

DISEÑO DE UN MÉTODO MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE COMUNIDADES DE FITOPLANCTON TÓXICO Y NOCIVO.

Angélica Herrera Sepúlveda, Arturo P. Sierra Beltrán y Norma Y. Hernández Saavedra*
CIBNOR, S. C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 128, La Paz, B.C.S.
23090, México. Tel: (52)(612)1238484. Fax: (52)(612) 1253625. nhernan04@cibnor.mx

Palabras clave: ADNr, Dinoflagelados, métodos moleculares.

Introducción. La relevancia del estudio de las floraciones algales nocivas (FAN), deriva del aumento registrado en el número y frecuencia de dichos eventos en las diferentes zonas costeras del océano mundial (1). Dentro de este contexto, se han enfocado esfuerzos en el establecimiento de sistemas de monitoreo ambiental y biológico en diferentes países. El método clásico para la detección y enumeración de especies formadoras de FAN, es la observación directa de material vivo o fijado, mediante microscopía de luz. Sin embargo, este proceso es tedioso y lento, y requiere de taxónomos expertos (2). Para resolver este problema, en los últimos años se ha incrementado la atención de la comunidad científica en el uso y desarrollo de técnicas moleculares basadas principalmente en el ADN ribosomal (ADNr), para la o las especies de interés. El objetivo del trabajo fue Diseñar herramientas para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo como propuesta para el monitoreo de floraciones algales nocivas en las costas del estado de Baja California Sur.

Metodología. Los organismos comprendidos en este estudio fueron 12 especies de dinoflagelados, pertenecientes a los ordenes: Gonyaulacales (*Alexandrium affine*, *Alexandrium margaleffi*, *Gonyaulax spinifera*, *Gonyaulax turbiney* y *Lingulodinium polyedrum*), Procentrales (*Prorocentrum lima*, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum mexicanum*) y Gymnodiniales (*Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum* -2 variedades- y *Cochlodinium polykrikoides*). El ADN total se extrajo mediante modificaciones al método descrito por Doyle y Doyle (1990) (3) y la amplificación de regiones específicas del ADNr se realizó mediante PCR utilizando cebadores universales para dos niveles de especificidad taxonómica (4) (dominio Eukarya y clase Dinophyceae) de acuerdo al mapa mostrado en la figura 1.

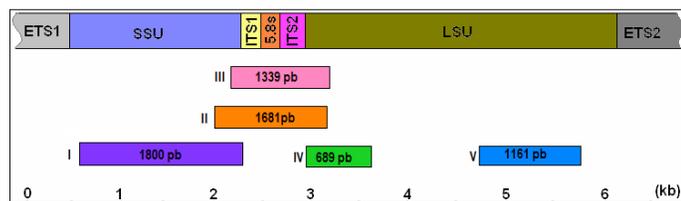


Figura 1. Representación esquemática del ADNr, que muestra la posición relativa de los amplicones generados usando diferentes combinaciones de cebadores.

Las secuencias obtenidas se utilizaron para llevar a cabo el diseño de sondas de hibridación y cebadores aplicables a la técnica SSCP.

Resultados y discusión. Las secuencias obtenidas se confrontaron con las bases de datos mundiales para determinar, excluir o confirmar la especie, según sea el caso. Con los cebadores que flanquean la región SSU-ITS-LSU, se confirmó 1 especie (*C. polykrikoides*), mientras que se generaron 54 nuevos registros para las especies *A. affine*, *A. margaleffi*, *G. spinifera*, *G. turbiney*, *L. polyedrum*, *P. lima*, *P. minimum*, *P. mexicanum*, *A. sanguinea*, y *G. catenatum* -2 variedades-. Se realizaron análisis de alineamiento (programa DNAMAN) para ubicar tanto regiones variables como conservadas de las diversas regiones génicas analizadas. Finalmente, se diseñaron 3 parejas de nuevos cebadores, aplicables al formato de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o blotting y 2 al formato de SSCP. Se llevaron a cabo análisis *in silico*, en donde se determinó un porcentaje de éxito superior al 88%.

Conclusiones. Las regiones que corresponden al primer tercio del SSU, ITS1 e ITS2, presentaron el polimorfismo suficiente que permite la discriminación entre las especies estudiadas, permitiendo así el diseño de métodos moleculares para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo. La información generada a partir de las 54 secuencias nucleotídicas consideradas como nuevos registros tiene potencial aplicación en estudios de: evolución molecular, biogeografía, filogenia, genética de poblaciones, identificación de fitoplancton, etc.

Agradecimiento. Al CONACyT por la beca 205502.

Bibliografía. 1. Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol.*, 32:79-99. 2. Miller P y Scholin C (1998) Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J. Phycol.*, 34:371-382. 3. Doyle J y Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15. 4. Edvarsen B, Shalchian-Tabrizi K, Jakobsen K, Medlin L, Dahl E, Brubak S y Paasche E (2003) Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.*, 39: 395-408.