

OBTENCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN RIBOSOMAL DE DINOFLAGELADOS RESPONSABLES DE EVENTOS DE MAREAS ROJAS EN MÉXICO.

Lilí Esmeralda Gallo-Ramírez, Arturo P. Sierra-Beltrán y Norma Y. Hernández-Saavedra*
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. Laboratorio de Genética Molecular.
Mar Bermejo 195. Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz 23090, B.C.S. Fax: 6121253625
e-mail: nhernan@cibnor.mx

Palabras clave: Mareas rojas, dinoflagelados, ADN ribosomal.

Introducción: Las mareas rojas son fenómenos naturales frecuentes que resultan en pérdidas en la actividad pesquera y en problemas de salud pública por la ingesta de moluscos y peces contaminados. En México, se han presentado prácticamente en todas las costas, siendo *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compresum* y *Karenia brevis* las principales especies relacionadas con casos de envenenamiento en humanos y mortandad de peces [1]. Otras especies como *Cochlodinium catenatum* (*C. polykrikoides*) y *Noctiluca scintillans* también han sido relacionadas con mortandades de peces silvestres [2]. Ante estos eventos, sólo es posible tomar medidas que prevengan la comercialización y/o consumo de productos contaminados. Sin embargo, actualmente los incipientes sistemas de monitoreo implementados para tal fin se basan principalmente en la identificación taxonómica, lo que demanda personal especializado y tiempo, lo que muchas veces evita la alerta oportuna de dichos eventos. En este trabajo, se presenta el empleo de las secuencias ribosomales 16S y 5.8S para la detección e identificación de estos organismos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers diseñados a partir de las secuencias consenso de las secuencias reportadas para *Prorocentrum micans* [3].

Metodología: Mediante la técnica de clonación y a partir de muestras de agua de mar, se establecieron cultivos de algunos géneros de dinoflagelados. Para la extracción de ADN de muestras fijadas con lugol derivadas de eventos tóxicos (*Cochlodinium catenatum* -*C. polykrikoides*-, *Pyrodinium bahamense*, *G. catenatum* y *Noctiluca scintillans*) se aplicó la técnica de Chelex [4] y el calentamiento con tampón de lisis [5]. Para la amplificación de regiones específicas mediante PCR se utilizaron los oligos Hab 9 y Hab 10 (forward y reverse, respectivamente). Los productos de PCR se ligaron al vector pCR2.1, para posteriormente transformar células de *Escherichia coli* TOP10, de las que se extrajo el ADN plasmídico para posteriormente secuenciar en un equipo AbiPrism (Perkin Elmer) utilizando los primers M13 (forward y reverse) cuyas secuencias se encuentran incluidas en el vector. La identificación y el análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa Blast disponible en línea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y el software DNAMAN (Lynnon Biosoft).

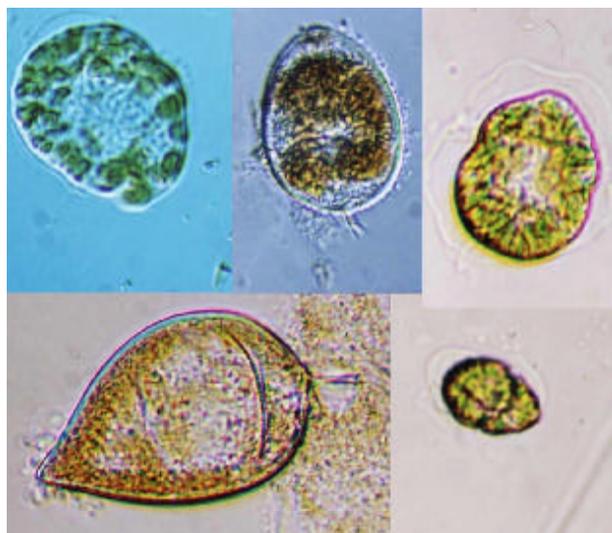


Figura 1. Microfotografías de algunos de los cultivos utilizados en el presente trabajo: *Gymnodinium* sp. y *Prorocentrum* sp.

Resultados y discusión: A la fecha se han establecido exitosamente en el laboratorio cultivos de *Prorocentrum* sp. y *Gymnodinium* sp. en medio F/2 (figura 1). A partir de las preparaciones de ADN, se han obtenido amplificadores de alrededor de 1.7 kb de *Gymnodinium catenatum*, que corresponden al tamaño esperado de acuerdo a la posición de los oligos Hab 9/Hab 10 en el genoma de *Prorocentrum micans*. Aunque se han obtenido amplificadores inespecíficos con las otras especies de dinoflagelados consideradas en este estudio, actualmente se está trabajando en la optimización de las condiciones de amplificación para mejorar la resolución y rendimiento de los mismos.

Bibliografía: [1] Cortes Altamirano R, Hernandez Becerril DU and Luna Soria R, 1996. In: Yasumoto T, Oshima Y and Fukuyo Y (eds) Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, Paris, 101-104. [2] Cortés-Altamirano R, Cortés-Lara MC y Sierra-Beltrán AP, 2003. Harmful Algae News, 24 (in Press). [3] Lenaers G, Maroteaux M, Michot B and Herzog M, 1989. J. Mol. Evol. 29: 40-51. [4] Walsh PS; Metzger D and Higushi R, 1991. Bio-Techniques, 4: 506-513. [5] Usup G, Pin LC, Ahmad and Teen LP, 2002. Harmful Algae, 1: 59-68.