLAST de la secuencia en el GenBank de la cepa de *Prorocentrum* cf. *rhathymum* con el marcador 28S reveló que ésta presentó un porcentaje de identidad del 95% con secuencias de *P. mexicanum* y *P. rhathymum*. Se revisó el número de pares de bases (Pb) de estas especies y se comparó con la secuencia obtenida en este estudio compuesta por 552 (Pb), mediante el análisis de alineamiento fue posible determinar que de 492 (Pb) de *P. mexicanum* y 486 (Pb) de *P. rhathymum*, la secuencia (**MS28**) con 552 (Pb) sólo comparte 375 (Pb) con las secuencias mencionadas. Esto permite inferir la razón por la que ésta secuencia se encuentra fuera del grupo de secuencias del género *Prorocentrum*. Sin embargo, el primer grupo al cual se une dentro del árbol filogenético es al complejo de *P. mexicanum*/*P. rhathymum*, de esta forma se pudo indicar que la identificación de la

cepa recae en una apreciación morfológica, además en esta zona de BCS ya se había establecido que la especie registrada es *P. rathymum* (Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003) (Figura 12).

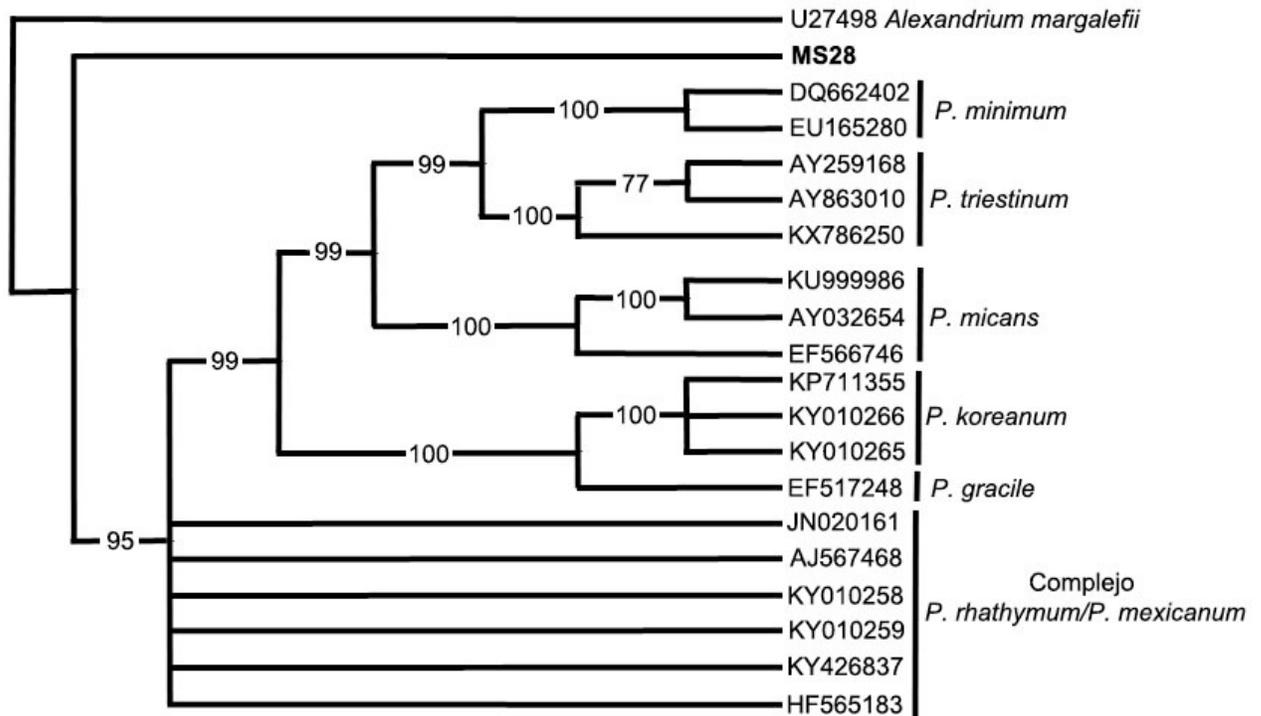


Figura 12. Árbol filogenético con 20 caracteres de alineación de secuencias de *Prorocentrum* usando el marcador 28S del ADNr. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del bootstrap.

Respecto a la secuencia de la cepa identificada morfológicamente como *Amphidinium* cf. *carterae*, se logró la extracción de ADN genómico, sin embargo con los marcadores utilizados en este estudio (18S, 28S y 5.8S), no fue posible obtener amplicones que pudieran ser secuenciados para la identificación molecular de esta cepa.

5.4 Curvas de crecimiento

En *C. malayensis* no se observa una fase de aclimatación en medio GSe, ni en f/2 (Figura 9), en ambos medios se presenta una fase exponencial del día 3 al día 9, no hay fase de aclimatación y a partir del día 12 empieza la fase de decaimiento. Las biomazas máximas fueron similares en ambos medio de cultivo 4301 ± 79.4 cel/mL y 4305 ± 55.2 cel/mL en medio GSe diluido y f/2, respectivamente. La tasa de crecimiento fue de $0.204 \text{ cel día}^{-1}$ en medio f/2 y de $0.16 \text{ cel día}^{-1}$ en medio Gse diluido. El tiempo de generación en medio f/2 fue de 3.4 y en medio Gse diluido 4,3

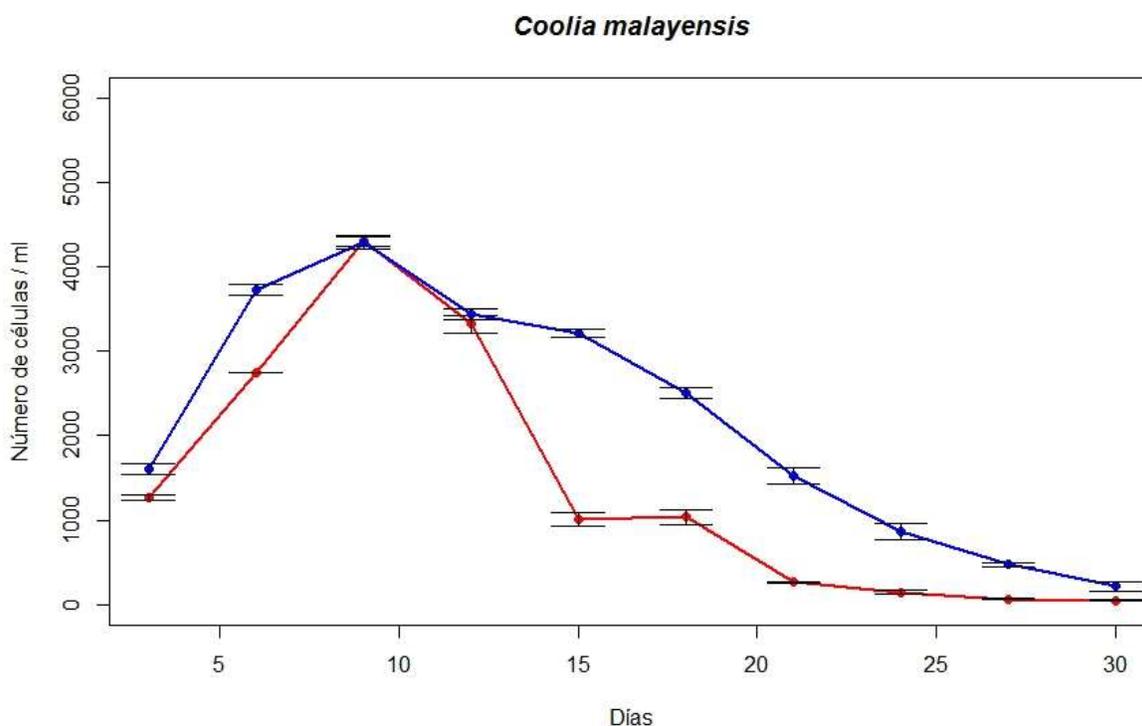


Figura 13. Curva de crecimiento de *C. malayensis* en medio GSe diluido al 50% (línea azul) y medio f/2 (línea roja) a 24°C . Valores promedio y desviación estándar.

Ostreopsis cf. lenticularis (Figura 10) tampoco presentó una fase de aclimatación en ambos medios de cultivo. La fase exponencial de crecimiento se observa del día 3 al día 9, la fase estacionaria de 1457 ± 29.48 cel/mL a 1584 ± 38.57 y la fase de decaimiento inicia desde el día 15. La biomasa máxima fue mayor en medio GSe

(2624 ± 196 cel/mL) que en medio f/2 (2113 ± 103.17 cel/mL). La tasa de crecimiento en medio f/2 fue de $0.103 \text{ cel día}^{-1}$ y en medio GSe 0.106 cel día . El tiempo de generación para f/2 fue de 6.71 y para Gse diluido 6,6

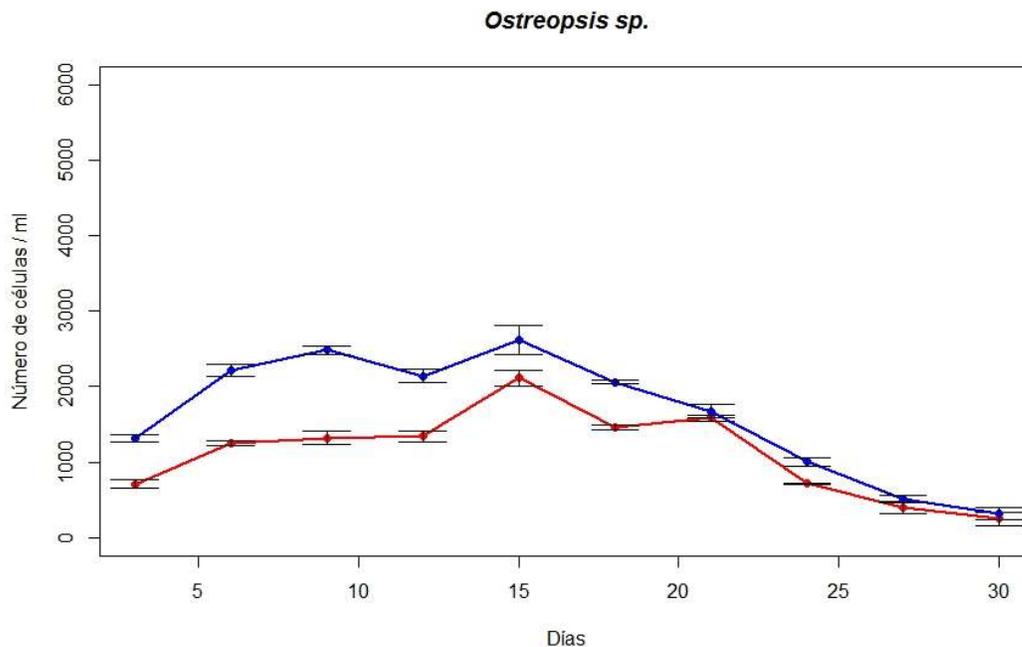


Figura 14. Curva de crecimiento de *O. cf. lenticularis* en medio GSe diluido al 50% (línea azul) y medio f/2 (línea roja), a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Valores promedio y desviación estándar.

Al realizar un análisis de varianza, usando los datos de las biomásas obtenidas durante la fase exponencial, se pudo comprobar que con un nivel de confianza del 95% ($p \geq 0,05$) que no hay evidencia para decir que hay diferencias significativas entre los medios manejados GSE diluido y f/2 tanto con *O. cf. lenticularis* y *C. malayensis* durante la fase exponencial

No se realizaron las curvas de crecimiento de *A. carterae*, ni de *P. rhathymun*, debido a que las densidades máximas que alcanzaron fueron insuficientes.

5.5 Toxinas lipofílicas

No se detectaron toxinas lipofílicas (azaspirácidos, ácido ocadaico, gymnodiminas, pinnatoxinas, pectenotoxinas y yesotoxinas) en las cepas de *Ostreopsis*, *Prorocentrum* y de *Amphidinium*.

4. DISCUSIÓN

El estudio del grupo de los dinoflagelados bentónicos ha adquirido bastante importancia ya que tiene representantes que se caracterizan por producir toxinas lipofílicas, que se han asociado a problemáticas ambientales, sociales y económicas (Nakajima *et al.*, 1981; Faust y Morton, 1995; Penna *et al.*, 2005; Carnicer *et al.*, 2016). De la misma manera se ha presentado una ambigüedad taxonómica dentro de diferentes géneros que dificulta la identificación a nivel morfológico, lo cual ha llevado a usar diferentes técnicas moleculares que permiten aclarar la nomenclatura de diferentes especies, así mismo la falta de conocimiento de su ecología, ciclo de vida, autoecología, producción de toxinas, ha llamado la atención de distintos investigadores, ha promovido la investigación sobre este grupo (Leaw *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, se ha evidenciado una problemática al momento de identificar con técnicas tradicionales a los dinoflagelados bentónicos, ya que se basan en la morfología de las placas que pueden observarse por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Sin embargo, haya autores que han probado la existencia de especies crípticas, además de que algunas especies pueden sufrir plasticidad fenotípica inducida por factores ambientales, lo cual puede explicar lo observado en cepas cultivadas que muestran cambios en su morfología (Carniceri *et al.*, 2012). De esta forma diferentes autores han sugerido que al realizar estudios morfológicos sobre las especies mencionadas se debe realizar un análisis filogenético para poder confirmar su identificación específica mediante técnicas moleculares, ya que en ocasiones las características morfológicas son poco distinguibles y han llevado a cometer errores de identificación (Rhodes *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2011; Villa *et al.*, 2001; Momigliano *et al.*, 2013).

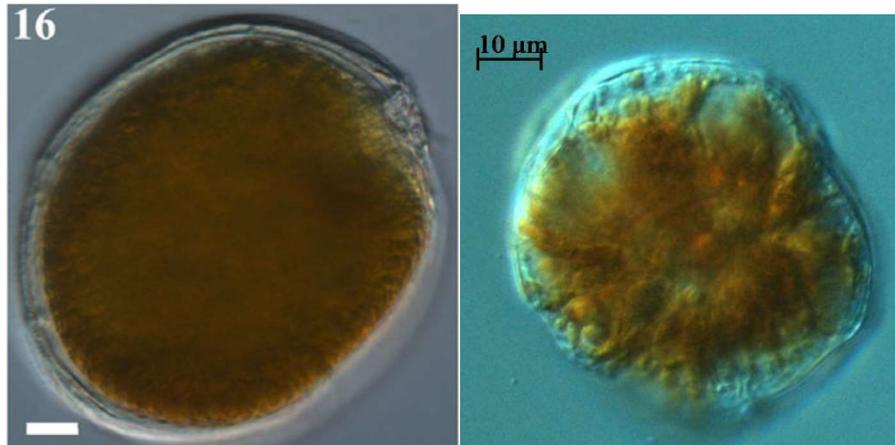
En este estudio se identificaron cuatro especies de dinoflagelados epifitos: *Amphidinium* cf. *carterae*, *Coolia malayensis*, *Ostreopsis* cf. *lenticularis* y

Prorocentrum cf. *rhathymum*, que fueron extraídas de especies de macroalgas del grupo Phaeophyceae de los géneros *Dyctiota*, *Sargassum* y *Padina*, así como de algas rojas del género *Hypnea*. Distintos autores indican que las macroalgas pueden brindar un sustrato adecuado a los dinoflagelados bénticos dándoles un área amplia de adhesión y refugio contra los depredadores (Faust *et al.* 2005). Existen registros de que especies de *Coolia*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* que se han encontrado sobre algas pardas del género *Sargassum* y *Padina* en diferentes sitios de Malasia (Zhang *et al.*, 2017).

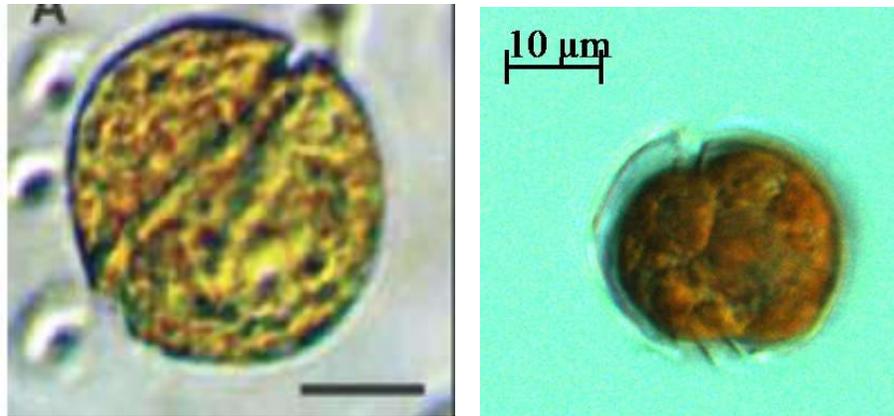
6.1 Cultivos

Las cepas se mantuvieron bajo condiciones controladas en el laboratorio a 24°C y una salinidad de 34, irradiancia de 150 μmol cuanta $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. A pesar de que las especies son epifitas fue posible mantenerlas bajo estas condiciones y con el medio de cultivo seleccionado. Sin embargo fue evidente el cambio de forma que sufrieron las células en cultivo lo cual se pudo notar a los 5 días de haber aislado las células, pero esto no influyó en su crecimiento el cual se presentaba de una forma lenta pero constante (Figura 10).

A.



B.



C.

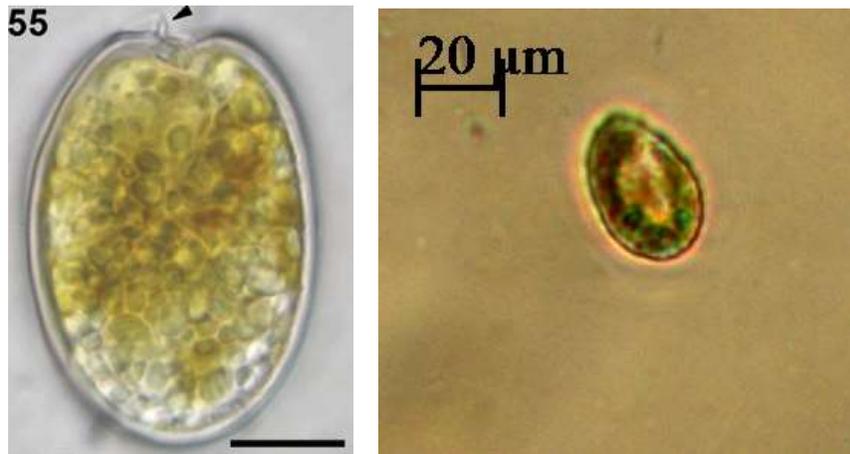


Figura 10. Células vegetativas de **A.** *Ostreopsis lenticularis*, **B.** *Coolia malayensis*, **C.** *Prorocentrum cf. rathymum*. Las imágenes de la izquierda corresponden a células vegetativas reportadas por Leaw *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2017) y las de la derecha son las cepas aisladas en este estudio.

Algunos autores indican que al variar la temperatura y la salinidad de cultivo promueven cambios en la morfología de las células y las tasas de crecimiento. Canicer *et al.* (2016) indicaron que al cultivar a cepas de *O. cf. ovata* a una temperatura de 19°C y 24 °C con salinidad de 36 las células se deformaron, al igual que a una temperatura de 28°C y salinidad de 38. Las mayores biomásas fueron a 28°C con una salinidad de 36 ($9.48 \pm 2.2 \times 10^3$ cel mL⁻¹) y a 24 °C con una salinidad

de 38 con $3.97 \pm 0.55 \times 10^3$ cel mL⁻¹, la abundancia menor se reportó a una temperatura de 19 °C con una salinidad de 38 siendo de $0.71 \pm 0.11 \times 10^3$ cel mL⁻¹. Tawon *et al.* (2014) demostraron que al someter a células de *Ostreopsis* spp. a salinidades entre 20 y 40 presenta bajas tasas de crecimiento 32 °C, y al cultivar a la misma cepa a 25°C y salinidad de 35 presenta mayores tasas de crecimiento con lo cual determinaron que la temperatura es una variable importante que influye sobre el crecimiento de esta especie, así mismo comentan que al no estar en condiciones óptimas de cultivo las células se deforman mas no se altera su crecimiento.

Al establecer los cultivos fue notable que las células de las diferentes especies presentaron un cambio en su morfología, la cual era muy distinta a la que tienen en el ambiente, esto fue persistente durante todas las etapas del cultivo. Sin embargo, fue notable que a pesar que se deteriorara su morfología, el crecimiento de la población no se vió afectado. Carniceri *et al.* (2012) mostraron que la interacción de la salinidad con la temperatura puede repercutir en la fisiología, morfología y toxicología de las microalgas. La temperatura y la salinidad tienen una influencia primordial en el crecimiento, morfología y mantenimiento de los cultivos. En especies de *Coolia* se ha demostrado que la temperatura es el factor más importante que regula su crecimiento y que el crecimiento máximo puede darse en salinidades entre 36 y 40, más no por debajo de 20. La forma de las células puede modificarse bajo las condiciones de cultivo, sin embargo se ha observado que si las condiciones de mantenimiento están dentro de los rangos mencionados, esto podrá afectar la forma de las células sin influir sobre su crecimiento (Mangialajo *et al.*, 2011; Pitochi *et al.*, 2011; Parsons *et al.*, 2012; Pezzolesi *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2013; Carnicer *et al.*, 2016).

Las especies de los distintos géneros analizados en este estudio se han registrado principalmente en zonas tropicales y subtropicales. *Coolia* y *Ostreopsis* de la familia Ostreopsidaceae, fueron colectados en dos zonas diferentes de Bahía de La Paz, una zona se caracterizó por presentar una alta cobertura de la macroalga *S. horridum* y la otra una alta cobertura coralina. Diversos autores indican que existe

una relación filogeográfica entre ambos géneros ya que se han registrado en zonas tropicales y subtropicales asociándolos a arrecifes de coral y debido a que presentan una similitud en la tabulación de las placas tecales (Fukuyo, 1981; Leaw *et al.*, 2001; Penna *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013; Rhodes *et al.*, 2014; Tawon *et al.*, 2015).

Autores como Jeong *et al.*, 2003, estableció un cultivo de *P. rathymun* en medio f/2 a 20°C.

6.2 Especies estudiadas

6.2.1 *Ostreopsis*

Ostreopsis es un género de dinoflagelado bentónicos que producen toxinas lipofílicas y que se ha registrado en zonas endémicas de CFP (Faust, 2011), esto llevo a realizar estudios a nivel taxonómico evidenciando la destacada semejanza morfológica entre ellas (Fukuyo, 1981; Norris *et al.*, 1985; Faust y Morton, 1991; Quod, 1994; Penna *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2017). La identificación morfológica de especies de *Ostreopsis* se ha basado en el patrón de las placas tecales, enfatizando la forma, longitud, ancho, presencia de poros teniendo en cuenta su forma y tipos de poros, entre otras características (Penna *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2012). De acuerdo a Lindeman (1982) *Ostreopsis* y *Coolia* presentan un patrón de placas similar en la epiteca pero con diferencias notables en la hipoteca, esto hace que los clasifiquen dentro de la misma familia

El género de *Ostreopsis* está distribuído ampliamente a nivel global en distintos ambientes tanto tropicales como subtropicales, sin embargo se ha encontrado de forma predominante asociado con macroalgas rojas y pardas, aunque también se ha reportado en arrecifes de coral, áreas rocosas intermareales, escombros coralinos y sedimentos arenosos (Carlson, 1984; Bomber *et al.*, 1985; Norris *et al.*, 1985; Ballantine *et al.*, 1988; Holmes *et al.*, 1988; Quod, 1994; Faust *et al.*, 1996).

La primera identificación morfológica de *O. siamensis* fue realizada por Schmidt, (1901). Se destaca la forma lenticular y comprimida antero-posterior, en la parte ventral con una terminación en forma de punta y en la zona apical un poro alargado que enmarca toda la teca 2' (Fukuyo, 1981). Dado a que pertenece al orden Gonyaulacal, fue usado el diagrama de la tabulación de las placas tecales propuesto por Balech en 1970 para su identificación, en el que se destaca de la epiteca, placa en la que se encuentra el poro apical y aquella que esta adyacente a esta, lo cual brinda suficiente información sobre la especie y permite identificarla. De esta manera se han logrado identificar en base a el patrón de la placas, la forma y la talla distintas especies de este género, tales como *O. ovata* y *O. lenticularis* (Fukuyo, 1981), *O. heptagona* (Norris *et al.*, 1985), *O. mascareniensis* (Quod, 1994), *O. labens* (Faust y Morton, 1995), *O. marinus*, *O. belizeanus*, *O. caribbeanus* (Faust, 1999), *O. rhodesae* (Verma *et al.*, 2016) y *O. fattorussoi* (Penna *et al.*, 2005; Accoroni, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

Diferentes especies registradas a lo largo de estos años son reconocidas por producir toxinas, y estar asociadas a la formación de florecimientos algales nocivos (FAN). Se han reportado FAN de especies del género *Ostreopsis* en el Mar Mediterráneo que han sido relacionadas con problemas de salud humana, tales como irritación en vías respiratorias por la inhalación del aerosol marino, en la piel y en los ojos, mortandad masiva de organismos marinos entre otros (Sansoni *et al.*, 2003; Ciminiallo *et al.*, 2006; Mangialajo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

Ostreopsis lenticularis se caracteriza por ser fotosintética aunque algunos autores resaltan que puede ser mixotrófica (Faust *et al.*, 1996). Presenta un núcleo central en la parte posterior y cloroplastos dorados (Fukuyo, 1981; Faust y Morton, 1995). Fue reportada por primera vez en Nueva Caledonia en el Océano Pacífico a partir de la colecta de macroalgas (Fukuyo, 1981). Posteriormente se ha reportado en diferentes zonas: en macroalgas de la región del Caribe (*Dictyota* sp. y *Acanthophora specifera*), en muestras de plancton, sedimentos arenosos y corales

blandos (Fukuyo, 1981; Ballantine *et al.*, 1985; Carlson y Tindall, 1985; Steidinger y Tegen, 1996).

O. cf. lenticularis fue colectada de una macroalga parda *Dyctiota cervicornis*, lo cual coincide con lo reportado en la literatura en donde se ha registrado en macroalgas pardas como *Dyctiota* sp. y *Acanthophora specifera*, en sedimentos arenoso, algas que crecen sobre corales, así mismo se ha encontrado en la columna de agua, en zonas como la región del Caribe, Océano Pacífico y en aguas poco profundas (Carlson y Tindall, 1985; Morton y Faust, 1997).

En este estudio se tomó como referencia la especie tipo *Ostreopsis siamensis* (Fukuyo, 1981). A partir de esta descripción se han establecido las diferencias morfológicas entre *O. lenticularis* y *O. siamensis* ya que presentan un patrón similar en sus placas tecales. La diferencia entre ellas radica en que *O. lenticularis* es más ovalada que *O. siamensis* y muestra dos tamaños y formas de poros la teca 1' y tres tamaños en la teca 1P que se encuentra en la zona antapical, lo cual es diferente en la segunda especie que solo presenta poros del mismo tamaño y de una misma forma.

A nivel morfológico, la identificación de *O. cf. lenticularis* se logró en base al patrón de las placas tecales, en el que se tuvo en cuenta la forma y tamaño de las placas que constituyen el complejo del poro apical, el cual está constituido por la placa 1' de forma pentagonal e irregular compuesta por poros profundos y ampliamente distribuidos por toda la placa. La placa 1' se encuentra adyacente a la placa 2' que está enmarcada en su totalidad por un poro apical alargado. En la hipoteca, la teca nombrada 1P es la más destacada ya que es pentagonal y asimétrica y esta seguida por la placa 1''' que colinda con la región del sulcus, el área del cingulo es angosta y poco excavada y no hay ondulaciones marcadas, una característica diagnóstica es la presencia de poros, así como su forma y tamaño, sin embargo no fue posible observar esto bajo el microscopio. Diversos autores indican que la superficie de las tecas es lisa y se encuentra cubierta con poros que se dispersan a lo largo de las

tecas y tienen tres formas: redondos, oblongos y en forma de riñón (Faust *et al.*, 1996; Zhang y Li, 2017).

Al realizar la confirmación de esta especie usando técnicas moleculares, con marcadores moleculares 28S, 18S y 5.8S del ADNr se encontraron diversos resultados que permiten identificar que especie es la cepa de *Ostreopsis*. El marcador 28S reveló una mayor afinidad de la cepa aislada con *O. lenticularis*, con el marcador 5.8S se presentó un porcentaje de identidad del 86% con *O. rhodesiae* y del marcador 18S no se han registrado suficientes secuencias como el 28S con el cual se ha encontrado mayor número de secuencias dentro del género *Ostreopsis*.

La secuencia obtenida de la región 18S mostró una identidad del 85% con *O. rhodesiae* reportada en el GenBank (KX055866.1). *O. lenticularis* y *O. rhodesiae* son morfológicamente similares, ambas con forma lenticular ovalada junto con cloroplastos dorados distribuidos en toda la célula (Verma *et al.*, 2016; Zhang y Li, 2017).

Si se compara a la región 28S y la 18S, la segunda presenta una tasa de mutación más lenta lo que equivale a una evolución molecular más lenta, en comparación de aquellos pertenecientes a las subunidad larga (28S y 5.8S) (Hillis y Dixon, 1991; Janson y Hayes, 2006). El marcador 18S se ha utilizado con frecuencia para abordar relaciones filogenéticas distantes (decenas de millones de años de divergencia), por ende suele emplearse para relacionar taxones relativamente distantes dado el grado de conservación de su secuencia, no obstante se utilizó este marcador como una primer aproximación molecular utilizándolo en combinación con los otros marcadores del ADNr (Hillis y Dixon, 1991; Janson y Hayes, 2006).

Pese que a nivel molecular la secuencia OMLS con el marcador 18S presento similitud con la secuencia de *O. rhodesiae*, Sin embargo a nivel morfológico el complejo del poro apical de *O. rhodesiae* está compuesto por la placa 1' que es hexagonal y no está en contacto con la placa 5" pero sí con la placa 3' y 6". La teca 1' colinda con la 2' que se caracteriza por ser alargada y sobrepasar el margen de

la 3', difiriendo con las características de las tecas de *O. lenticularis*. Además *O. rhodesiae* se describió por primera vez en 2016 y se catalogó como una especie pseudo críptica de *O. siamensis* (Verma *et al.*, 2016; Zhang y Li, 2017).

Con base en lo anterior, al equiparar la identificación tanto morfológica como molecular, Las secuencias del género *Ostreopsis* sp. que se incluyeron dentro del clado con *O. lenticularis* con un soporte del 100% con los dos marcadores 28S y 5.8 de la subunidad larga del ADNr y la caracterización morfológica permite inferir que la especie trabajada en este estudio es *O. cf. lenticularis*.

Ostreopsis siamensis, *O. mascarenensis*, *O. lenticularis* y *O. cf. ovata* se han asociado con la producción de toxinas lipofílicas como las palitoxinas y ostreotoxinas (Nakajima *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1987; Mercado *et al.*, 1994; Lenoir *et al.*, 2004; García-Altare *et al.*, 2015). Además se ha presentado una sorprendente aparición de estas especies en zonas templadas siendo que son características de áreas tropicales y subtropicales, así mismo han formado FAN y se han asociado a problemas respiratorios e irritaciones en la piel en islas del Océano Pacífico, además de que se han registrado en zonas endémicas de CFP (Fukuyo, 1981; Aligizaki y Nikolaidis, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2007; Shears y Ross, 2009; Rhodes, 2010).

Ostreopsis siamensis, *O. mascarenensis*, *O. lenticularis* y *O. cf. ovata* se han asociado con la producción de toxinas lipofílicas como las palitoxinas y ostreotoxinas (Nakajima *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1987; Mercado *et al.*, 1994; Lenoir *et al.*, 2004; García-Altare *et al.*, 2015). Además se ha presentado una sorprendente aparición de estas especies en zonas templadas siendo que son características de áreas tropicales y subtropicales, así mismo han formado FAN y se han asociado a problemas respiratorios e irritaciones en la piel en islas del Océano Pacífico, además de que se han registrado en zonas endémicas de CFP

(Fukuyo, 1981; Aligizaki y Nikolaidis, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2007; Shears y Ross, 2009; Rhodes, 2010).

6.2.2 *Coolia*

El estudio de este género se ha visto asociado a la destacable motivación para investigar sobre la distribución, biodiversidad, ecología y toxicidad de las diferentes especies de *Coolia*, de tal forma que se han realizado estudios en Nueva Zelanda, la Gran Barrera Arrecifal de Australia, el sur del Océano Pacífico, Japón, Corea, entre otros (Yasumoto *et al.*, 1980; Nakajima *et al.*, 1981; Momigliano *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 2010, 2013, 2014). Se han colectado especies toxígenicas (*C. tropicalis* y *C. malayensis*) que producen cooliatoxinas, yesotoxinas y análogos (Holmes *et al.*, 1995, Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Rhodes *et al.*, 2014a; Karafas *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015).

Dentro de este género también se ha destacado la similitud morfológica que presentan las especies que lo conforman, lo cual ha sido un gran reto a nivel taxonómico, por esto se ha usado la tabulación de las placas tecales para establecer las diferencias entre estas. Como ya se ha mencionado, la especie que se describe en este trabajo corresponde a *Coolia malayensis*, la cual habita en un gradiente latitudinal muy amplio y se ha reportado en una alta variedad de hábitats (Leaw *et al.*, 2010). A menudo coexiste con otros dinoflagelados epibentónicos tóxicos del género *Gambierdiscus* y *Ostreopsis*, cuya asociación puede contribuir con el síndrome de la ciguatera en algunas áreas donde este padecimiento es endémico (Tindall y Morton, 1998; Leaw *et al.*, 2010; Rhodes *et al.*, 2014a; Gómez *et al.*, 2015).

En México se han registrado diferentes especies de *Coolia* en diferentes sitios tales como el Caribe Mexicano en el que se identificó a *Coolia tropicalis* (Almazán-Becerril *et al.*, 2015), *C. monotis* en el Pacífico mexicano y en la Bahía de La Paz (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006; Hernández-Castro, 2017) y *C. malayensis* en la Bahía de La Paz (Hernández-Castro, 2017). *C. malayensis* es morfológicamente similar a *C.*

monotis, ya que presenta perforaciones dentro de los poros presentes en la teca, las cuales no se presenta en *C. monotis*. La placa 3^{'''} postcingular es la más grande de la hipoteca en *C. malayensis* mientras que en *C. monotis* las placas 3^{'''} y 4^{''} son de la misma talla. Además presenta pocos poros en las tecas y su poro apical es particularmente corto a comparación de las otras especies (Faust, 1995; Fraga *et al.*, 2008; Leaw y Lim, 2010).

C. malayensis se ha registrado en un amplio rango de regiones geográficas y una alta variedad de hábitats (Leaw *et al.*, 2010). Se caracteriza por ser toxigénica, produciendo de esta forma metabolitos secundarios como las cooliatoxinas, que son análogos neurotóxicos de las yesotoxinas (Nakajima *et al.*, 1981; Holmes *et al.*, 1995).

Al realizar el análisis filogenético con el marcador 28S fue posible establecer que nuestra cepa presentó una elevada afinidad filogenética con secuencias de *Coolia malayensis* de Malasia y China (100% de soporte del bootstrap), representando la obtención de las primeras secuencias de esta especie en la Bahía de La Paz (Tabla 4).

Es necesario seguir trabajando en la diversidad de este género debido al aumento en el número de especies que se ha descrito en los últimos años (Ten-Hage *et al.*, 2000a; Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010, 2016; Jeong *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 2014; Karafas *et al.*, 2015).

6.2.3 Amphidinium

Este género ha sido ampliamente estudiado a nivel taxonómico, sin embargo ha despertado la atención de diferentes autores el hecho de que tiene representantes que se han caracterizado por ser tóxicos. Referente a esto *A. carterae* y *A. operculatum* producen toxinas hemolíticas lo cual hace que también pertenezcan al

grupo de especies que hacen parte del síndrome de la ciguatera (Tindall y Morton, 1998).

Se identificó a *A. carterae* por la posición y forma del cloroplasto el cual se encontró en la parte media de la célula y se caracterizó por ser denso y multilobulado. Esta especie ha sido registrado en el Golfo de California, en un FAN en la Bahía de La Paz (Gárate-Lizárraga, 2012) y en muestras que se han tomado en la columna de agua (Hernández-Castro, 2017), así como en el Golfo de México (Almazán- Becerril *et al.* 2015).

Desafortunadamente no fue posible confirmar la identificación morfológica con los marcadores moleculares, debido a que aún cuando se obtuvo ADN genómico de buena calidad, este no pudo ser amplificado con los cebadores empleados. Esto puede deberse a mutaciones en las secuencia de ADN donde se anclarían los cebadores, por ende posiblemente sea necesario usar primers específicos para este género.

6.2.4 *Prorocentrum*

El género *Prorocentrum* Ehrenberg, incluye 81 especies marinas tanto planctónicas como bentónicas (Hoppenrath *et al.*, 2009; Guiry y Guiry, 2014), 21 especies se han reportado para el Pacífico Mexicano (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006) y 16 especies en la Bahía de la Paz (Nienhuis, 1979; Gárate-Lizárraga y Martínez-López, 1997; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2009, 2012; Muciño *et al.*, 2015). Son organismos unicelulares de forma ovalada, redonda o piriforme, la pared celular está formada por dos valvas. La valva izquierda es plana, mientras que la derecha tiene forma de “V”. Cada valva está formada por una sola placa sencilla; sin embargo, en el extremo anterior, la región donde emergen los flagelos, esta posee un conjunto de plaquitas (de cinco hasta 14), que pueden separarse totalmente o estar unidas entre sí formando una malla llamada “placa de los poros” en la que se aprecian los dos poros flagelares. Un flagelo es alargado longitudinalmente y el otro es helicoidal. Los principales caracteres morfológicos para identificar a las especies son: la forma

de la células, el tamaño (ancho y largo de la célula), la posición de las espinas apicales, la forma de la teca derecha, el arreglo de los poros en la superficie de la teca, el número y el arreglo de la placas periflagelares (Dodge, 1982; Balech, 1988; Fensome *et al.*, 1993; Faust *et al.*, 1999; Steidinger y Tangen, 1996; Faust y Gullledge, 2002).

A nivel mundial se han registrado 21 especies del género *Prorocentrum* que son consideradas formadoras de florecimientos algales nocivos (FAN) como *P. compressum*, *P. gracile*, *P. triestinum*, entre otras (Faust *et al.*, 1999; Gómez, 2005), de las cuales aproximadamente nueve especies producen toxinas como *P. lima*, *P. minimum*, *P. shikokuense* ; estas especies representan riesgos para la salud de organismos acuáticos y del hombre, y pueden tener consecuencias negativas para la economía local (Steidinger y Tangen, 1996; Faust y Gullledge, 2002; Hoppenrath *et al.*, 2013). En México se han registrado FAN de *P. lima* en la isla El Pardito (Heredia-Tapia *et al.*, 2002)

Especies de *Prorocentrum* se han registrado tanto en habitas bentónicos como planctónicos, por lo general se encuentran en zonas tropicales y subtropicales (Faust, 1991, 1993a, 1993b, 1994, 1997; Faust *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009;). Sin embargo, ha sido evidente que se han incrementado los registros de especies de este género en zonas templadas (Hoppenrath, 2000; Murray *et al.*, 2007; Hoppenrath y Leander, 2008; Chomérat *et al.*, 2011; Hoppenrath *et al.*, 2013). Por esta razón han aumentado los trabajos en donde destaca la caracterización morfológica de este género, el cual presenta una forma ovalada. La teca de *Prorocentrum* consiste en dos placas principales (también conocidos como valvas) que se unen en por un línea de sutura denominada banda intercalar y un conjunto de placas diminutas (5-14) alrededor de dos poros en el área periflagelar dispuesta anteriormente (Fensome *et al.*, 1993; Faust *et al.*, 1999). La clasificación de las especies *Prorocentrum* se ha basado en la forma y el tamaño de la célula, la morfología de superficie de la teca (patrones de ornamentación y de poro), la morfología de la banda intercalar y los detalles arquitectónicos del área periflagelar.

Debido al aumento de información morfológica del mismo taxón en diferentes sitios, Hoppenrath *et al.* (2013) propusieron una nomenclatura estándar para el género a partir de la descripción de 29 especies bentónicas, donde destaca la clasificación de la ornamentación de la teca y la descripción de las placas del área periflagelar.

Dentro de este estudio se identificó morfológica y molecularmente a *P.* cf. *rhathymum*, el cual ha sido identificado dentro de la zona de una forma errónea como *P. mexicanum* (Steidinger, 1983; Faust, 1990; Gárate-Lizárraga y Martínez-López, 1997; Hernández-Becerril *et al.*, 2000), en vez de *P. rhathymum* por esta razón se realizó un estudio en el que se muestra de una forma clara las diferencias morfológicas entre estas dos especies (Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003) (Tabla 4).

Tabla 4. Características morfológicas destacadas que diferencian a *P. mexicanum* y *P. rhathymum*. Tomado de Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003).

| Característica | <i>P. mexicanum</i> | <i>P. rhathymum</i> |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Pirenoide | Grande y centrado | No se observa |
| Zona periflagelar | Espina central | Espina lateral muy pequeña |
| Forma | Más ancha en región anterior | Forma ovalada |
| Forma de vida | Planctónico | Bentónico |

P. rhathymum ha sido registrado en altas densidades en zonas templadas y en zonas tropicales (Garate-Lizárraga y Martinez-Lopez, 1997; Pearce *et al.*, 2005; Aligizaki *et al.*, 2009). En México se ha registrado en el Pacífico, Golfo de California, Golfo de México y Caribe Mexicano. Además Hernández-Becerril *et al.* (2000) reportaron varias especies de *Prorocentrum* en el Pacífico mexicano, así como Okolodkov y Gárate (2006) y Almazán-Becerril (2012).

Dentro de este estudio se identificó morfológicamente a la cepa de *Prorocentrum* como *P. rhathymum*, pero al realizar el análisis BLAST de la

secuencia obtenida con el marcador 28S y las secuencias del GenBank, se obtuvo una mayor similitud con secuencias de *P. mexicanum*. Sin embargo el análisis filogenético mostró que las secuencias de *P. mexicanum* y *P. rhathymum* forman un complejo dado que la distancia genética entre ambas es menor al 1%, siendo este clado el de mayor afinidad a nuestra cepa. Con base a los caracteres morfológicos que señalaron Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003) la especie que se logró cultivar es *P. cf. rhathymum*, además esta fue aislada de una macroalga lo cual concuerda con la forma de vida descrita por este autor la cual es bentónica-epifita además de los caracteres morfológicos mencionados anteriormente (Cohen-Fernández *et al.* 2010, Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán 2003, Glibert *et al.* 2012). Sin embargo, esta especie también se ha logrado aislar a partir de muestras de la columna de agua lo de la Bahía de La Paz (Hernández-Castro, 2017).

6.3 Curvas de crecimiento

Al observar las curvas de crecimiento realizadas fue posible determinar que no hubo una diferencia entre las abundancias presentadas por las dos especies en los dos medios de cultivo, lo cual se pudo comprobar al realizar un análisis de varianza el cual indico con un probabilidad del 95% que no hubo diferencias significativas entre las abundancias obtenidas usando ambos medios de cultivo, tanto de *O.cf. lenticularis* y *C. malayensis*.

Dentro de las curvas de crecimiento

Al comparar las tasas de crecimiento y las máximas abundancias de *O.cf. lenticularis* y *C. malayensis* de este estudio, usando los medios de cultivo GSE diluido y f/2, una temperatura de 24°C y salinidad de 34, se deduce que tales condiciones no son óptimas para el cultivo de este tipo de células. Se han realizado estudios en los que usan otro tipo de medios y mantienen distintas especies de dinoflagelados epifitos en otros rangos de temperatura, mostrando así una mayor tasa de crecimiento e incremento de su abundancia.

Con base en lo anterior Carnicer *et al.* (2016) comprobó que a 28 °C y salinidad de 36 en medio f/2, *O. cf. ovata* presentó una abundancia de 94800 Cel/ mL, mientras

que a una temperatura de 24 °C y salinidad de 38 la abundancia fue de 39700 Cel/mL , así mismo se tomaron los datos de Granéli *et al.* (2011) donde al cultivar *O. ovata* en medio f/1 a 26 °C la abundancia fue de 56700 Cel/ mL, a 28 y 30°C 54100 Cel/ mL con tasas de crecimiento de: 0,53 a 26 °C; 28,059 a 28 °C y 0,74 a 30°C, estos datos permiten inferir que la temperatura cumple un papel muy importante dentro del crecimiento y división celular de los dinoflagelados bentónicos, de esta forma se presentó esta dinámica dentro de cultivos de otras especies que no son las de este estudio pero son de forma de vida bentónica, es posible indicar que pese a que se usa el mismo medio, las tasas de crecimiento dentro de estudio son bajas con las comparadas con otros y esto puede atribuirse a que las condiciones manejadas no son las óptimas para que se presente un mayor crecimiento.

6.4 Análisis de toxinas

Al realizar los análisis de toxinas de *O.cf. lenticularis*, *P. cf. rathymum* y *A. cf. carterae* se mostró que no había registro de toxinas, a pesar que en la literatura se ha mencionado que estas especies son tóxicas y las han asociado a diferentes síntomas que afectan no solo la salud humana, también a otro tipo de organismo marinos. Sin embargo cabe mencionar que pudo haber distintos factores a los cuales se les atribuye la causa de que no se obtuviera como tal la presencia de toxinas en las cepas analizadas.

Diferentes autores ratifican que el efecto de la temperatura junto con la salinidad influyen sobre el crecimiento y la producción de toxinas de diferentes especies de dinoflagelados bentónicos, tales como *O. ovata*, *Ostreopsis* sp. (Tanimoto *et al.*, 2013; Tawon *et al.*, 2015), por lo tanto se ha señalado que una correlación negativa entre la cantidad de toxinas y bajo crecimiento poblacional puede estar ligado a condiciones que no son favorables, tales como la temperatura y concentración de nutrientes (Pezzolesi *et al.*, 2012; Vanucci *et al.*, 2012a). Al cultivar a *O. ovata* a 28°C se registró la mayor concentración de palitoxina, pero al cultivarla a una temperatura de 24°C no se obtuvo un perfil de toxinas (Carnicer *et al.*, 2016).

Ashton *et al.*, (2003), cultivo distintas células de *O. lenticularis*, a temperaturas de 29.5 °C y 31°C, y como resultado, se obtuvo una cantidad elevada de toxinas, a diferencia de aquellas que se cultivaron a 25°C y 26 °C mostraron una cantidad baja o nula de toxinas. Con base en esto se puede inferir que las cepas que se están trabajando en este estudio; *C. malayensis*, *O. cf. lenticularis*, *A. cf. carterae* y *P. cf. rhathymum*, están cultivadas bajo condiciones que no son óptimas, tales como la temperatura la cual influye sobre el crecimiento y producción de toxinas en estas células y por esta razón no se obtuvo un perfil de toxinas de estas especies.

7. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos asociados a las macroalgas pardas *Sargassum horridum* y *Dictyota cervicornis* de la Bahía de La Paz. Fue posible establecer cultivos de dinoflagelados bentónicos epifito bajo condiciones controladas, sin embargo se observaron cambios en su morfología, lo cual indica que es necesario encontrar las condiciones óptimas para su crecimiento.

Las cepas se identificaron mediante características morfológicas y secuencias de la región 28S, 18S y 5.8S del ADNr como *Ostreopsis cf. lenticularis*, con el marcador 28S se confirmó la identidad de *Coolia malayensis* y *Prorocentrum cf. rhathymum* y obteniendo las primeras secuencias genéticas de cepas aisladas de México.

Las curvas de crecimiento no mostraron mayor variabilidad en cuanto a la abundancia presentada durante la fase exponencial en los dos tratamientos, para las dos especies usadas, lo cual indica que no es precisamente los nutrientes lo que influyo sobre el crecimiento poblacional, si no otros factores como la temperatura del medio, la cual está altamente relacionada e influye sobre el crecimiento de la población y la producción de toxinas.

Las cepas de *Amphidinium cf. carterae*, *Ostreopsis cf. lenticularis* y *Prorocentrum cf. rhathymum*, dentro de este estudio bajo condiciones controladas, no presentaron

toxinas lipofílicas. Esto puede atribuirse a las condiciones del medio en el que estaban las cepas y a la baja cantidad de biomasa que se cosecho para llevar a cabo la prueba de toxinas.

8. RECOMENDACIONES

Con referencia a las pruebas moleculares, se podría trabajar con otros marcadores moleculares, pertenecientes a otra subunidad del ADNr para comparar las secuencias obtenidas y así tener mayor veracidad sobre la identificación de las diferentes especies de dinoflagelados epifitos.

Dentro del ámbito eco fisiológico, se pueden establecer experimentos en donde se varíen las condiciones a las cuales se mantienen las cepas e cultivo; temperatura, salinidad, irradiansia, concentración de nutrientes, y así establecer si esto influye sobre el crecimiento poblacional, producción de toxinas, reproducción, entre otros.

Para lograr ver con mayor detalle las características morfológicas de las diferentes especies de dinoflagelados epifitos, ya que haya algunos caracteres diagnósticos; como la forma y tamaño de los poros, forma de las tecas sulcales, forma del poro ventral, se podría usar microscopia electrónica.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aligizaki, K. y G. Nikolaidis (2006). The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae*, 5(6), 717-730.

Aligizaki, K. y G. Nikolaidis (2008). Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysia* in the Mediterranean Sea. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 9, 75-82

Almazán-Becerril, A. (2000). Estudio taxonómico de algunos dinoflagelados potencialmente tóxicos en el Caribe Mexicano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF. 75 p.

Almazán-Becerril, A., S. Escobar-Morales, G. Rosiles-González, y F. Valadéz (2015). Benthic-epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. *Botanica Marina*, 58(2), 115-128.

Ashton, M., T. Tostenson y Tostenson, O. 2003. The effect of elevated temperature on the toxicity of the laboratory cultured dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* 4: 1-6-

Balech, E. 1980. On thecal morphology of dinoflagellates with species emphasis on cingular and sulcal plates. – *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología Universidad Nacional Autónoma de México* 7: 55-64.

Ballantine, D. L, T. R. Tosteson, A. T. Bardales (1988). Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 119, 201-212.

Bomber, J. W., D. R. Norris y L. E. Mitchell (1985). Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. II. Temporal, spatial and substrate heterogeneity of *Prorocentrum lima*, in: *Toxic Dinoflagellates*, Anderson D. M., White S. W. y Baden D. G. (eds). Elsevier. New York. pp. 45-50.

Campbell P.H. (1973). Studies on brackish water phytoplankton. Tesis de Maestría. University of North Carolina, Sea Grant Publication, UNC-SG-73–07, 403 p.

Carlson R. D. y D. R. Tindall (1985). Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in Virginia Islands, in: *Toxic Dinoflagellates*, Anderson D.M., White S.W. y Baden D.G. (eds). Elsevier. New York. pp. 171-176.

Carlson, R. D. (1984). Distribution, periodicity, and culture of benthic/epiphytic dinoflagellates in a ciguatera endemic region of the Caribbean. Ph.D. dissertation, Southern Illinois University, Carbondale, 308.

Carnicer, O., A. Tunin-Ley, K. B. Andree, J. Turquet, J. Diogène y M. Fernández-Tejedor (2015). Contribution to the genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): molecular, morphologic and toxicity characterization. *Cryptogamie Algologie*, 36(1), 101-119.

Ciminiello, P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G. S. Magno, L. Tartaglione y N. Melchiorre (2006). The genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry*, 78(17), 6153-6159.

Claparède, E. y J. Lachmann (1859). *Études sur les Infusoires et les Rhizopodes*. 2. Mèmories Institute Nationale Gèneve. 6, 261-482.

Cortés-Altamirano, R. y A. P. Sierra-Beltrán (2003). Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 39(1), 221-225.

Delgado, G., C. H. Lechuga-Devéze, G. Popowski, L. Troccoli y C. A. Salinas (2006). Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 54(2), 299-310.

Dodge, J. D. (1975). The Prorocentrales (Dinophyceae).II. Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 71(2), 103-125.

Ehrenberg C. G. (1834). Dritter Beitrag zur Erkenntnis grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*. Aus dem Jahre, 145-336.

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

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

Faust, M. A. (1993a). *Prorocentrum belizeanum* sp. nov., *Prorocentrum elegans* sp. nov. and *Prorocentrum caribbaeum* sp. nov., three new benthic species (Dinophyceae) from a Mangrove Island, Twin Cays, Belize. *Journal of Phycology*, 29, 100–107.

Faust, M. A. (1993b). Three new benthic species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) from Twin Cays, Belize: *P. maculosum* sp. nov., *P. foraminosum* sp. nov. and *P. formosum* sp. nov. *Phycologia*, 32, 410–418.

- Faust, M. A. (1999). Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. *Phycologia*, 38(2), 92-99.
- Faust, M. A. y R. A. Gulledge (2002). Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium*, 42, 1-144.
- Faust, M. A. y S. L. Morton (1995). Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 31, 456-463.
- Fraga, S., A. Penna, I. Bianconi, B. Paz y M. Zapata (2008). *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new non-toxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of Phycology*, 44(4), 1060-1070.
- Fukuyo Y. (1981). Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 47, 967-978.
- Gárate-Lizárraga I. y A. Martínez-López (1997). Primer registro de marea roja de *Prorocentrum mexicanum* (Prorocentraceae) en el Golfo de California. *Biología Tropical*, 45(3), 1263-1271.
- Gómez, F., D. Moreira y P. López-García (2011). Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica*, 21(3), 343-364.
- Hallegraeff, G. M., y C. J. Bolch, (1991). Transport of toxic dinoflagellate cysts via ship's ballast water. *Marine Pollution Bulletin*, 22(1), 27-30.
- Hansen, G. y J. Larsen (1992). Dinoflagellates is danske farvande, in: *Plankton i de indre danske farvande*, Thomsen, H. A. (ed). Havforskning. Miljøstyrelsen. pp. 331.
- Hernández-Becerril, D. U. (1988). Observaciones de algunos dinoflagelados (Dinophyceae) del Pacífico Mexicano con microscopios fotónico y electrónico de barrido. *Investigación Pesquera*, 52(4), 515-529.
- Hillis, D. y M. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*. 66 (4):411-453.
- Holmes J. H., R. J. Lewis y A. W. W. Hoy (1995). *Coolia* toxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Natural Toxins*, 3, 355-362.

Holmes, M.J., N. C Gillespie y R. J. Lewis (1988). Toxicity and morphology of *Ostreopsis* cf. *siamensis* cultured from a ciguatera endemic region of Queensland, Australia. Proceedings of 6th International of Coral Reef Symposium, 3, 49-54.

Hoppenrath M., S. A. Murray, N. Chomérat y T. Horiguchi (2014). Marine Benthic Dinoflagellates-Unveiling their Worldwide Biodiversity. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 276.

Hoppenrath, M. y J. F. Saldarriaga (2008). Dinoflagellates. Version 05 August 2008 (under construction). <http://tolweb.org/Dinoflagellates/2445/2008.08.05> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Hoppenrath, M. (2000). Morphology and taxonomy of *Sinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) including two new marine sand-dwelling species from the North German Wadden Sea. European Journal of Phycology, 35, 153–162.

Jason, S. y P. Hayes. 2006. Molecular taxonomy of harmful algae in ecology of harmful algae, Granéli, E. y Turner, J. (eds) Springer Editorial. Pp 299-309.

Jeong, H. J., W. Yih, N. S. Kang, S. Y. Lee, E. Y. Yoon, Y. D. Yoo y J. H. Kim (2012). First report of the epiphytic benthic dinoflagellates *Coolia canariensis* and *Coolia malayensis* in the waters off Jeju Island, Korea: morphology and rDNA sequences. Journal of Eukaryotic Microbiology, 59(2), 114-133.

Jørgensen, M. F., S. Murray y N. Daugbjerg (2004). *Amphidinium* revisited I. Redefinition of *Amphidinium* (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses. Journal of Phycology, 40(2), 351-365.

Karafas, S., R. York y C. Toma (2015). Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). Harmful Algae, 46, 18-33.

Kofoid, C. A. (1909). On *Peridinium steinii* Jørgensen, with a note on nomenclature of the skeleton of *Peridinidae*. Archiv für Protistenkunde, 16, 25-47.

Kofoid, C. A. (1911). On the skeletal morphology of *Gonyaulax catenata*. University of California Publications in Zoology, 8, 287-294.

Krock, B., U. Tillmann, U. John and A. D. Cembella, 2008. "LC-MS-MS aboard ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic

plankton from the North Sea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(5): 797-803.

Lawrence, F., Triemer, R. E. 1985. A simple technique utilizing Calcofluor White M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.*, No. 21, pp. 662–4.

Leaw, C. P., P. T. Lim, K. W. Cheng y G. Usup, 2010. Morphology and molecular characterization of a new species of thecate benthic dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 46, 162-171.

Leaw, C. P., T. H. Tan, H. C. Lim, S. T. Teng, H. L. Yong, K. F. Smith y R. W. Litaker, 2016. New scenario for speciation in the benthic dinoflagellate genus *Coolia* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 55, 137-149.

Lim, A.S., H. J. Jeog, S. Y. T. Y. Jang, Lee, N. S. Kang, S. Y. Lee, Y. D. Yoo, , N. S. Kim. 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic dinoflagellate *Prorocentrum* cf. *rhathymum* in temperate. *Ocean Sci. J.* (2013) 48(1):1-17

Mohammad-Noor, N., N. Daugbjerg, Ø. Moestrup y A. Anton (2007). Marine epibenthic dinoflagellates from Malaysia, a study of live cultures and preserved samples based on light and scanning electron microscopy. *Nordic Journal of Botany*, 24, 629- 690.

Momigliano, P., L. Sparrow, D. Blair y K. Heimann, (2013). The Diversity of *Coolia* spp. (Dinophyceae Ostreopsidaceae) in the Central Great Barrier Reef Region. *PLoS ONE*, 8, e79278

Murray, S., C. L. C. Ip, R. Moore, Y. Nagahama y Y. Fukuyo (2009). Are proro-centroid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes. *Protist*, 160(2), 245-264.

Murray, S., Y. Nagahama y Y. Fukuyo (2007). Phylogenetic study of benthic, spine-bearing proro-centroids, including *Prorocentrum fukuyoi* sp. nov. *Phycological Research*, 55(2), 91-102.

Nakajima I, Y. Oshima y T. Yasumoto (1981). Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 47, 1029–1033.

Nie D. y C. C. Wang (1944). Dinoflagellata of the Hainan Region. VIII. On *Sinophysis microcephalus*, a new genus and species of Dinophysidae. *Sinensia*, 15, 145–151.

- Norris D. R., J. W. Bomber y E. Balech (1985). Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov., in: Toxic dinoflagellates, Anderson D. M., White A. W., Baden D. G. (eds). Elsevier Science. New York. pp 39–44.
- Okolodkov, Y. B. y I. Gárate-Lizárraga (2006). An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botánica Mexicana*, 74, 1-154.
- Okolodkov, Y. B., F. D. C. M. Virgilio, J. A. A. Castillo, A. C. A. Trujillo, S. Espinosa-Matías y A. H. Silveira (2014). Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, (107), 121-151.
- Murata *et al.*, 1987
- Okolodkov, Y. B., G. Campos-Bautista, I. Gárate-Lizárraga, J. A. G. González-González, M. Hoppenrath y V. Arenas (2007). Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 47(3), 223.
- Penna, A., M. Vila, S. Fraga, M. G. Giacobbe, F. Andreoni, P. Riobó, y C. Vernesi (2005). Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean sea based on morphology, toxicity and Internal Transcribed Spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 41(1), 212-225.
- Penna, A., S. Fraga, C. Battocchi, S. Casabianca, M. G. Giacobbe, P. Riobó y C. Vernesi (2010). A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography*, 37(5), 830-841.
- Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L. y Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC–MS and biological assays. *Water Res.* 46 (1), 82–92.
- Pin, L. C., L. P. Teen, A. Ahmad, y G. Usup (2001). Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Marine Biotechnology*, 3(3), 246-255.

Popowski, G., J. N. Álvarez-Cadena, G. Delgado y M. Sánchez. 2002. Inventario de la flora microfitorplanctónica de la Laguna Bojórquez, Caribe Mexicano. *Revista de Investigaciones Marinas*, 23 (3), 173-178.

Quod, J. P. (1994). *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new toxic Dinoflagellate from coral reefs in the South West Indian Ocean. *Cyptogamie Algologie*, 15, 243–252.

Quod, J. P., L. Ten-Hage, J. Turquet, G. Mascarell y A. Couté. (1999). *Sinophysis canaliculata* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic dinoflagellate from western Indian Ocean islands. *Phycologia*, 38(2), 87-91.

Rhodes, L. L., K. F. Smith, R. Munday, A. I. Selwood, P. S. McNabb, P. T. Holland y M.Y. Bottein (2010). Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands. *Toxicon*, 56(5), 751-758.

Rhodes, L., K. Smith, G. G. Papiol, J. Adamson, T. Harwood y R. Munday (2014). Epiphytic dinoflagellates in sub-tropical New Zealand, in particular the genus *Coolia* Meunier. *Harmful Algae*, 34, 36-41.

Schmidt, J. (1902). Flora of Koh Chang. Contribution to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Part IV. Peridiniales. *Journal de Botanique de la Société Botanique de France*, 23, 212-218.

Tamura, M., S. Shimwia y T. Horigucki (2005). *Galeidinium rugatum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), a new coccoid dinoflagellate with a diatom endosymbiont. *Journal of Phycology*, 41(3), 658-671.

Taylor, F. J. R. (1987). *The Biology of Dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications, 785.

Ten-Hage, L., J. Turquet, J. P. Quod y A. Couté (2000a). *Coolia areolata* sp. nov. (Dinophyceae), a new sand-dwelling dinoflagellate from the southwestern Indian Ocean. *Phycologia*, 39(5), 377-383.

Tindall D. R. y S. L. Morton (1998). Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera, in: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, Anderson D. M., Cembella A. D., Hallegraeff G. M. (eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences 41. Springer-Verlag. Berlin. pp. 293–313.

Yasumoto, T., A. Inoue, O. Tadashi, K. Fujimoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo, R. Adachi y R. Bagnis (1980). Environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 46, 1397–1404.

Yasumoto, T., I. Nakajima, Y. Oshima y R. Bagnis (1979). A new toxic dinoflagellate (Algae, Gambier Islands) found in association with ciguatera (Ciguatoxin, maitotoxin,