



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALA

**Estudio morfométrico y taxonómico de dinoflagelados del
género *Ceratium* (*Neoceratium*), con énfasis en *N.*
balechii.**

TESIS
Que para obtener el grado de
Maestro en Biología
PRESENTA

Hbiol. ADRIANA HERNÁNDEZ ROSAS.

23-02-2011

“La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al padrón de postgrados de excelencia del CONACYT”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis que presentó.

ADRIANA HERNÁNDEZ ROSAS.

El día 23 de Febrero del 2011.

Comité Tutorial

Dra. María Esther Meave

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dr. Manuel Castillo Rivera.

M. en C. María Guadalupe Figueroa Torres.

M. en Sc. Maribelle Vargas Montero

DEDICATORIAS

Dedicada especialmente a Fran por ser la mamá más amorosa y comprensiva que Dios pudo darme, por ser el motor de mi vida y enseñarme que lo más importante es finiquitar los compromisos tomados aunque haya miles de obstáculos.

A mi hermana Vero por enseñarme que no existe nada que impida lograr lo que uno desea y propone.

A mis Sobrinos quienes me muestran día a día que somos simples y llanos mortales.

A mis Hermanos que siempre me han apoyado e impulsado a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi COMITÉ TUTORAL por el apoyo brindado en esta etapa de mi formación académica.

A Ma. Esther por sus enseñanzas, la confianza depositada en mí y su apoyo incondicional durante la realización de la tesis.

A Francisco Fernández Perrino por su paciencia y dedicación, además de su amistad.

Al Dr. Manuel Castillo por la revisión en la parte estadística.

A Maru, Maribelle , Monik y Ale por la ayuda en la obtención y procesamiento de material biológico.

Al Dr. Alejandro Zavala por su ayuda en los trámites.

Al anterior y actual comité de la maestría.

RESUMEN

Los estudios morfométricos permiten identificar caracteres que ayuden a la delimitación de especies. Esto es poco usado en el estudio de los Dinoflagelados ya que al ser organismos microscópicos la obtención de las medidas resulta un tanto complicada y requiere de un gran trabajo.

A través de una serie de estudios anteriores realizados en los géneros *Ornithocercus* y *Prorocentrum*, vinculados entre si por el proyecto “Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacífico Mexicano” financiado por el CONACYT, se ha destacado la gran importancia de estos estudios. Y del cual se desprende también esta tesis, cuya finalidad es obtener caracteres morfológicos y secuencias del espaciador interno transcrito (ITS) que hagan posible la delimitación entre un complejo de especies del género *Neoceratium*.

Se hizo un estudio morfométrico con ejemplares de *Neoceratium balechii* f *longum* y f *balechii*, *N. longipes* y *N. divaricatum*, considerándose ocho caracteres continuos en 1022 organismos: longitud total (lt), transdiámetro (t), longitud del cuerno apical (lca) y antapicales (lci y lcd), distancia entre cuernos antapicales (dseca) y distancia entre base de la hipoteca y cuernos antapicales (dbhc). Estos fueron analizados con técnicas estadísticas bi y multivariada como: Análisis de varianza (ANOVA), Dendograma (cluster), Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de discriminantes (AD) usando el programa NCSS; para conocer la variación, importancia y valor diagnóstico en la delimitación de especies. Para la obtención de las ITS se procedió a realizar protocolos de acuerdo a la técnica “single cell PCR” descrita por diferentes autores usando los cebadores F 5' CGT AGG TGA ACC TGC GGA

AGG ATC A 3'; **R** 5' TTC CCT GTT CAC TCG CCG TTA CT 3' y **A** 5'-CCA AGC TTC TAG ATC GTA ACA AGG(ACT) TCC GTA GGT-3'; **B** 5'-CCTGCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA(AG) TTCAG C(AG)GG-3'.

Todos los caracteres mostraron diferencias significativas interespecíficas ($P's < 0.0005$). El ACP tuvo una varianza acumulada del 90% con las tres primeras componentes siendo las variables que aportan mayor información lca, dseca, t, lcizq, rc. El AD mostró que existen diferencias significativas interespecíficas para las tres primeras funciones ($P's < 0.00005$ y $\lambda Wilks = 0.42759$), las variables morfológicas dbhc, lcder, lcizq y rc tuvieron la mayor contribución para la separación de las especies. Y en la separación de las formas de *C. balechii* las variables más importantes fueron lt, lca y dseca.

Por lo que se concluye que las especies *N. balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes* son diferentes y distintas. Que los ocho caracteres utilizados son suficientes y diagnósticos para la delimitación de estas especies. Y aunque las formas de *N. balechii* estadísticamente presentan diferencias significativas, se apoya la hipótesis de que ambas formas son conespecíficas e independientes de otros taxa ya que los caracteres por los cuales se separan responden principalmente al tamaño de estas. Debido a que las secuencias de las regiones de ITS no se pudieron obtener este estudio muestra la gran importancia que tiene la aplicación de un buen estudio morfométrico.

ABSTRACT

The morphometric study is a tool for delimitation of species, however in Dinoflagellates is complicated and demand a big labour under microscopy. Works previous about *Ornithocercus* and *Prorocentrum* genus, both they are part of the "Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacifico Mexicano" proyect, who is funded by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and who point the importance about morphometric studies. This research about some species complex is part of this proyect too, which aims to obtain morphological characters and the internal transcribed spacer (ITS) region that enable the distinction between a complex of species of the genus *Neoceratium*.

N. balechii, *N. divaricatum* and *N. longipes* was included in a morphometric study use eight continuos characters in 1022 organism: length total (lt), transdiameter (t), apical horn length (lca), both antapical horns length (lcter and lctzq), distance between both horns antapical (dseca) and distance between hipotecal base to cingulum (dbhc). Analysed with statistics technical (bi and multivariate): Analysis of Variance (ANOVA), Dendrogram (Cluster), Principal Components Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA) with NCSS program. The finality of use this analysis are to know variation, importance and diagnosis value of importance of characters on delimitation of species. To obtain ITS protocol was performed according to the technique "single cell PCR"described by different authors using primers F 5 'CGT AGG TGA ACC TGC GGA AGG ATC A 3', R 5 'TTC CAC CCT GTT CCG TTA TCG CT 3 'and 5'-A AGC CCA GTA ATC ACA TTC TAG AGG

(ACT) TCC GTA GGT-3', 5'-CCTGCAGTCGACA B (TG) ATGCTTAA (AG) TTCAG
C (AG) GG-3'.

All characters had statistic signification with $P's < 0.0005$. DA show statistic signification with three first discriminant functions ($P's < 0.00005$ y $\lambda Wilks = 0.42759$), variables more important in species separation are dbhc, lcder, lcizq y rc. While lt, lca y dseca are the most important in separation forms of *C. balechii*.

It is concluded that the species *N. balechii*, *N. divaricatum* and *N. longipes* are different and distinct. The eight characters used are sufficient and diagnostics for the delimitation of these species. Although the forms of *N. balechii* statistically significant differences, supporting the hypothesis that both forms are independent of other conspecific taxa because the characters are separated by which respond mainly to the size of these. Because the sequences of ITS regions were unable to obtain this report shows the great importance of the implementation of a large morphometric study.

INDICE.

Jurado.....	III
Dedicatorias.....	IV
Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VIII

1. Introducción

Generalidades de Dinoflagelados.....	3
Género <i>Ceratium</i>	4
Justificación.....	11

2. Antecedentes.....

3. Objetivo General.....

4. Objetivos Particulares.....

5. Hipótesis.....

6. Área de estudio.....

7. Material y Método.

Obtención de material biológico.....

Obtención de datos morfométricos.....

Análisis morfométrico

Delimitación de taxa.....

Sucesión de formas de *Ceratium balechii*.....

Comportamiento regional de <i>Ceratium balechii</i> en el Pacifico Oriental.....	27
Análisis Molecular	
Aislamiento de material usado en la técnica de PCR.....	28
Procesamiento de material.....	30
Condiciones de amplificación.....	31
8. Resultados.....	32
Análisis morfométrico	
Sobre los taxa.....	40
Sucesión de formas.....	53
Sobre comportamiento regional de <i>Ceratium balechii</i> en el Pacifico Oriental	61
Análisis Molecular.....	64
9. Discusiones.....	65
10. Conclusiones.....	76
11. Perspectivas.....	78
12. Referencias.....	80

1. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE DINOFLAGELADOS.

Los dinoflagelados son, después de las diatomeas, el segundo grupo más importante responsable de la producción primaria del microplancton en el ambiente marino (Graham & Wilcox, 2000). En conjunto son los productores de la mayor cantidad de materia orgánica que fluye hacia los niveles superiores en la red trófica de los ambientes marinos (Falkowski *et al.*, 2004; Fenchel, 1988). Asimismo, pertenecen a uno de los grupos más antiguos dentro del fitoplancton marino (aunque existen representantes de agua dulce), teniéndose registros fósiles de quistes a partir del Cenozoico y Mesozoico (Fensome *et al.*, 1993); estos registros fósiles junto con los representantes vivientes presentan una gran diversidad morfológica, con alrededor de 4000 especies, entre fósiles y vivientes (Fensome *et al.*, 1993) distribuidos en más de 550 géneros (Graham & Wilcox, 2000).

Las células de los dinoflagelados presentan una pared llamada anfiesma, que en organismos tecados presenta capas laminares con celulosa, vesículas tecales y microtúbulos, conformando placas que forman la teca. El número y arreglo de las placas es particular y constante en los órdenes y géneros y por ello constituyen características taxonómicas importantes (Fensome *et al.*, 1993; Lee, 1999; Balech 1988 y Graham & Wilcox 2000). Debido a su adaptación a la vida pelágica planctónica, los dinoflagelados presentan un par de undulipodia (flagelos) que de acuerdo a su inserción (apical o transversal) le confiere la condición desmoconte o

dinoconte a los organismos de este grupo. Así como una gran variedad de apéndices y ornamentaciones tales como: espinas, cuernos, velos, poros, radios, etc. que también llegan a tener importancia taxonómica (Schiller 1933, Taylor, 1976, Balech 1988, Fensome *et al.*, 1993, Steidinger, 1996). Ultraestructuralmente los dinoflagelados presentan una variedad de organelos, algunos de ellos particulares como los cloroplastos que son indicativos de la simbiosis que han tenido con otros protistas (Schnepf & Elbrächter 1999), la púsula que juega un papel importante como osmorregulador y el núcleo, llamado Dinokarion, caracterizado porque incluso durante la interfase los cromosomas se encuentran condensados y en la mitosis la pared permanece intacta. Además el ADN no está asociado con histonas por lo que confiere la condición de mesocarionte a todo el grupo (Dodge, 1965; Taylor, 1976; Steidinger, 1996, Cavalier-Smith, 2004).

GÉNERO *Neoceratium* (*Ceratium*) F. Gómez, D. Moreira et P. López-García, *gen. Nov.*

Los organismos del género *Neoceratium* antes *Ceratium*, pertenecen al grupo de los dinoflagelados tecados, dentro del orden de los Gonyaulacales. A nivel mundial el género *Neoceratium* es uno de los más numerosos contando con 162 especies registradas, incluyendo sinonimias (Gómez, 2005). De igual forma en la zona del Pacífico Mexicano es uno de los géneros más diversos, reportándose un total de 97 especies de este género (Meave *et al.*, 2006).

Los organismos *Neoceratium*, generalmente se encuentran en forma solitaria, aunque durante la división celular (desmoquisis) las células hijas pueden mantenerse unidas a través de la porción proximal del cíngulum de una célula y la punta del cuerno apical de otra, llegando a formar cadenas (Taylor, 1987). En estos organismos el cuerpo se encuentra dorsoventralmente comprimido, en la parte media un canal llamado cíngulum separa la célula en dos regiones, denominadas epiteca (porción apical) e hipoteca (porción antapical). Esta última presenta otro canal llamado sulcus, que se ubica en la parte ventral del organismo y es un área profundamente excavada que cubre la mayor parte de la hipoteca y una parte de la epiteca (Balech, 1988). Las especies de *Neoceratium* generalmente presentan un cuerno en la epiteca denominado cuerno apical y dos cuernos en la hipoteca denominados cuernos antapicales. Las placas de la teca del género presentan la siguiente fórmula tabular: 1 placa del poro (Po), 4 placas apicales (4'), 6 placas precingulares (6''), 6 placas postcingulares (6'''), 2 placas antapicales (2''''), 5 placas cingulares (5c) y 4 placas sulcales (4s). Las 4 placas apicales dan origen al cuerno apical, mientras que la 4ª y 5ª placa postcingular dan origen al cuerno antapical derecho y la 1ª y 2ª postcingular al cuerno antapical izquierdo (Fensome *et al.*, 1993; Balech, 1988; Tomas 1997). Recientemente Gómez *et al.* (2009) erigieron al género *Neoceratium* para transferir a todas las especies marinas anteriormente ubicadas en el género *Ceratium* debido a la presencia de 5 placas cingulares en lugar de 6, quedando adscritos al género *Ceratium*.

El metabolismo de los *Neoceratium* frecuentemente es referido como anfitrofo o mixótrofo (Smalley & Wayne, 2001), llamados así porque combinan los metabolismo autótrofo con uno heterótrofo, ya que es común que en su dieta alimenticia consuman otros organismos que son atrapados a través de redes citoplásmicas, llamadas *pallium*, que emergen del sulcus (Gaines & Elbrachter, 1987; Jeng Chang *et al.*, 1994). Tal anfitrofismo los ha llevado a tener éxito adaptativo en aguas tropicales donde los nutrientes son escasos; y posiblemente ésa sea la causa de que sólo algunas especies se pueden mantener como un cultivo estable dentro de un laboratorio (Guillard & Morton, 2003). Al no conocerse el ciclo de vida completo de estos organismos también se desconoce parte de la variación de los caracteres morfológicos, lo cual podría resultar en una sub o sobrevaloración de los caracteres taxonómicos, guiando a una errónea identificación de las especies.

Para el género *Neoceratium* se utilizó la clasificación del esquema propuesto por Fensome *et al.*, (1993) y Gómez *et al.*, (2009), quienes colocan al género dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

División Dinoflagellata (Bütschli) Fensome *et al.*

Subdivisión Dinokaryota Fensome *et al.*

Clase Dinophyceae Pascher

Subclase Peridiniphycidae Fensome *et al.*

Orden Gonyaulacales F. J. R. Taylor

Suborden Ceratiineae Fensome *et al.*

Familia Ceratiaceae Willey y Hickson

Género *Neoceratium* F. Gómez, D.

Moreira et P. López-García, *gen.*

Nov. (*Ceratium* Schrank).

Dado el alto número de especies encontrado en el género y la variedad de forma de los organismos, desde su inicio fue subdividido en subgéneros, considerándose en este caso las propuestas de Taylor (1976) y Balech (1988). Tomándose como válidos cuatro subgéneros: *Archaeceratium*, *Ceratium*, *Amphiceratium* y *Tripoceratium*, este último dividido a su vez en seis Secciones: Densa, Macrocera, Palmata, Platycornia, Reflexa y Tripos.

En el género *Neoceratium* los caracteres más importantes que se han considerado para el reconocimiento y la delimitación de las especies son: la forma y dimensiones del cuerpo celular, la orientación y dimensión de los cuernos, y las proporciones en la longitud de los cuernos, la longitud total de la célula dividida entre el transdiámetro (Steidinger & Tangen, 1996) y la longitud del cuerno antapical dividida entre el transdiámetro (López, 1966; Figura 1).

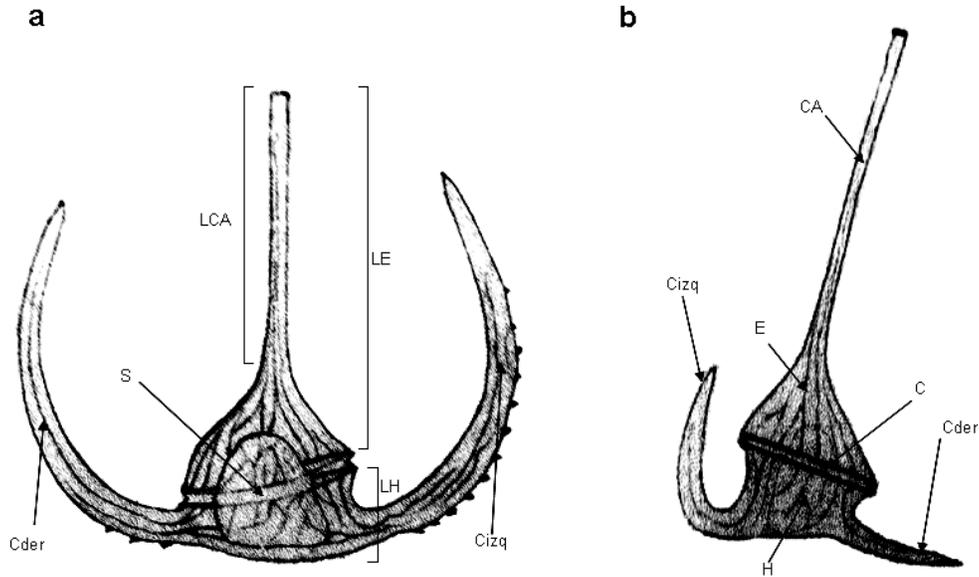


Figura 1. Algunos caracteres considerados para la identificación de especies del género *Neoceratium*. Figuras de *N. tripos* modificadas de Berg (1881). a) vista ventral y b) vista dorsal . LE (longitud epiteca), LH (longitud hipoteca), LCA (longitud cuerno apical), Cder (cuerno antapical derecho), Cizq (cuerno antapical izquierdo), S (sulcus), CA (cuerno apical), E (epiteca), H (hipoteca) y C (cingulum).

Aunque la fórmula de la teca y la forma de las placas son características importantes para el estudio de los dinoflagelados tecados de los órdenes Gonyaulacales y Peridiniales, en el género *Neoceratium* las placas son tenues y se destruyen con facilidad, razón por la que este carácter ha sido excluido de los análisis taxonómicos a nivel de especie (Balech, 1988). Sin embargo Gómez *et al.*, (2009) muestran la importancia que tienen las placas especialmente las del cingulum en la diferenciación de especies de agua dulce y marina, separando a estas en dos géneros *Ceratium* y *Neoceratium* respectivamente.

Un análisis taxonómico usado para obtener los caracteres importantes en la delimitación de las especies es el análisis morfométrico. El cual se basa esencialmente en el análisis de los datos morfológicos merísticos (caracteres cuantitativos continuos) de varios organismos pertenecientes a diferentes poblaciones de una especie para reconocer aquellos caracteres que no se encuentran relacionadas entre sí (independientes), evaluar su variación y reconocer las diferencias entre distintas entidades taxonómicas con la ayuda de herramientas estadísticas. Dentro de esta temática han incursionado autores como Steemann (1934), López (1966), Yarranton (1967), Meave *et al.*, (2003), Hernández-Rosas *et al.*, (2007) y Cohen Fernández, 2011 intentando aclarar la problemática de delimitaciones de determinadas especies y la sistemática del género.

El género *Neoceratium* presentan variación morfológica intrínseca y la existencia en este grupo de los llamados complejos de especies, en los cuales los distintos taxa son difíciles de delimitar o agrupar mediante caracteres morfológicos y datos morfométricos debido a sus fuertes traslapes, evidencian que pueden tratarse de taxa en proceso de especiación. Es importante que tanto la clasificación como la delimitación de especies se respalden hoy día tanto con la morfología como con datos de secuencias moleculares de ciertas regiones del ADN (Fensome *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2009; Tilman *et al.*, 2010).

Los análisis de las secuencias han resultado ser eficaces para medir la variación genética de las especies de un mismo género (Adachi *et al.*, 1994; Grzebyk *et al.*,

1998; Scholin, 1998; Gi Young *et al.*, 1999; Daugberg *et al.*, 2000; Edvardsen *et al.*, 2003, Band-Schmidt *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2004), en especial el uso de las secuencias espaciadoras internas transcriptas (ITS siglas en inglés), que han sido una fuente importante en la diferenciación de las especies ya que muestran regiones no codificantes y por ello su tasa de variabilidad es mayor (Gi Young *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001) ayudando a delimitar variedades.

Del género *Neoceratium* (*Ceratium*) se han utilizado pocas especies en estudios moleculares en comparación con otros géneros, como *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Dinophysis* que por ser tóxicos han preocupado más al sector económico y de salud pública, existiendo en la base de datos del GenBank secuencias únicamente de 26 especies de *Ceratium* (ahora considerado como *Neoceratium*) entre ellos se encuentran *Ceratium furca*, *C. fusus*, *C. hirundinella*, *C. horridum*, *C. lineatum*, *C. longipes*, *C. tenue*, *C. tripos*, *C. sp.*, *Ceratium arietinum*, *C. azoricum*, *C. candelabrum*, *C. concilians*, *C. contrarium*, *C. declinatum*, *C. euarcuatum*, *C. extensum*, *C. furca*, *C. fusus*, *C. gravidum*, *C. hexacanthum*, *C. horridum*, *C. kofoidii*, *C. limulus*, *C. massiliense*, *C. minutum*, *C. paradoxides*, *C. pentagonum*, *C. petersii*, *C. symmetricum*. Dentro de esta lista se cuentan con datos de secuencias de regiones de la sub-unidad pequeña (SSU) y la sub-unidad grande (LSU) y solo existen datos de secuencias de ITS para la especie *C. fusus* (GenBank).

JUSTIFICACIÓN

En el estudio del género *Neoceratium* se han reconocido una serie de problemas para delimitar a las especies, ya que al existir pocos caracteres morfológicos y en los cuales además se presenta una alta variabilidad, que se ha especulado se encuentra relacionada con factores ambientales tales como la temperatura de la columna de agua, fenómeno conocido como pleomorfismo, como lo plantea Meave *et al.*, (2003). Donde las poblaciones de esta especie llegan a transformarse en conjunto a lo largo de las distintas épocas del año, proceso denominado por Margalef (1974) como ciclomorfismo. Por ello la temperatura del agua, condicionante principal, y los nutrientes influyen en la presencia o ausencia de ciertas especies en sitios y épocas determinadas, también influyen en la forma de los organismos que conforman dichas poblaciones.

Una problemática de este tipo la encontramos en el complejo de especies que conforman a *Neoceratium balechii* (formas) (Meave, Okolodkov *et* Zamudio) F. Gómez, D. Moreira *et* P. López-García y *N. divaricatum* (Kofoid) F. Gómez, D. Moreira *et* P. López-García. Porque debido a sus semejanzas existe una disputa taxonómica en cuanto a su validez (Hernández-Becerril & Alonso-Rodríguez, 2004), ya que ambas especies se encuentran registradas para el Pacífico Oriental aunque en diferentes regiones en ambas además su morfología se encuentra regida a fenómenos propios del género como lo es la autotomía en el género *Neoceratium* (reducción del tamaño de sus cuernos en aguas más frías) debido a que a mayor densidad del agua no se requiere de largos apéndices para retrasar la sedimentación (Kofoid, 1908). En el mismo contexto se incluyó a *N. longipes*

que es una especie que comparte caracteres con *N. divaricatum* tanto en morfología y dimensiones, que se desarrolla en ambientes con características ambientales similares pero su distribución se describe es para el Océano Atlántico (Wiktor *et al.*, 1990).

En este complejo de especies (*N. balechii* - *N. divaricatum*) los taxa comparten características como la reducción a muñón de todos sus cuernos (antapicales y apical), además, cabe señalar que cuando ocurre este proceso no es posible observar la forma y su dirección, característica que como se ha mencionado es importante para la identificación y delimitación de especies en el género.

Por lo que en este trabajo se pretendió indagar sobre la variabilidad de la especie, aclarar e intentar resolver dicha problemática taxonómica en *N. divaricatum*, mediante un estudio sobre la variación morfológica y genética de la especie *N. balechii*.

2. ANTECEDENTES

Recientemente se erigió una nueva especie, *Neoceratium balechii* (Meave del Castillo *et al.*, 2003), para el Pacífico Tropical Mexicano (PTM), al cual se le realizó un estudio morfométrico que incluyó 22 caracteres cuantitativos, encontrando que los más importantes para la delimitación eran la longitud total del organismo, el transdiámetro, la distancia entre los cuernos y la longitud de los cuernos antapicales. Reconociéndose dos formas para la especie, relacionadas con la temperatura del agua: *N. balechii* f. *balechii* (ejemplares cortos y robustos) y

N. balechii f. *longum* (ejemplares esbeltos y alargados) (Meave *et al.*, 2003), pudiendo presentar ambas formas cuernos cortos y largos.

Neoceratium balechii era una especie ampliamente estudiada y colectada por diversos autores, incluso se presenta en el ambiente natural formando florecimientos o mareas rojas y la cual puede llegar a ser nociva para los organismos del ambiente en el que se desarrolla como ocurrió en Mazatlán, Sin. (Cortés-Altamirano & Núñez Pasten, 2000), pero que era confundida con *Neoceratium dens* (Ostenfeld *et* Schmidt) F. Gómez, D. Moreira *et* P. López-García, una especie descrita a partir de muestras provenientes del Océano Indico y Mar Rojo (Ostenfeld & Schmidt, 1901) debido a la confusión que tuvo el Dr. Balech al identificar el material de Scrips (EUA) en su libro de Dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental (1988). En *N. dens* el cuerno antapical derecho en vista ventral es más largo que el izquierdo y presenta una fuerte curvatura hacia la porción apical (Figura 2a), mientras que en especímenes reportados como *N. dens* en el Pacífico Americano por Pesantes (1983) Figura 2c, Cortés-Altamirano & Núñez Pasten (2000) Figura 2d, Licea, 1995 Pag. 34, lám. 18 fig. 2 y Vargas Montero & Freer (2004) Figura 2b, así como en el Atlántico sudoccidental por Balech (1988), el cuerno antapical izquierdo es el más largo y con una orientación latero-antapical con base en la célula en vista ventral (Figura 2a-e). Dicha especie aunque ha sido confundida con otras especies como *Neoceratium tripos* var. *ponticum* (Muñoz & Avaria 1980. Pag. 21, lám. 5 fig. 4; lám. 10. fig. 4; Hernández-Becerril, 1985) dado que las diferencias entre estas son más marcadas no se ha tomado en cuenta dentro de este complejo.

Posteriormente a la descripción de *N. balechii*, Hernández-Becerril y Alonso-Rodríguez (2004) designaron a *N. balechii* como un sinónimo de *C. divaricatum*. Concluyendo que *N. balechii* f. *balechii* era *N. divaricatum* mientras que *N. balechii* f. *longum* fue nominado como *N. divaricatum* var. *balechii*. Validando con ello la existencia de dos variedades dentro de la especie *N. balechii* considerando que las diferencias son genéticas.

Neoceratium divaricatum es una especie semejante a *N. balechii*, la descripción y figura más cercana a *N. divaricatum* fue descrita por Bergh (1881) como una variedad de *N. tripos*, después Lemmerman (1899) la renombró como *N. tripos* var. *divaricatum* y por último Kofoid (1908) la elevó al rango de especie como *C. divaricatum*, siendo éste el primer autor en evidenciar además su variación morfológica al igual que otras especies del género *Neoceratium* al presentar el fenómeno de autotomía.

La descripción original hecha para *N. divaricatum* se hizo con muestras provenientes de las costas de California y reportada en las costas de Canadá (<http://www.ecohabpnw.org/W0308c/pages/Plankton.htm>), y la porción norte de México (Hernández-Becerril, 1989) en el Pacífico, en la que se nota que ambos cuernos antapicales en esta especie se prolongan inicialmente con una dirección lateral y después se doblan hacia la parte apical de la célula, mientras que en *N. balechii* la trayectoria que siguen ambos cuernos antapicales es completamente distinta (Figura 2f).

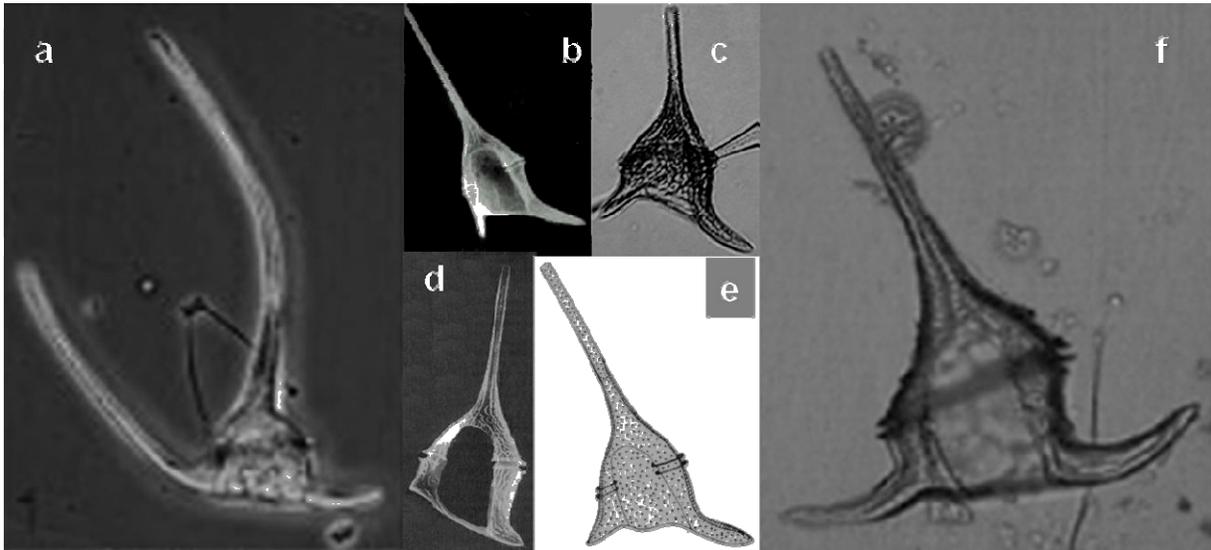


Figura 2a-f. *Neoceratium dens* a) tomado de Fukuyo <http://www.ecohabpnw.org/W0308c/pages/Plankton/DSCN1183.htm>; *N. balechii* tomado de: b) Vargas Montero & Freer (2004), c) Meave *et al.*, (2003), d) Cortes-Altamirano & Núñez Pasten (2000), e) Pesantes 1983; *Neoceratium divaricatum* f) tomado de Hernández-Becerril 2004.

3. OBJETIVO GENERAL.

Discriminar y delimitar a las especies involucradas en el complejo *Neoceratium balechii* - *N. divaricatum* y *N. longipes*, evaluando caracteres morfométricos y midiendo las variaciones genéticas de las secuencias espaciadoras intra transcritas (ITS).

4. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar estudios morfométricos de *Neoceratium balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes* para evidenciar la variabilidad total que existe en los caracteres de los taxa antes mencionados.
- Determinar y reforzar los caracteres morfológicos diagnósticos, junto con los ya descritos, haciendo uso de técnicas estadísticas para con ellos poder delimitar a las especies *N. balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes*. Completar dichos caracteres con la ayuda de fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido.
- Establecer un protocolo para la extracción de ADN para el género *Neoceratium*, utilizando pocas células.

5. HIPÓTESIS.

Que las variaciones intra e interespecíficas de los caracteres morfológicos y las secuencias genéticas de la región ITS descarte la posibilidad de sinonimia entre las especies *N. balechii* y *N. divaricatum*. Y que las formas de *N. balechii* sean solo el resultado del fenómeno de ciclomorfismo.

6. ÁREA DE ESTUDIO.

Las muestras de donde se obtuvieron los ejemplares estudiados en este trabajo, se distribuyen desde el norte del Pacífico Mexicano hasta el Sur de Perú, se muestran en la Tabla 1 y se ejemplifican en la Figura 3.

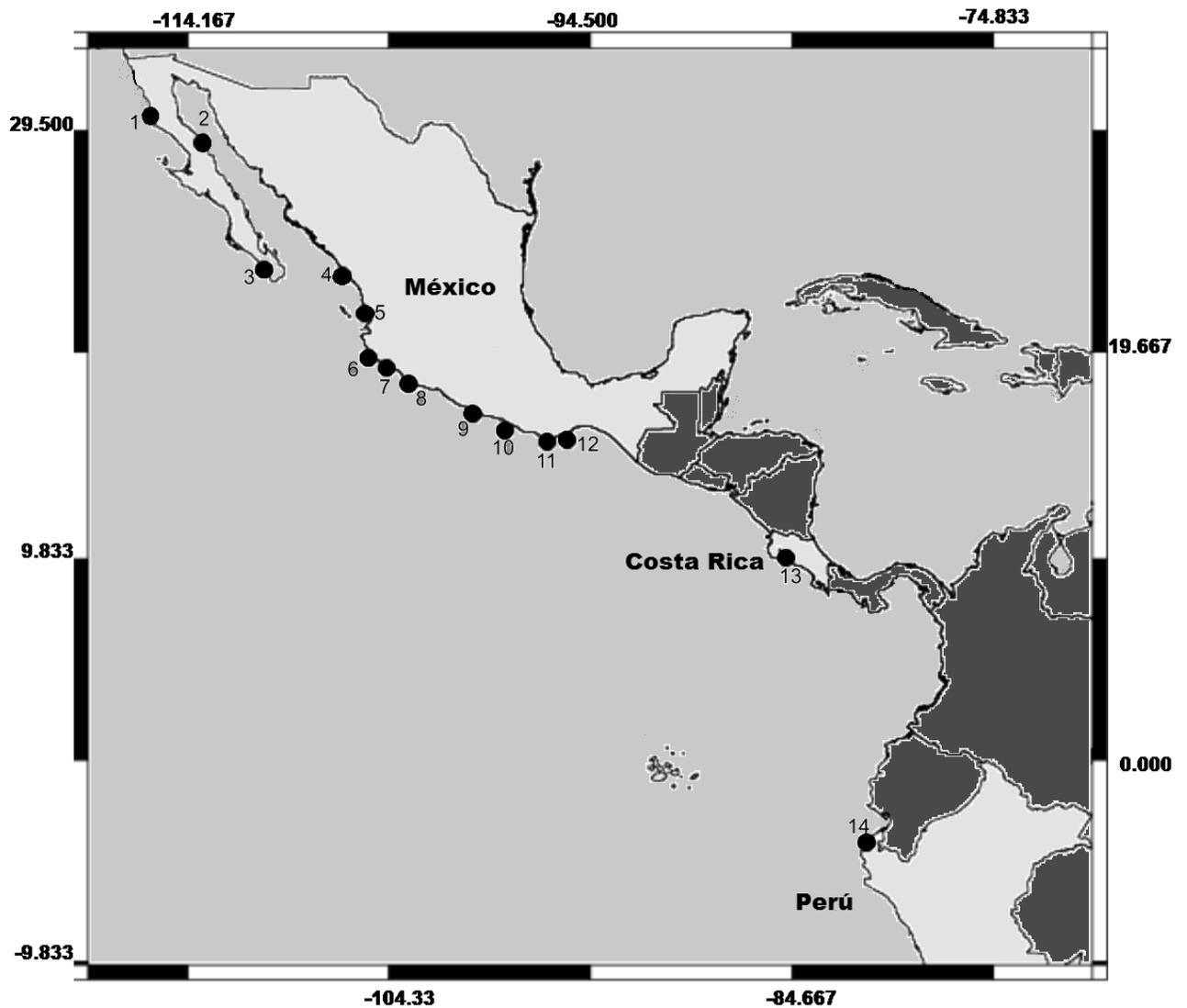


Figura 3. Ubicación geográfica de las localidades de las muestras estudiadas de los países de México, Costa Rica y Perú.

7. MATERIAL Y MÉTODO.

OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se revisaron un total de 154 muestras de red (luz de malla 64 μm) y botella, aunque solo en 64 de las muestras se reconoció a las especies involucradas en el complejo. Y las cuales pertenecen a las colecciones que se enlistan a continuación:

Neoceratium balechii. Muestras líquidas de fitoplancton marino fijadas con formol, pertenecientes al Laboratorio de Fitoplancton Marino y Salobre del Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y que algunos datos forman parte del proyecto CONABIO BA08 (base de datos Biótica).

Muestras de red de fitoplancton preservadas en formol del ciclo bianual colectado por el M. en C. Roberto Cortes-Altamirano del ICMYL-Mazatlán y que se encuentra en la colección FITOMEXU del Laboratorio de Fitoplancton y Productividad Primaria del ICMYL-CU a cargo del Dr. Sergio Licea Durán.

Muestra de red de fitoplancton fijadas en acetato-lugol colectadas por la M. en S. Maribelle Vargas Montero de Costa Rica.

Muestra de red de fitoplancton fijadas en formol colectadas por Patricia Villanueva de Perú.

Neoceratium longipes. Muestra obtenida de la cepa CCMP1770 proveniente del cepario PROVASOLI Guillard Center (www.ccpm.bigelow.org).

Neoceratium divaricatum. Muestras de red de fitoplancton fijadas en formol que forman parte de la Colección de Invertebrados del Instituto de Biología de la

Universidad Nacional Autónoma de México facilitadas por el finado Dr. Samuel Gómez Aguirre.

Las muestras utilizadas en el trabajo fueron colectadas entre los años de 1999 al 2007 y, las localidades y fechas se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Fecha y localidad de las muestras estudiadas.

FECHA	LOCALIDAD	FECHA	LOCALIDAD
17-Ago-2005	Todos los Santos, B. C. Méx.	17-Jul-1999	El Faro, Michoacán, Méx.
08-Jun-2002	Bahía Concepción, B. C. Méx.	18-May-2003	Caleta Campos, Mich., Méx.
16-Ago-2002	B. C., Méx.	17-May-2003	El Faro, Michoacán, Méx.
19-Ago-2002	B. C., Méx.	19-May-2000	Acapulco, Guerrero, Méx.
23-Ago-2002	Bahía Concepción, B. C. Méx.	10-Sep-2000	Acapulco, Guerrero, Méx.
17-Sep-2002	Ensenada, B. C., Méx.	13-Oct-2000	Acapulco, Guerrero, Méx.
24-Sep-2002	Ensenada, B. C., Méx.	22-Nov-2002	Acapulco, Guerrero, Méx.
01-Feb-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	20-May-2003	Acapulco, Guerrero, Méx.
18-Mar-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	12-Jun-2003	Acapulco, Guerrero, Méx.
23-Abr-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	16-Jul-2004	Acapulco, Guerrero, Méx.
11-May-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	15-Jun-2005	Acapulco, Guerrero, Méx.
23-Jun-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	03-Nov-2006	Acapulco, Guerrero, Méx.
08-Jul-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	22-Nov-2006	Acapulco, Guerrero, Méx.
18-Ago-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	08-Feb-2007	Acapulco, Guerrero, Méx.
04-Nov-1999	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	21-Mar-2007	Acapulco, Guerrero, Méx.
17-Feb-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	29-May-2007	Acapulco, Guerrero, Méx.
25-Abr-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	07-Jun-2007	Acapulco, Guerrero, Méx.
09-May-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	04-Nov-2007	Acapulco, Guerrero, Méx.
27-Jun-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	14-Nov-1999	Huatulco, Oaxaca, Méx.
12-Jul-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	20-May-2000	Chachagua, Oaxaca, Méx.
17-Ago-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	17-Nov-2000	Tehuantepec, Oaxaca, Méx.
05-Sep-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	25-Mar-2001	Pta Maldonado, Oax., Méx
30-Oct-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	30-Mar-2001	Chachagua, Oaxaca, Méx.
28-Nov-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	28-May-2001	P. Escondido, Oaxaca, Méx.
26-Dic-2000	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	15-Mar-2003	Golfo Nicoya, C. R.
29-Mar-2003	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	02-Jul-2003	Golfo Papagayo, C. R.
16-May-2003	Mazatlán, Sinaloa, Méx.	14-Ago-2003	Golfo Nicoya, C. R.
05-Mar-2000	Chacala, Nayarit, Méx.	29-Ago-2003	Puntarenas, C. R.
08-Abr-2000	Barra Navidad, Jalisco, Méx.	02-Dic-2003	Puntarenas, C. R.
08-Abr-2000	Manzanillo, Colima, Méx.	25-Mar-2004	Golfo Nicoya, C. R.
16-May-2003	Manzanillo, Colima, Méx.	10-Jun-2004	Golfo Nicoya, C. R.
17-May-2007	Manzanillo, Colima, Méx.	25-Ago-2004	Playa Zorritos, Perú

B. C.= Baja California, Méx. = México, C. R. = Costa Rica

OBTENCIÓN DE DATOS MORFOMÉTRICOS.

Se fotografiaron ejemplares de *Neoceratium balechii* y *N. longipes* con un microscopio óptico compuesto Leica-DMLB y con una cámara digital Canon Power Shot S40 AiAF y los de *C. divaricatum* se fotografiaron en un microscopio óptico Zeiss obtovar y con una cámara Canon PC1145.

Las fotografías fueron tomadas en vista ventral y dorsal, realizando diferentes enfoques al mismo organismo para obtener los diferentes caracteres de cada ejemplar a evaluar. Las fotografías resultantes se procesaron en el Módulo de Medición del Programa Leica IM1000 V1.20 (versión 2000) haciendo la calibración previa y considerando tanto el aumento del objetivo como el zoom de la cámara. Se midieron 1,022 ejemplares representantes de los taxa *N. balechii* f. *longum*, *N. balechii* f. *balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes*.

Parte de las muestras líquidas se procesó para su observación en microscopía electrónica de barrido (MEB), con la finalidad de observar, reconocer, registrar y comparar datos morfológicos finos, que pudieran ser incorporados en las descripciones de las especies. Del material líquido se tomó una gota de la muestra y se hicieron enjuagues con agua destilada para eliminar parte de las sales del agua marina y del fijador (formalina) que se usa para conservar las muestras líquidas. Se colocaron gotas del material lavado en fragmentos de vidrio para desecarlas, cubriéndolas para evitar que le cayeran partículas de polvo. Una vez seco el material, se procedió a cubrirlas con una capa fina de oro.

Dada la extensa distribución de *C. balechii* en el Pacífico Americano, desde el norte de México hasta Perú, las poblaciones se separaron en 3 grupos de acuerdo a su situación geográfica, todas las del Pacífico Mexicano se consideraron como Pacífico Norte (PN) , las de Costa Rica como Pacífico Centro (PC) y las de Perú como Pacífico Sur (PS).

Para cada organismo, y con base en los antecedentes de Meave *et al.*, (2003), se decidió evaluar 8 caracteres cuantitativos para todas los taxa (Tabla 2). Con los datos obtenidos de las mediciones, se conformó una base de datos y cada uno de los ejemplares se etiquetó con el taxa potencial hipotético al cual pertenecen.

Tabla 2. Caracteres cuantitativos empleados en el análisis.

Carácter	Abreviatura
1 longitud total	lt
2 Longitud cuerno apical	lca
3 Distancia de separación entre los cuernos antapicales	dseca
4 Longitud del cuerno derecho	cder
5 Longitud del cuerno izquierdo	cizq
6 Transdiámetro	t
7 Proporción de la longitud entre cuernos antapicales	rc
8 Distancia de la base de la hipoteca a los cuernos antapicales	dbhc

La manera de evaluar los caracteres se ilustran en la Figura 4, las mediciones de cada carácter se hicieron siguiendo las siguientes indicaciones.

- Primero se tomó como referencia el eje del cingulum, es decir, se trazó una línea sobre dos puntos opuestos a lo largo del cingulum (a-a). De este eje se midió el transdiámetro considerando la excavación del cingulum.
- Después se trazaron líneas paralelas a la línea de referencia antes mencionada. Una desde el borde de la epiteca (b-b) hasta el de la hipoteca (c-c), con el objeto de obtener la longitud total (b-c); otra cuando la hipoteca comienza a dar origen al cuerno apical (d-d), para obtener la longitud del cuerno apical (c-d).
- Para obtener las longitudes de los cuernos antapicales, se trazaron líneas desde la punta de cada uno de los cuernos hasta la parte en la que se transforma en el cuerpo central de la célula.
- La distancia entre los cuernos antapicales se midió desde la punta de uno de los cuernos antapicales hasta la punta del otro (e-e).
- La distancia existente entre la base de la hipoteca y los cuernos antapicales, se tomó a partir de la distancia media que existe entre los cuernos antapicales (e-e) a la base de la hipoteca (f-f).

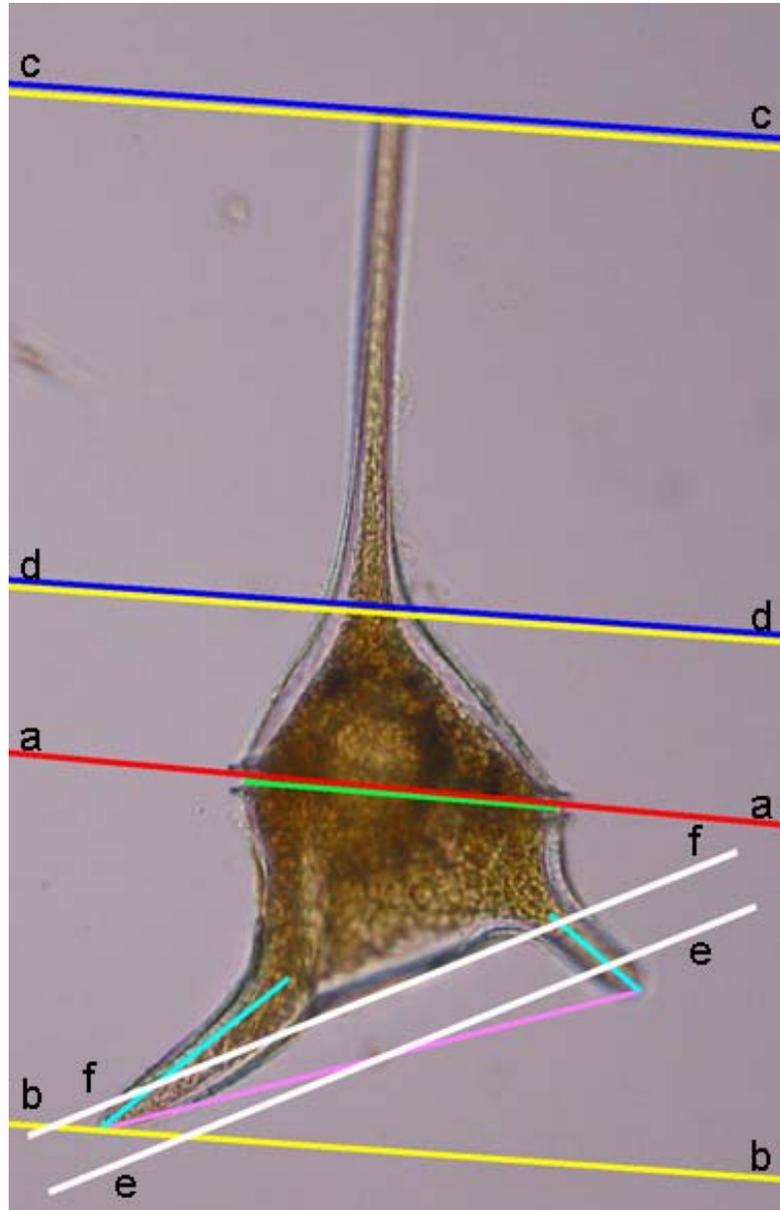


Figura 4. Medidas tomadas en cada ejemplar de las tres especies. En rojo-línea de referencia, en amarillo largo total, en azul longitud del cuerno apical, en turquesa longitud de cada cuerno antapical, en rosa longitud existente entre los cuernos antapicales, en verde longitud del cíngulum y en blanco longitud de la base de la hipoteca a cuernos.

ANÁLISIS MORFOMETRICO.

Delimitación de taxa. De cada una de las variables de cada uno de los taxa se determinó el intervalo, la media y la desviación estándar (estadística descriptiva) para conocer su variabilidad biológica.

Los Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples (Tukey-Kramer) fueron utilizados para reconocer diferencias significativas con una $p < 0.05$ de cada uno de los caracteres entre los taxa, para fines de este análisis el taxa = “forma” y se tomo como sigue: forma 0= *Neoceratium divaricatum*, forma 1= *N. balechii f. balechii*, forma 2= *N. balechii f. longum* y forma 3= *N. longipes*.

Los datos morfométricos fueron analizados con las siguientes técnicas de estadística multivariada, usando el programa NCSS (versión, 2000).

Se usó el Análisis de Conglomerados (Cluster) para observar la agrupación de los organismos considerando los caracteres propuestos en su conjunto usando el método del vecino más cercano y la distancia Euclidiana.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) se usó para explorar si el conjunto multivariado de datos presentaba un patrón que pudiera corresponder a una diferenciación entre especies o a algún otro fenómeno biológico subyacente.

Se realizaron Análisis de Discriminantes (DA) para validar los resultados del análisis de conglomerados en la formación de los grupos, además para evaluar la significancia estadística en la separación de los taxa, basado en el conjunto de los caracteres propuestos y para evaluar la importancia de cada variable en la separación.

Una vez revisados los resultados de los análisis descritos anteriormente, se planteó la necesidad de incluir algún carácter más adicional que pudiera ayudar a discriminar los taxa, al cual llamamos distancia entre la base de la hipoteca a los cuernos antapicales (dbhc), que podría ser evaluado con una dirección positiva o negativa tomando como referencia el cingulum.

El carácter se midió en 100 ejemplares, distribuidos en las especies de la siguiente manera: 30 ejemplares de *Neoceratium longipes* y *N. divaricatum*, y 40 de *N. balechii* distribuidos en las dos formas de la siguiente manera: 28 de la f. *longum* y 12 de la f. *balechii*, pensando que la n fuer la misma para cada taxa.

Para reforzar los resultados se hizo uso de fotografías de MEB ya que algunos caracteres de la morfología fina tales como la ornamentación de la teca, se observan mejor en este tipo de material y se contrastaron con las imágenes de MEB de las otras especies.

Sucesión de formas de *N. balechii*. Extraordinariamente se contó con muestras de los años 1999 al 2000, dichas muestras se analizaron mes por mes y al conjunto de organismos contenidos en la muestra de cada mes, se consideró como una población.

Se consideraron los mismos caracteres y se aplicaron los mismos análisis estadísticos usados en la delimitación de taxa ya que la finalidad era observar el comportamiento de las formas de *Neoceratium balechii*.

Se obtuvo la abundancia relativa de las formas en cada población para ello fue necesario llevar a cabo la siguiente extrapolación de los datos. En cada muestra se contabilizó el número de alícuotas revisadas (3 cuando la especie era rara o ausente y 1 ó 2 si era abundante) extrapolando estas alícuotas a 1mL. En total se midieron un total de 345 células de este muestreo, con un promedio de 15 ejemplares por cada mes. Los resultados de las abundancias relativas de cada una de las formas obtenidas en cada muestra se graficaron en el programa SIGMA PLOT.

Los datos de temperatura de las colectas de este muestreo (bianual), se analizaron con la prueba ANOVA, para observar si existían diferencias significativas entre las temperaturas en las que dominaba la forma *balechii* y en las que dominaba la forma *longum*, y poder hacer inferencias sobre el papel que juega la temperatura de la columna de agua.

Comportamiento regional de *Neoceratium balechii* en el Pacífico Oriental.

Dado que se pudo contar con muestras de diferentes regiones geográficas del Pacífico Oriental (Centro y Sudamérica) se quiso observar si en dichas regiones se mantienen un patrón similar en cada uno de los caracteres de la especie *N. balechii* y si existen rangos específicos en las dimensiones de los caracteres para estas localidades.

ANÁLISIS MOLECULAR.

Aislamiento de material usado en la técnica de PCR. En el establecimiento de la técnica de PCR, se utilizaron las cepas de la tabla 3 y las células del florecimiento de *N. balechii* ocurrido en las costas de Manzanillo en mayo del 2007 enlistados en la tabla 4.

De muestras de cultivo, se aislaron las cepas 12Z de *N. balechii* f. *balechii* de Zihuatanejo del 16 de abril de 2007 y la 12L de *N. macroceros* Lázaro Cárdenas del 30 abril de 2007, en 11 y 8 tubos Eppendorf respectivamente las cuales fueron congelados en agua destilada (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de tubo y número de células congelados.

Cepa 12Z		Cepa 12L	
Tubo	Núm. Células	Tubo	Núm. células
A	10	L	10
B	10	M	10
C	10	N	10
D	20	O	20
E	20	P	20
F	20	Q	20
G	20	R	50
H	6	S	50
I	100		
J	100		
K	100		

De la cepa CCMP1770 de *Neoceratium longipes* se concentraron 137 ml de cultivo con una densidad de 408 células mL⁻¹, conteniendo un total de 45,896 células; así

como 4 tubos Eppendorf con 1 ml de cultivo conteniendo estos una densidad de 400 células ml⁻¹, todas las muestras se congelaron en agua destilada.

A partir de un florecimiento algal nocivo (FAN) que tuvo lugar en el mes de mayo del año 2007, en la bahía de Manzanillo y el cual duró más de un mes, se colectaron organismos vivos con botellas van Dorn que fueron trasladadas a la Cd. de México en botellas de 500 ml. El aislamiento de las células se hizo a través de la técnica de micropipeta, bajo microscopio estereoscópico. Para tratar de no mezclar a los individuos se hizo una identificación (valorando la longitud) de las formas de *N. balechii* para no influir en los resultados moleculares, utilizando un microscopio invertido Zeiss. Se tuvo un total de 13 tubos Eppendorf con células de *Neoceratium balechii* f *balechii*, ya que únicamente se detectó esta forma en el florecimiento. Siguiendo la técnica de Edvardsen *et al.*, (2003) y Marin *et al.*, (2001) en 10 tubos se aislaron un número variable de entre 5 y 50 células, en agua destilada y metanol (Tabla 4).

Para tener un control de los organismos que se estaban usando en la técnica molecular, se guardaron por separado células fijadas en acetato-lugol. Todas las muestras obtenidas tanto a partir de cultivos como del campo usadas en este análisis se congelaron a -20 °C.

Tabla 4. Relación de tubo y número de células congelados del florecimiento de Manzanillo.

Tubo	Núm. Células	Sustancia
1	5	Agua destilada
2	5	√
3	10	√
4	10	√
5	20	√
6	30	√
7	40	√
8	50	√
9	50	√
10	50	√
11	50	Metanol
12	50	√
13	50	√

Procesamiento de material. Para la extracción de ADN se usaron los dos métodos descritos a continuación:

En el método físico consiste en la congelación y descongelación de las muestras, seguida por una centrifugación a 10,000 rpm para romper la pared de celulosa que tienen los organismos del género *Neoceratium* (Fensome *et. al* 1993; Lee, 1990; Graham & Wilcox 2000).

Método tradicional extracción de ADN que consiste en la utilización de sustancias para romper la pared de la célula, precipitar los ácidos nucleicos, eliminar sales y purificar ADN (Fernández-Perrino, 1997).

Elección de Cebadores. Dado que no se han reportado cebadores para ITS específicos del género *Neoceratium*, se usaron los cebadores para ITS diseñados por Chen *et al.*, (2001):

(**F** 5' CGT AGG TGA ACC TGC GGA AGG ATC A 3'; **R** 5' TTC CCT GTT CAC TCG CCG TTA CT 3'), que son señalados como específicos para eucariontes.

Y los diseñados por Adachi *et al.*, (1994):

(**A** 5'-CCA AGC TTC TAG ATC GTA ACA AGG(ACT) TCC GTA GGT-3'; **B** 5'-CCTGCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA(AG) TTCAG C(AG)GG-3'), usado para dinoflagelados de diferentes géneros.

Se siguió la técnica de Chen *et al.*, (2001) para la amplificación y secuenciación de PCR así el volumen final de cada tubo fue de 50µL con la siguiente mezcla:

200 µL de dNTP

200 nM de cada primer

5 µL de tampón 10X (incluyendo 1.5 mM de MgCl₂)

1 U de ADN polimerasa.

Condiciones de amplificación de ADN. Las muestras se sometieron a 32 ciclos con las siguientes características. 1^{er} ciclo a 94° durante 5 min, 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min y un último ciclo de amplificación a 72 °C durante 5 min.

La amplificación del ADN se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se visualizó con iluminación UV y se fotografía con un fotodocumentador (GelDoc 2000, Biorad).

8. RESULTADOS.

El mayor número de muestras de red utilizados fueron de las localidades de Mazatlán y Acapulco, con 20 y 15 respectivamente, mientras que localidades como Bahía Concepción, Barra de Navidad, Chacala, Caleta de Campos, el Faro, Huatulco, Puerto Escondido, Punta Maldonado, Tehuantepec y playa Zorritos (Perú) solo se contó con una muestra cada una, y Ensenada, Manzanillo, Bahía Concepción, Chacahua, Costa Rica (Golfo Nicoya, Papagayo y Puntarenas) presentaron un intervalo de entre 2 y 8 muestras cada una.

En total 1,022 organismos del género *Neoceratium* fueron estudiados, fotografiados y medidos para conformar la base de datos que se utilizó para llevar a cabo los análisis necesarios en este trabajo (Tabla 5).

Tabla 5. Ejemplares medidos para cada taxón.

Taxa	No. Ejemplares
<i>N. balechii</i> f. <i>balechii</i>	557
<i>N. balechii</i> f. <i>longum</i>	384
<i>N. divaricatum</i>	50
<i>N. longipes</i>	31

Neoceratium balechii representó el 92% del total de las muestras, mientras que *N. divaricatum* y *N. longipes* el 5% y 3%, respectivamente, algunos ejemplares de los taxa usados en este trabajo se muestran en la Figuras 5 a-h, 6 a-f y 7 a-f.

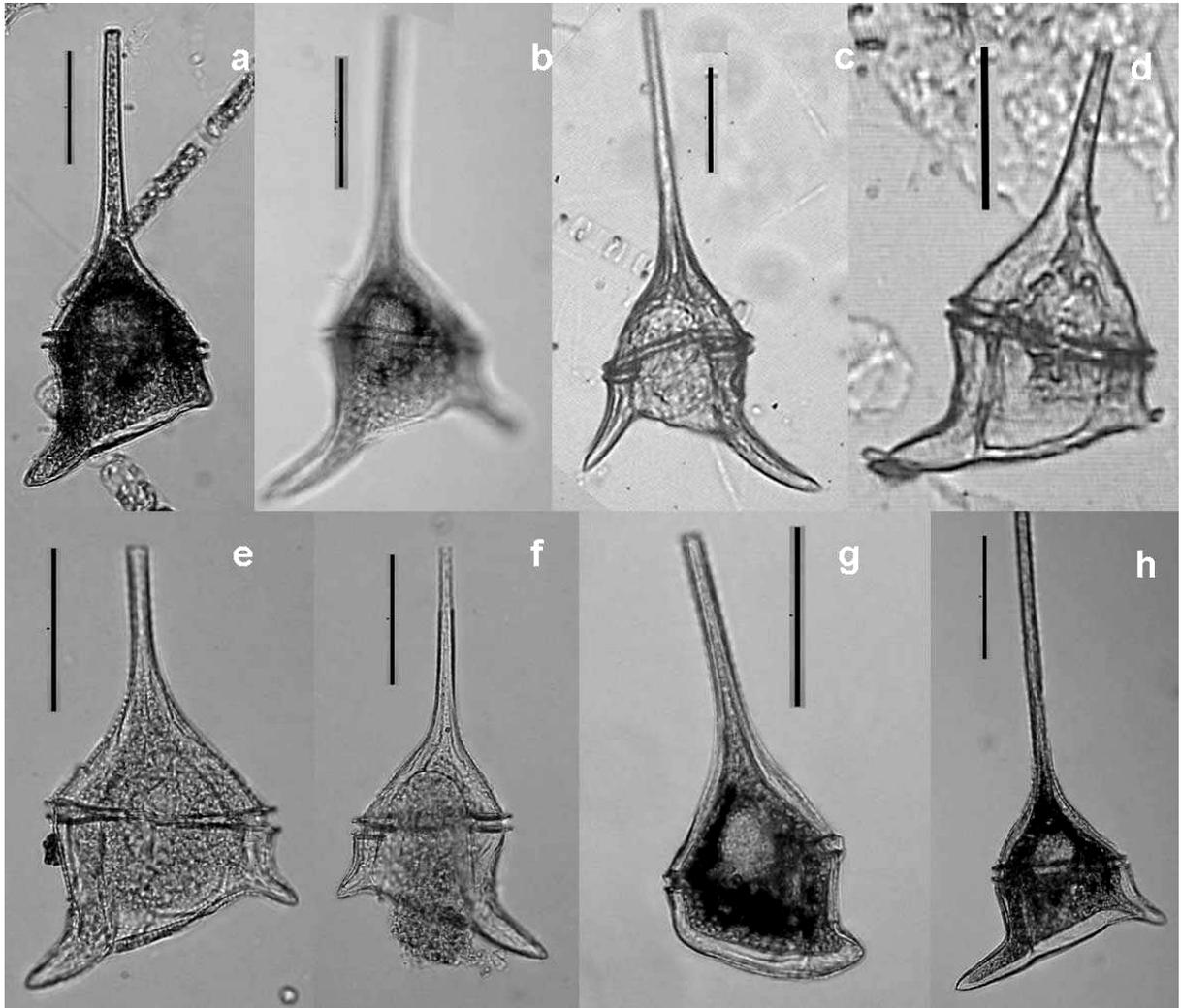


Figura 5. *Neoceratium balechii* ejemplares de algunas localidades, se muestra la vista ventral y dorsal. a-b) Acapulco, Gro., c-d) Mazatlán, Sin., e-f) Manzanillo, Col., g-h) Bahía Ensenada, B. C. Escala 50 μ m.

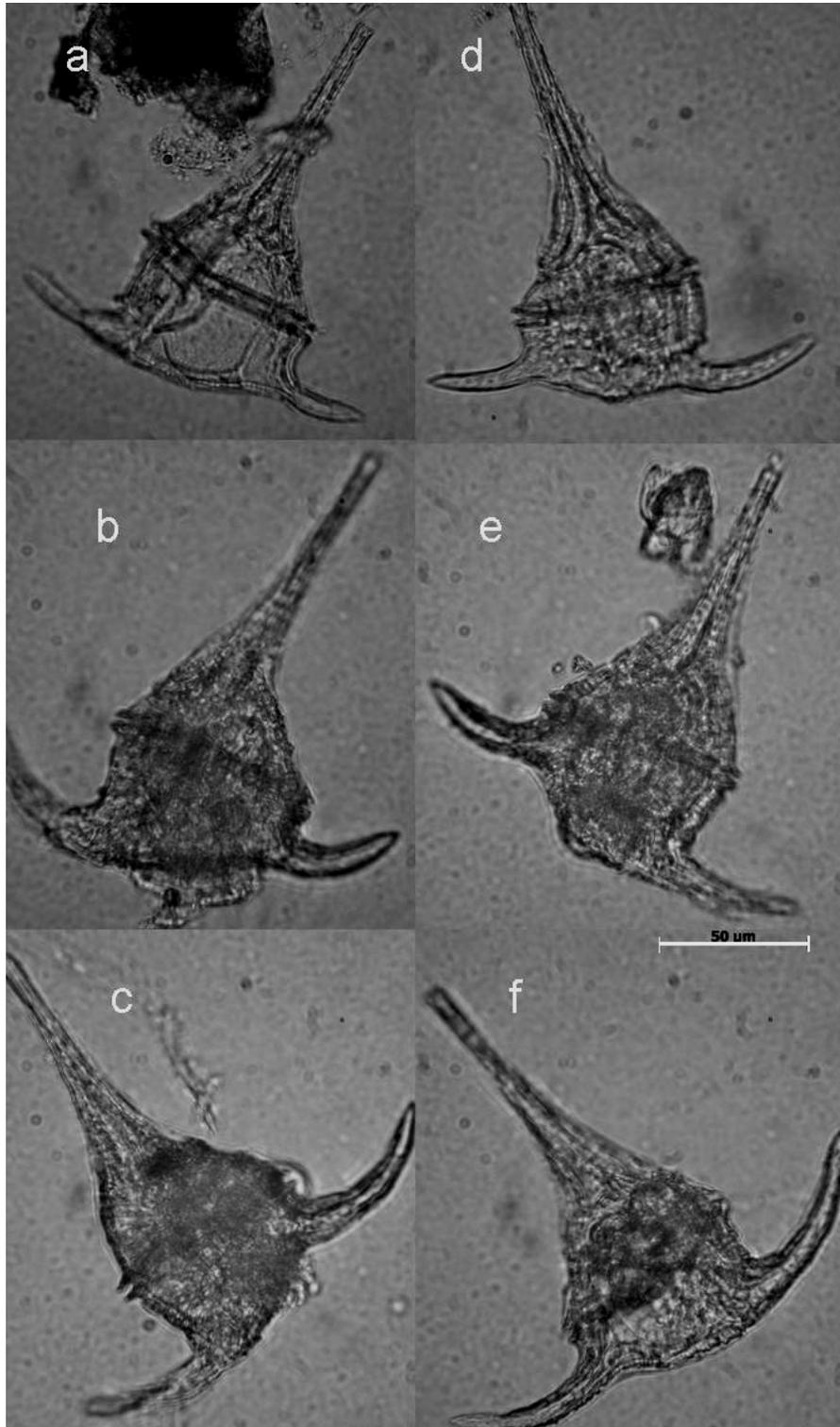


Figura 6. *Neoceratium divaricatum* ejemplares de la Bahía de Ensenada a-c) vista dorsal, d-f) vista ventral. Escala 50 μ m

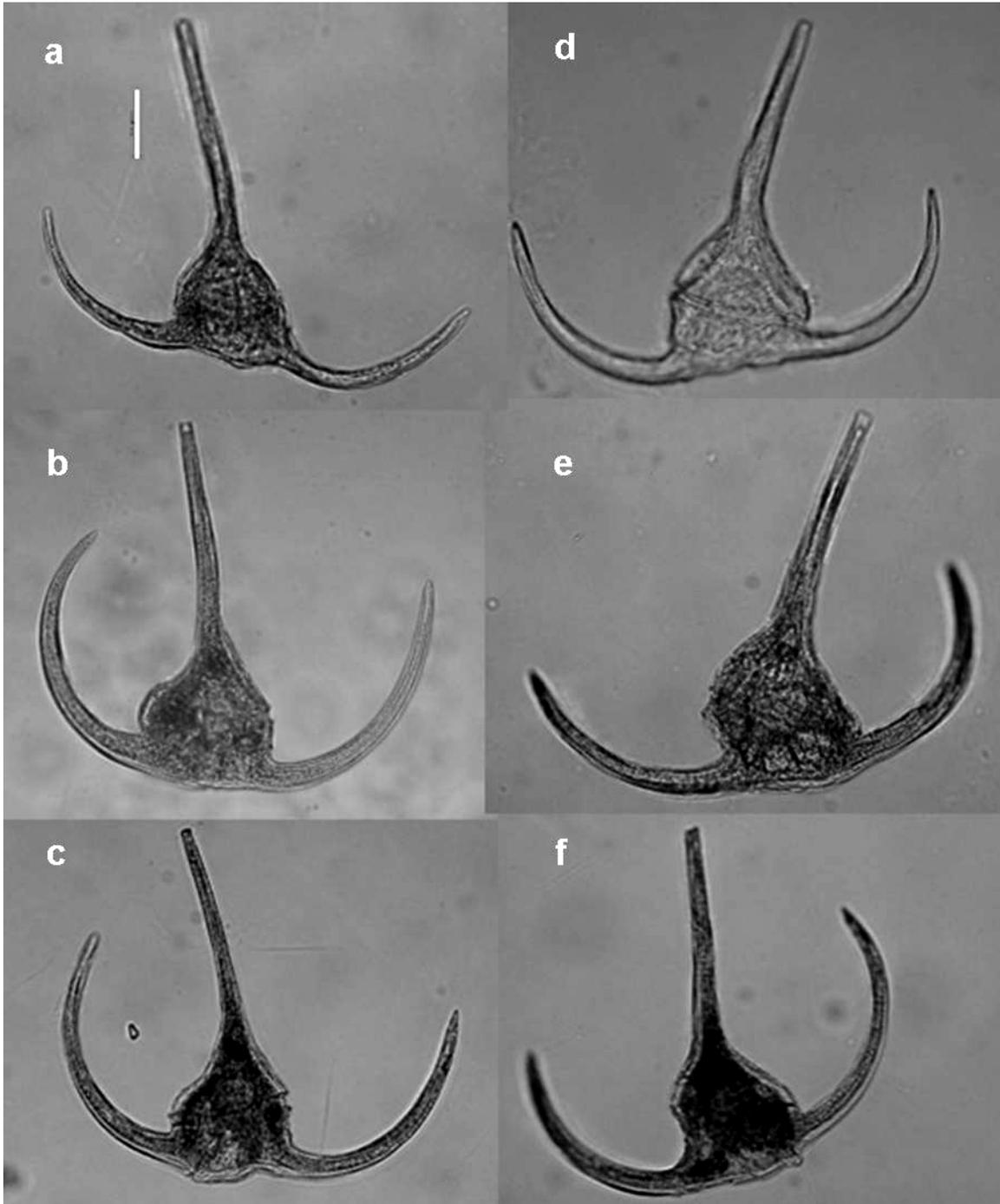


Figura 7. *Neoceratium longipes*, cepa CCMP1770 Provasoli Guillar Center. a-c) vista ventral, d-f) vista dorsal. Escala 30 μ m.

De los 991 ejemplares documentados para el Pacífico Americano, 919 son del Pacífico Norte (PN), el Pacífico Central (PC) con 35 ejemplares y por último el Pacífico Sur (PS) con 37 ejemplares, ejemplificados en las Figuras 8 a-h, 9 a-d y 10 a-d. La disparidad en el número de ejemplares de cada región geográfica se debió a la escasez del material proveniente de otros países.

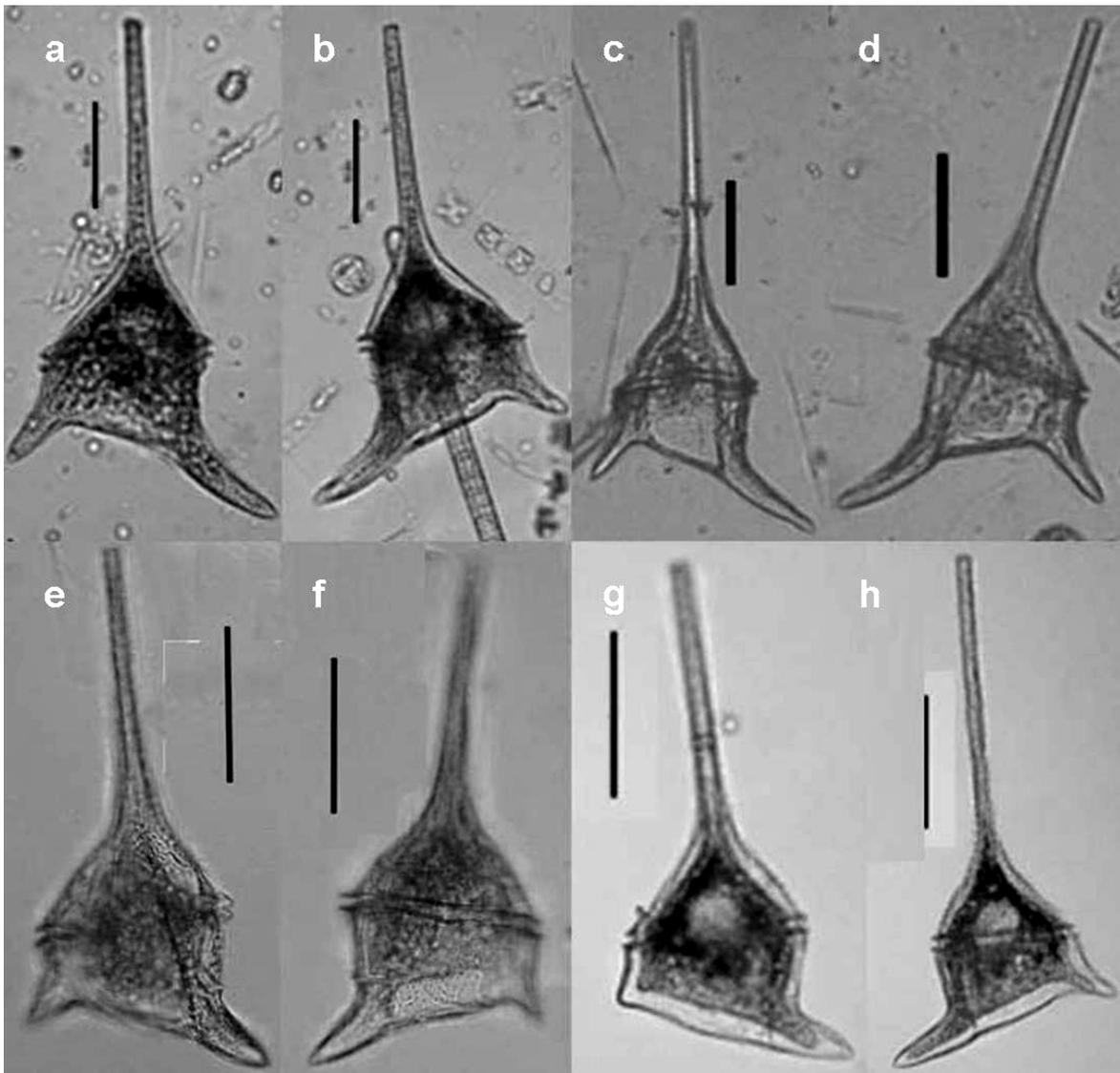


Figura 8. *Neoceratium balechii* ejemplares Pacífico Norte (México). a, c, e, g) vista ventral y b, d, f, h) vista dorsal. Escala 50 μ m.

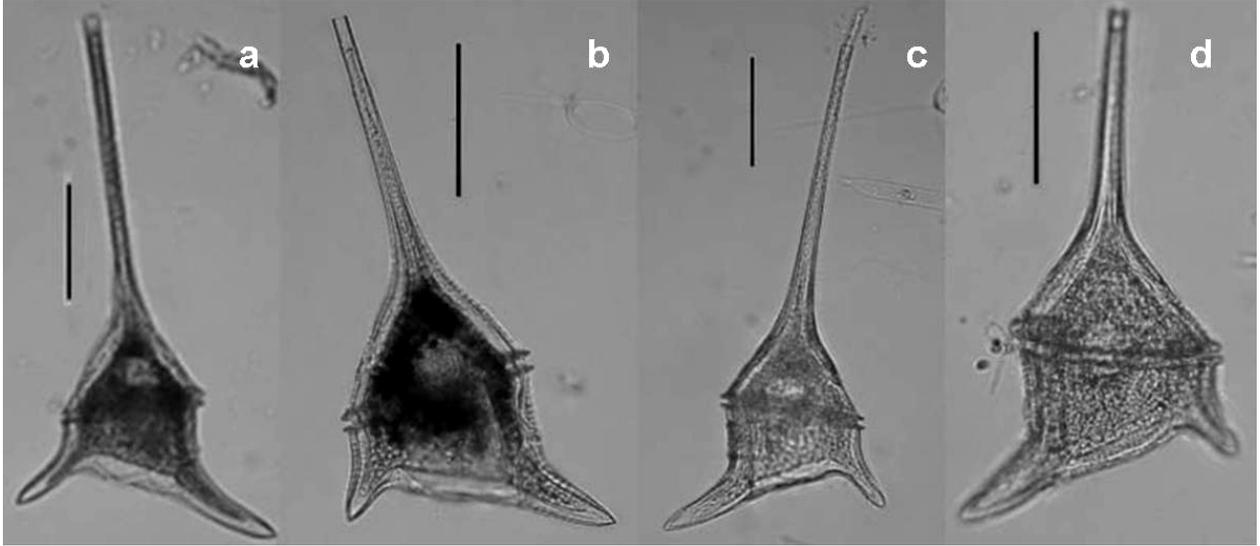


Figura 9. *Neoceratium balechii* ejemplares Pacifico Central (Golfo de Nicoya, Costa Rica). a-b) vista ventral y c-d) vista dorsal. Escala 50 μ m.

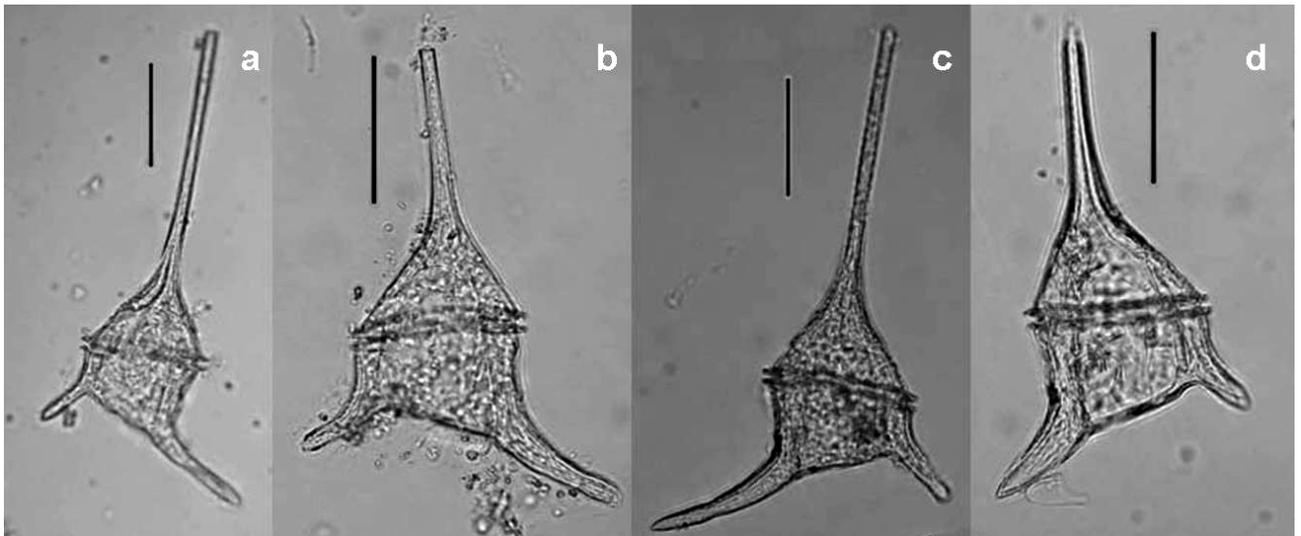


Figura 10. *Neoceratium balechii* ejemplares Pacifico Sur (Playa Zorritos, Perú). a-b) vista ventral y c-d) vista dorsal. Escala 50 μ m.

En cuanto a las observaciones de los organismos en fotografías obtenidas del microscopio electrónico de barrido (MEB) podemos decir que *Neoceratium balechii* tiene una teca más delicada y menos ornamentada, con crestas apenas visibles y con una mayor cantidad de poros en la parte ventral, mientras que en *N. divaricatum* las crestas fueron fuertes y pronunciadas, presentando poros grandes y escasos en la parte ventral y pequeños y abundantes en la dorsal (Figura 11). Por otro lado la teca de *N. longipes* (Figura 12) tuvo crestas más parecidas a las de *N. divaricatum* (Figura 13) aunque en menor cantidad y poros pequeños y abundantes en toda la célula.

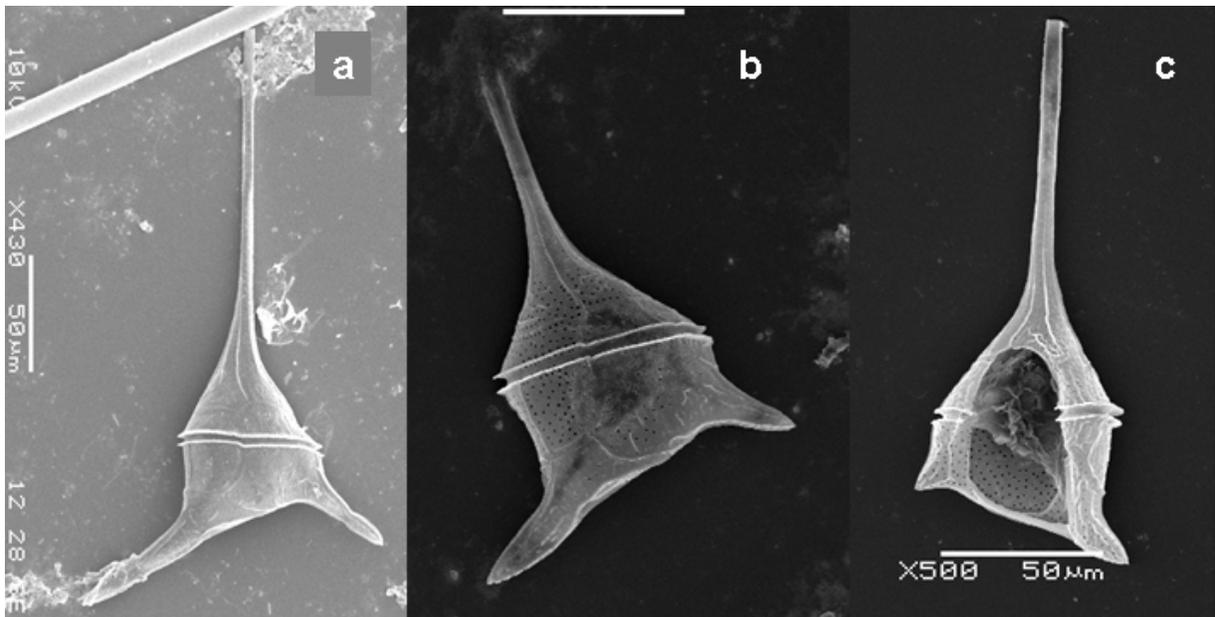


Figura 11. Fotos de MEB de *Neoceratium balechii*, apreciando los caracteres morfológicos. a-b) vista dorsal y c) vista ventral.

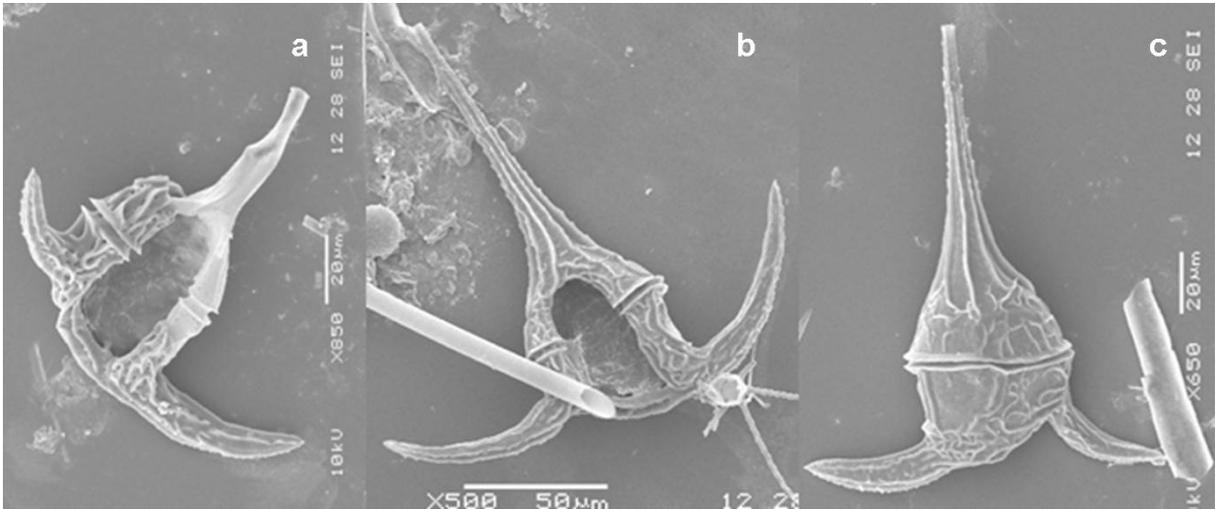


Figura 12. Fotos de MEB de *Neoceratium divaricatum*, apreciando los caracteres morfológicos. a-b) vista ventral y c) vista dorsal.

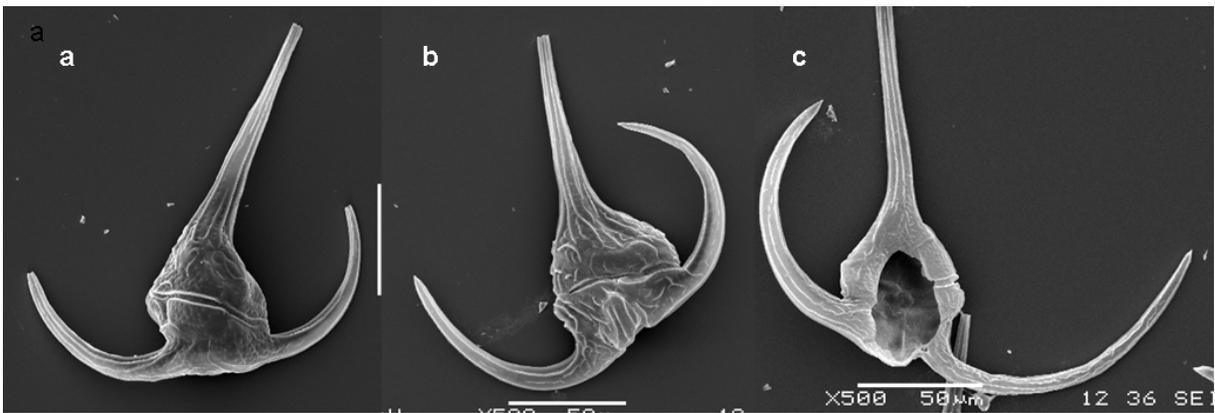


Figura 13. Fotos de MEB, apreciando los caracteres morfológicos de *Neoceratium longipes*.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

Sobre los taxa. La estadística descriptiva de los caracteres para cada taxa usados en los análisis se observa en la tabla 6. En ella se muestra el amplio rango que presentan las dimensiones de los 8 caracteres cuantitativos evaluados, siendo el de mayor variabilidad el carácter de la longitud del cuerno antapical derecho (lcder), seguido por la longitud del cuerno antapical izquierdo (lcizq) y la longitud total (lt).

Cabe destacar que existe un gran traslape entre las dimensiones de cada una de las especies, especialmente en los caracteres de la longitud del cuerno apical (lca) y el transdiámetro (t).

Las variaciones en el carácter longitud total (lt; Figura 14a), fue más amplia en *Neoceratium balechii f balechii*, *N. balechii f longum* y *N. divaricatum* con respecto a *N. longipes*. Existiendo diferencias significativas entre *N. balechii* (formas) y las especies *N. divaricatum* y *N. longipes*, pero no entre las formas de *N. balechii*, ni entre las especies *N. divaricatum* y *N. longipes*.

Para el carácter transdiámetro (t; Figura 14b) la mayor variación se notó en *N. balechii f balechii*, seguido de *N. balechii f longum*, en cambio las otras dos especies *N. divaricatum* y *N. longipes* mostraron poca variación. Para este carácter existen diferencias significativas entre *N. balechii f. balechii*, *N. longipes* y *N. divaricatum* pero no entre *N. balechii f. longum* y *N. divaricatum*.

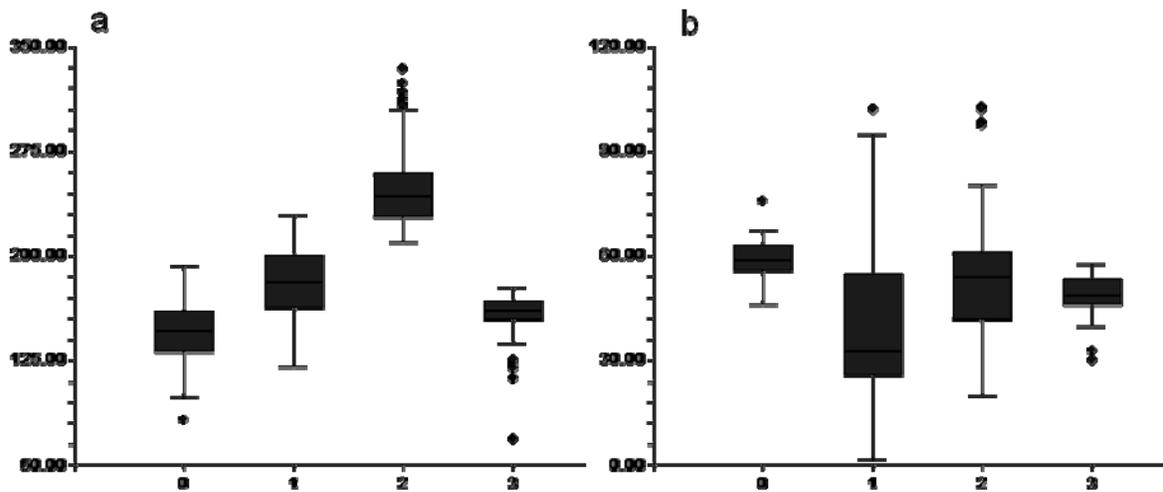


Figura 14. Variación de los caracteres. a) longitud total y b) transdiámetro para cada una de las especies . 0- *N. divaricatum*, 1-*N. balechii* f. *balechii*, 2- *N. balechii* f. *longum* y 3-*N. longipes*.

En lo que respecta al carácter longitud del cuerno antapical derecho (lcder), la mayor variación se encontró en las especies *N. divaricatum* y *N. longipes* con respecto a *N. balechii* (Figura 15a), y se pudo observar que fue el carácter que presentó menor variación en todas las especies. Encontrando diferencias significativas entre todas las especies.

La variación presentada en la longitud del cuerno antapical izquierdo (lcizq) (Figura 15b) fue mayor en *N. eratum balechii* f. *longum* que en *N. balechii* f. *balechii* y ambas formas de esa especie tuvo mayor variación en comparación con *N.*

divaricatum y *N. longipes*. Para este carácter se encontraron diferencias significativas entre las especies pero no entre las formas de *N. balechii*.

Para el carácter longitud del cuerno apical (ca) se pudo observar que la mayor variación se presentó en *N. balechii* f *longum* y la menor en *N. longipes*, mientras que en las taxa *N. balechii* f *balechii* y *N. divaricatum* se presenta una variación casi de la misma magnitud (Figura 15c). Habiendo diferencias significativas entre las formas de *N. balechii* y las especies *N. divaricatum* y *N. longipes*, pero no entre las formas de *N. balechii*, ni entre las especies *N. divaricatum* y *N. longipes*.

Con respecto al carácter distancia entre cuernos antapicales (deseca) la mayor variabilidad se observó en las especies *N. divaricatum*, *N. balechii* f. *longum* y *N. longipes* con respecto a *N. balechii* f. *balechii* quien fue la que presentó una menor variabilidad en este carácter (Figura 15d).

En la proporción existente entre los cuernos antapicales (rc), la variabilidad presentada fue la de menor magnitud de todos los caracteres, presentando la menor variación en *N. longipes* y mayor en *N. balechii* f *longum* (Figura 16a).

Para estos dos últimos caracteres existen diferencias significativas entre todas las especies.

El último carácter analizado fue la distancia de la base de la hipoteca a la distancia entre los cuernos antapicales (dbhc) en este carácter la mayor variabilidad se encontró en *Neoceratium longipes*, seguida de *N. divaricatum*, *N. balechii* f

longipes y con la menor variabilidad *N. balechii* f. *balechii* (Figura 16b). Como era de esperarse en este carácter hay diferencias significativas entre las especies pero no entre las formas de *N. balechii*.

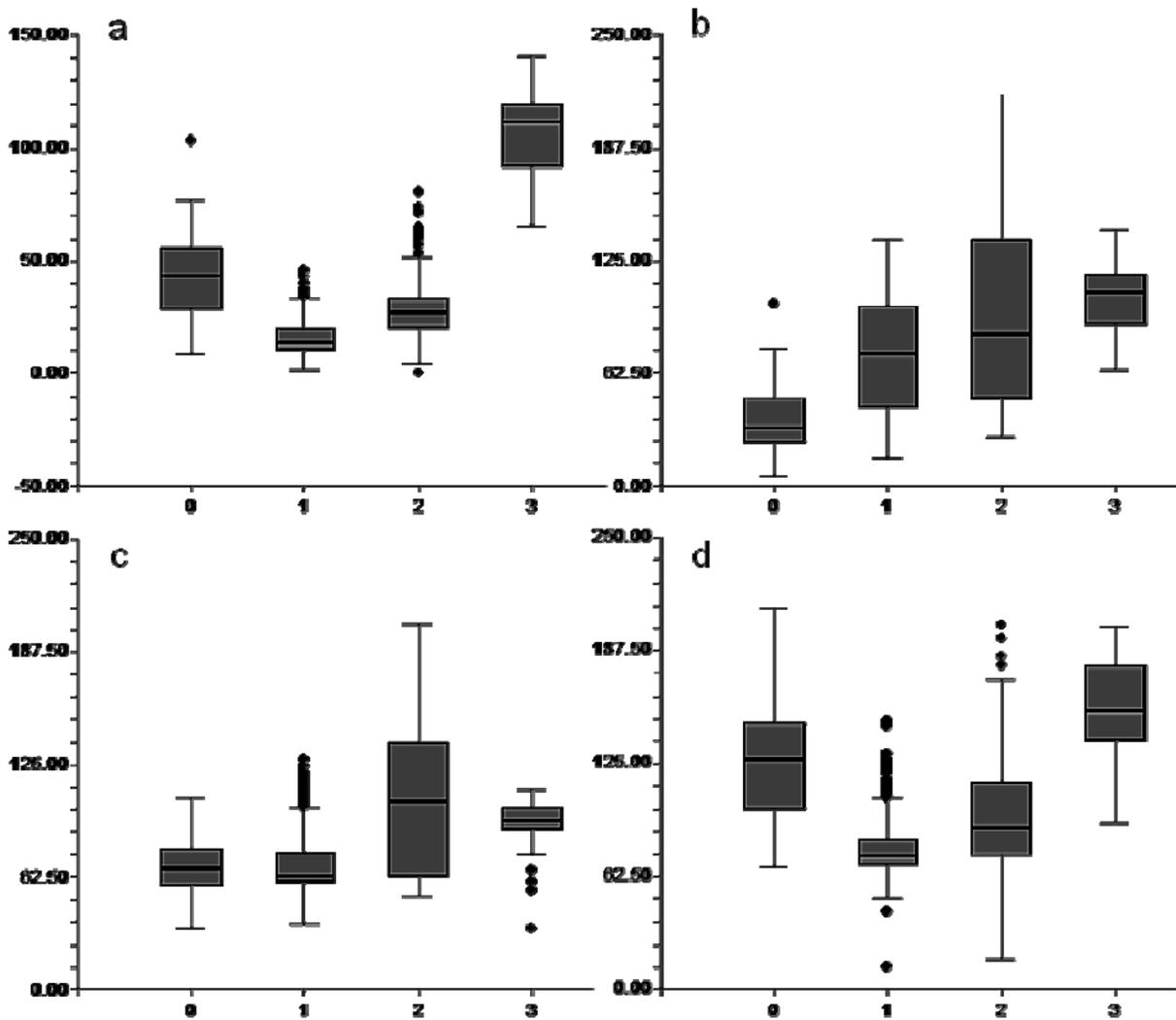


Figura 15. Gráficos de caja y bigote de los caracteres. a) longitud del cuerno antapical derecho, b) longitud del cuerno antapical izquierdo, c) cuerno apical y d) distancia entre cuernos antapicales. 0- *N. divaricatum*, 1-*N. balechii* f. *balechii*, 2-*N. balechii* f. *longum* y 3-*N. longipes*.

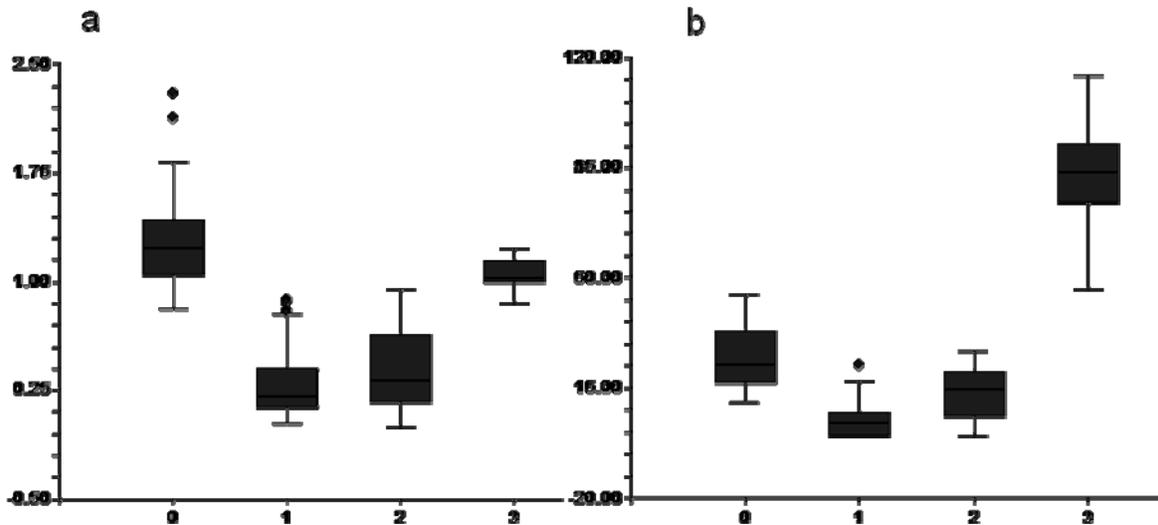


Figura 16. Gráficos de caja y bigote de los caracteres. a) Proporción entre los cuernos antapicales y b) distancia entre la base de la base de la hipoteca a los cuernos antapicales. 0- *N. divaricatum*, 1-*N. balechii* f. *balechii*, 2- *N. balechii* f. *longum* y 3-*N. longipes*.

El dendrograma (Figura 17) resultado del análisis de conglomerados (AC) mostró la formación de tres grandes grupos bien diferenciados, uno de ellos dividido a su vez en dos subgrupos. El grupo **a** formado por *C. balechii* (incluidas sus formas), el **b** por *N. longipes* y el **c** por *N. divaricatum*, evidenciando de esta forma la separación de las 3 especies y validando así los resultados obtenidos con el Análisis de Discriminantes.

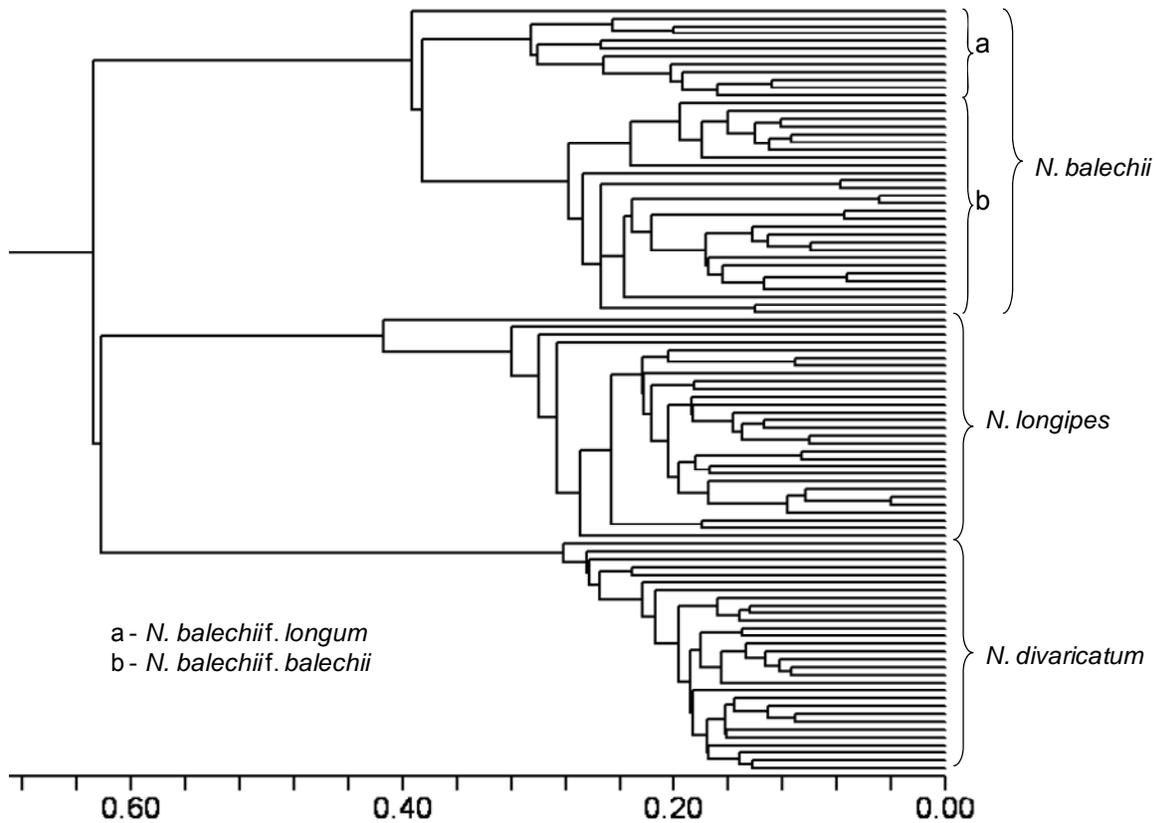


Figura 17. Dendrograma que muestra la asociación de los 4 taxa

El análisis de componente principales (ACP) mostró que con las tres primeras componentes se tuvo una varianza acumulada del 90% del total de la variación de los caracteres morfológicos. En la Figura 18 se puede apreciar la formación de tres grupos diferenciados obtenidos de la combinación de la primera y segunda componente. Las variables más importantes en la separación de las especies, *N. balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes*, fueron: la longitud del cuerno apical (lca), la distancia entre cuernos antapicales (dseca), el transdiámetro (t), la longitud del cuerno antapical izquierdo (lcizq) y la proporción entre cuernos antapicales (rc).

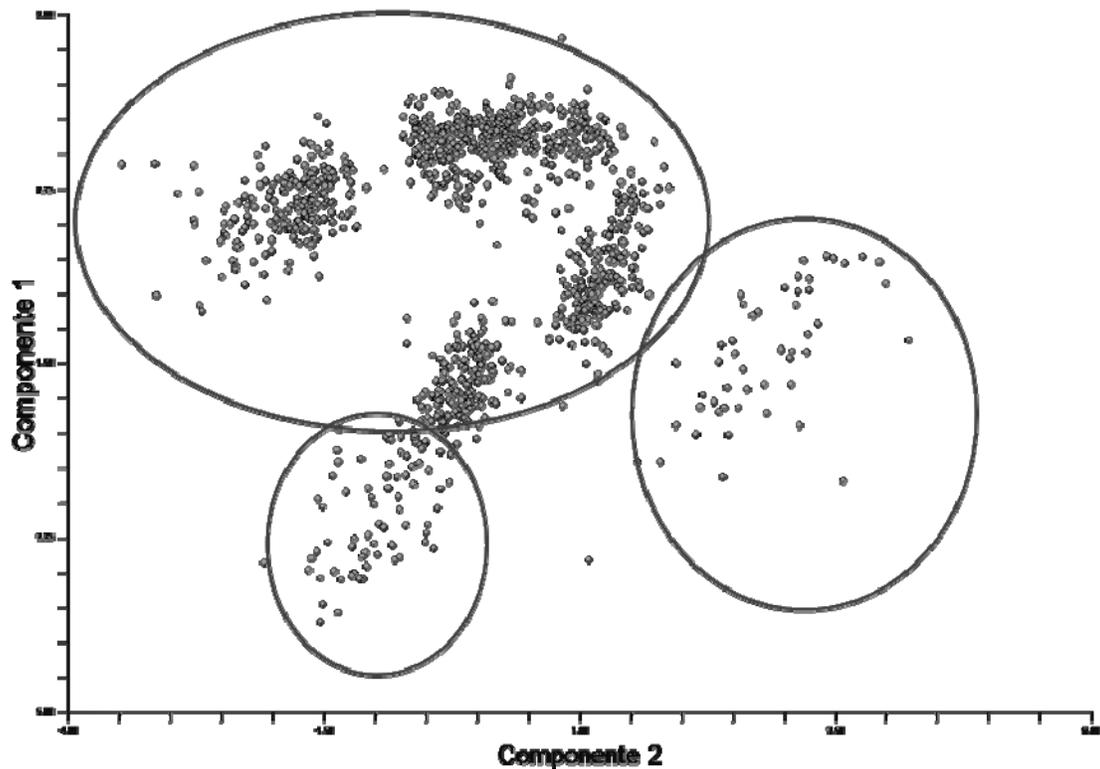


Figura 18. Espacio gráfico del análisis de componentes principales de 3 especies: *N. balechii*, *N. divaricatum* y *N. longipes*, involucradas en los análisis.

Los análisis de discriminantes (AD) mostraron que el conjunto de las variables cuantitativas presentó diferencias significativas hasta la tercera función discriminante con una $p's < 0.00001$ y λ Wilks' < 0.40981 , obteniendo para la separación de los taxa un acierto del 94.6% de casos correctamente clasificados. En la Figura 19 se observa la separación en primer término de las tres especies involucradas en el análisis: *N. balechii* incluyendo sus dos formas (f. *balechii* y f. *longum*), *N. divaricatum* y *N. longipes*. La longitud total (lt), longitud del cuerno derecho (lcder), la proporción entre los cuernos antapicales (rc), la longitud del

cuerno apical (lca) y la distancia entre cuernos antapicales (dseca) fueron los caracteres que mayor asociación presentaron con la primera y segunda función discriminante.

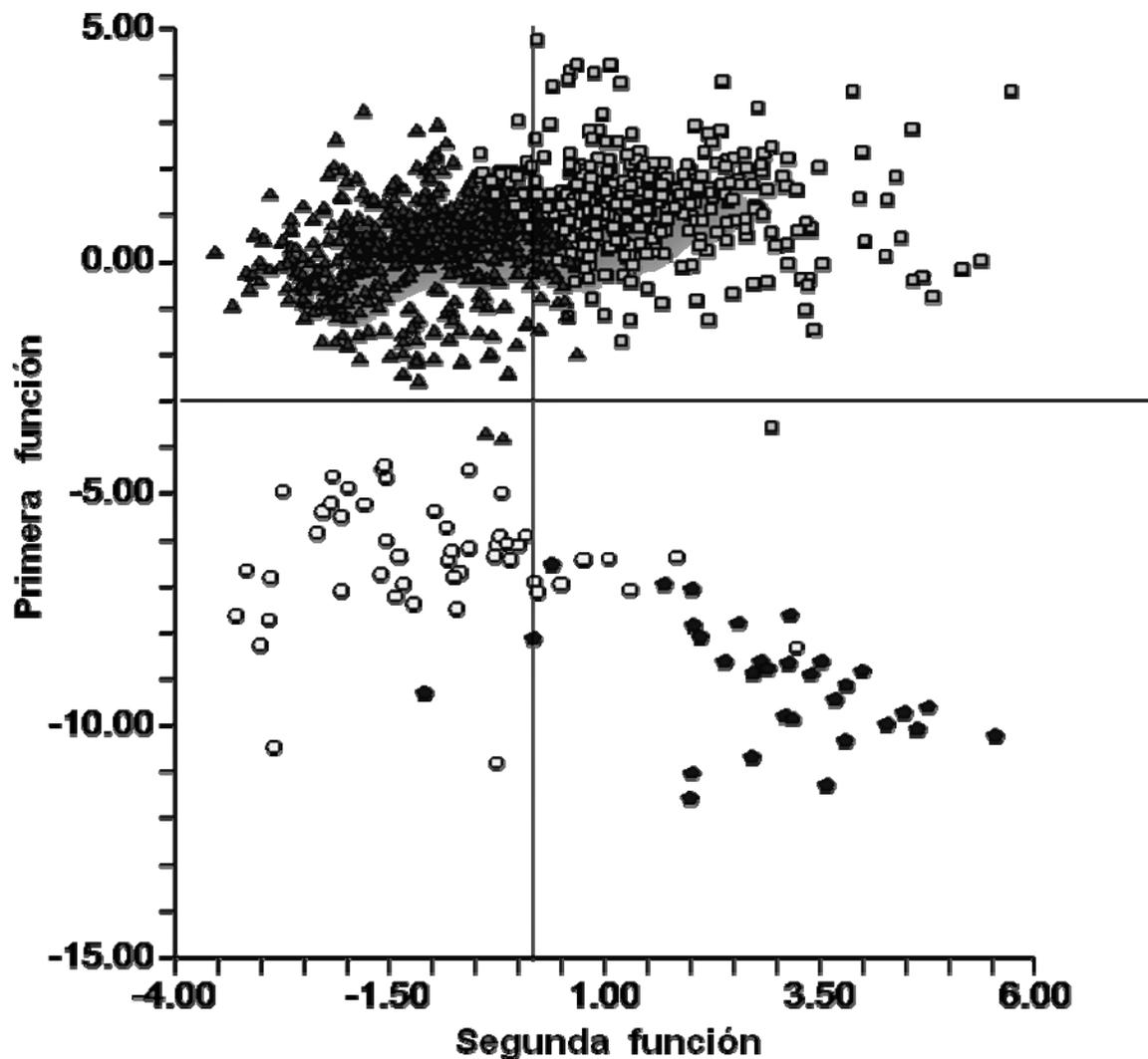


Figura 19. Gráfico resultado del análisis de discriminantes de 3 especie de *Neoceratium*: *N. balechii* ▲ f. *balechii*, □ f. *longum*, ○ *N. divaricatum* y ● *N. longipes*.

En la Figura 20 se puede observar la separación de las 2 formas de la especie *N. balechii* con la combinación de la segunda y tercera función discriminante donde la variable más importante es el transdiámetro (t).

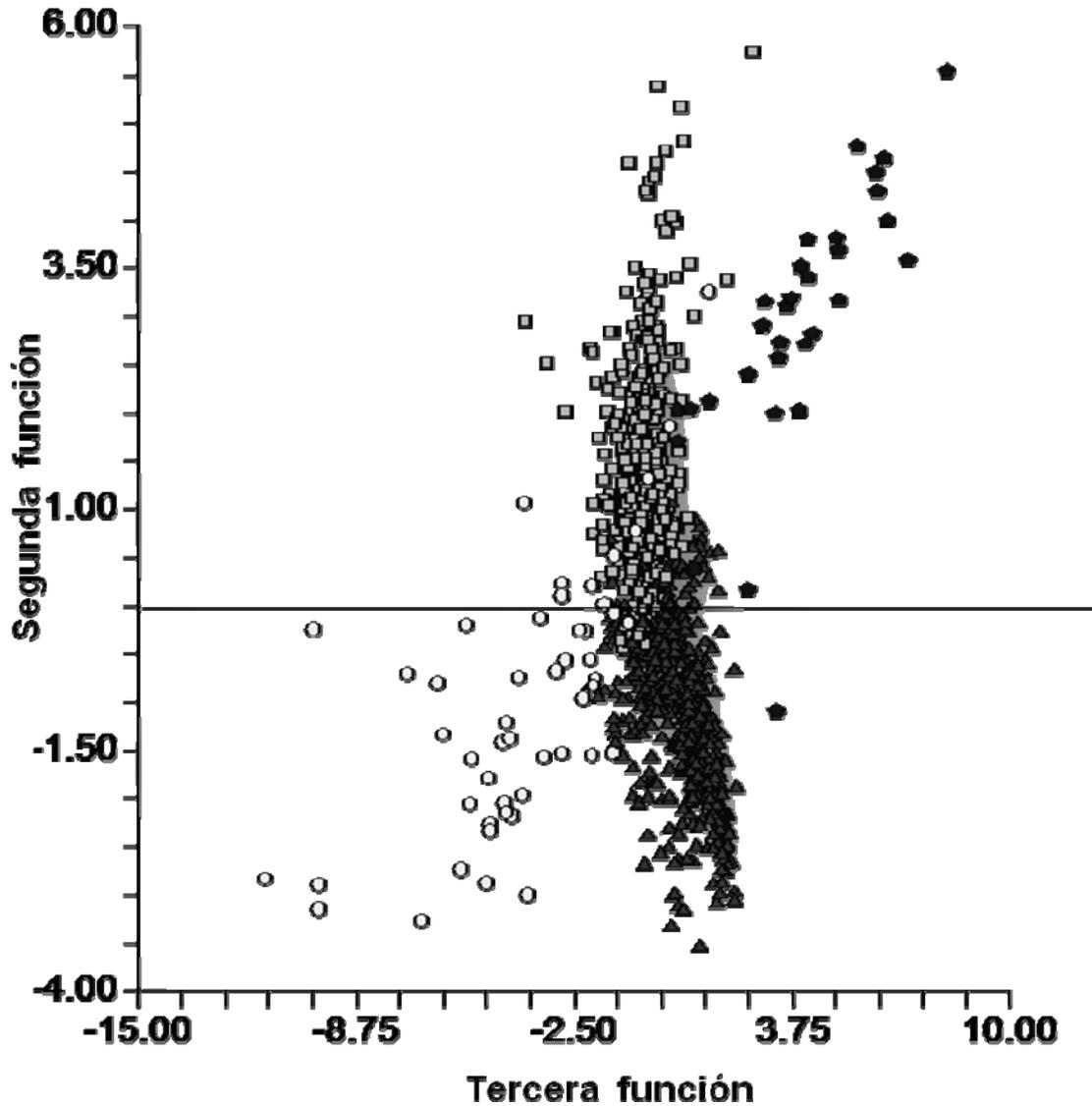


Figura 20. Gráfico resultado del Análisis de Discriminantes de los 4 taxa de *Neoceratium* involucradas en el análisis, evidenciando la separación de las formas de *N. balechii*: f. *balechii* y f. *longum*. *Neoceratium balechii* ▲ f. *balechii*, □ f. *longum*, ○ *N. divaricatum* y ● *N. longipes*.

El AD que involucró ya el conjunto de las 8 variables utilizadas en los análisis con una $n=100$ mostrarán diferencias significativas entre los taxa para las tres funciones discriminantes ($p's < 0.00005$ y una λ Wilks < 0.42759), presentando esta separación un 100% de casos correctamente clasificados. En este espacio gráfico se observa de igual forma la separación de las especies. Las variables que presentaron mayor asociación con la primera y segunda función discriminante (Figura 21) fueron: la distancia entre la base de la hipoteca a los cuernos antapicales (dbhc), la longitud del cuerno antapical derecho (lcder), la longitud del cuerno antapical izquierdo (lcizq) y la proporción entre cuernos antapicales (rc).

Del mismo modo los resultados del AD, con una $n=100$, hizo posible la separación de las formas de *N. balechii*, con la combinación de la primera y tercera función discriminante (Figura 22) siendo las variables más importantes: dbhc, lcizq, lcder y la longitud del cuerno apical (lca). Esta nueva combinación de las funciones discriminantes se debió a la inclusión de la nueva variable (carácter dbhc).

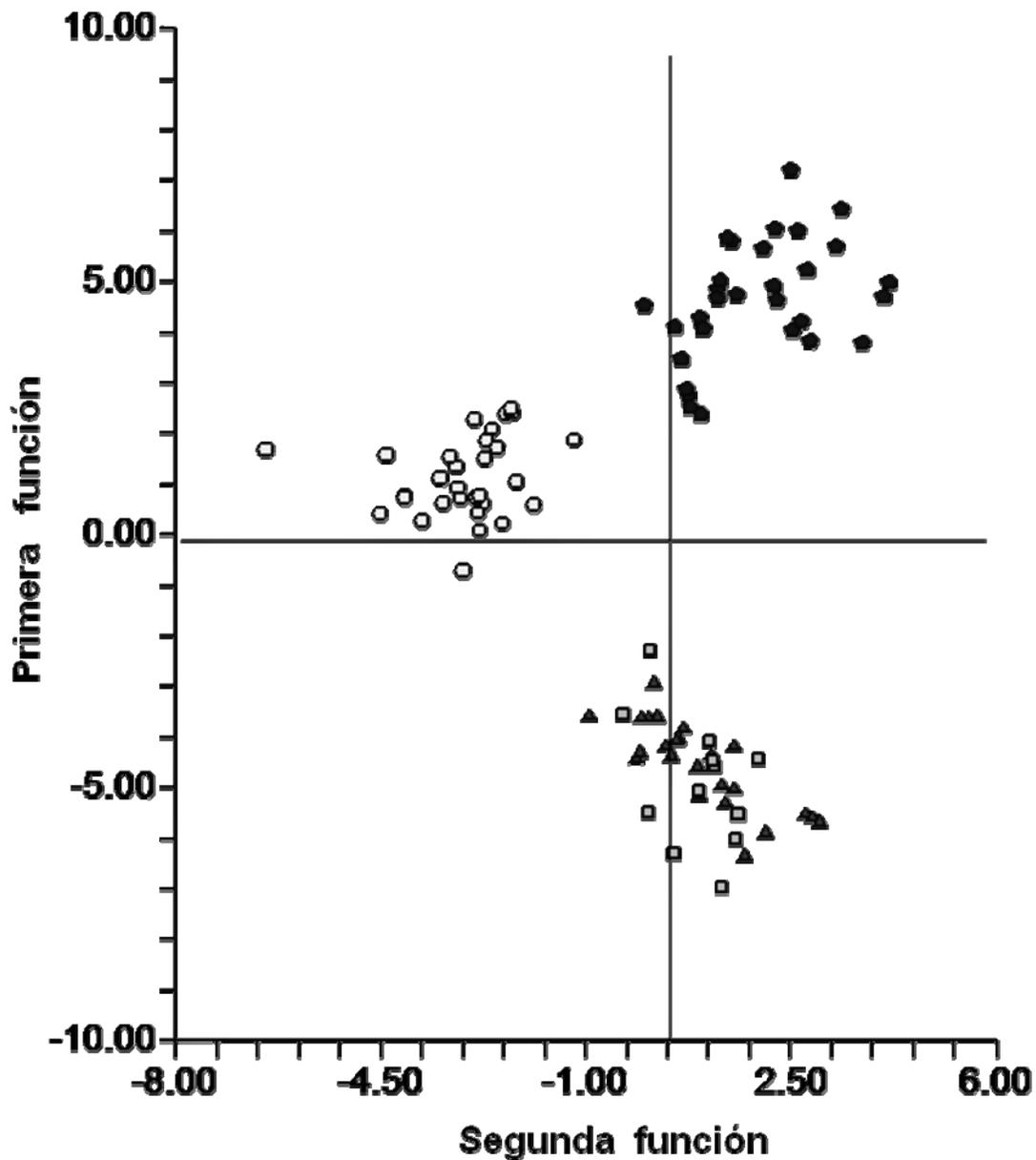


Figura 21. Gráfico resultado del análisis de discriminantes de las especies de *Neoceratium*, reduciendo la n=100 e incluyendo el carácter distancia de la base de la hipoteca a los cuernos antapicales (dbhc). *Neoceratium*: *N. balechii* ▲ f. *balechii*, □ f. *longum*, ○ *N. divaricatum* y ● *N. longipes*.

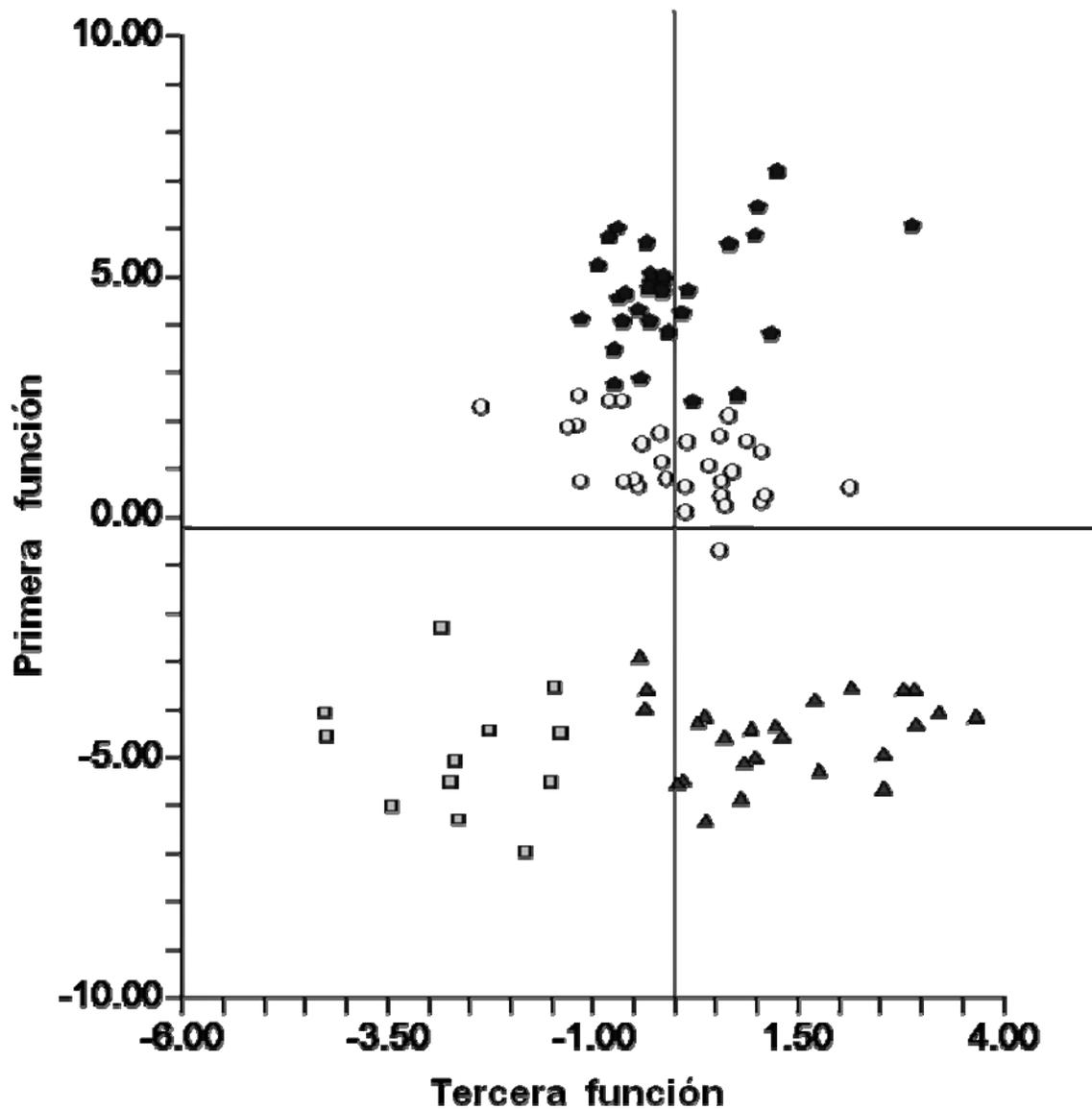


Figura 22. Gráfico resultado del análisis de discriminantes de los taxa de *Neoceratium*, con una n=100 e incluyendo el carácter dbhc, evidenciando así la separación de las formas de *N. balechii*. *Neoceratium balechii* ▲ f. *balechii*, □ f. *longum*, ○ *N. divaricatum* y ◆ *N. longipes*.

Sucesión de formas en *Neoceratium balechii* en un ciclo anual en la bahía de Mazatlán, Sinaloa. Las muestras de fitoplancton marino colectadas con red y fijadas con formol de la Bahía de Mazatlán con red colectadas en el año 1999 se fotografiaron un total de 14 ejemplares de *N. balechii* f. *balechii* y 55 de *N. balechii* f. *longum*; mientras que para el año 2000 se fotografiaron 95 y 86 ejemplares de cada forma respectivamente. La temperatura del agua vario entre los 19 y los 30 °C. Durante el periodo de 1999 a 2000 *C. balechii* no formó ningún florecimiento en la Bahía de Mazatlán, sin embargo fue más abundante durante el año 2000, en especial en los meses de mayo y de agosto a octubre; siendo menos abundante de noviembre a diciembre e incluso no apareciendo durante enero a marzo. En el año 1999 *N. balechii* estuvo ausente durante los meses de enero, septiembre, octubre y diciembre. Para poder mostrar estos resultados se conformaron las Tablas 7 y 8 con las frecuencias relativas de cada una de las formas de *N. balechii* para cada temperatura registrada, considerando ambos años. En la grafica de la Figura 23, se observa que ambas formas se excluyen progresivamente entre sí, lo cual apoya la idea de la transformación de la población bajo la hipótesis de que la temperatura sí pudiera ser la responsable de la transformación de una forma a otra, fenómeno concuerda con el concepto de Ciclomorfismo propuesto por Margalef (1974).

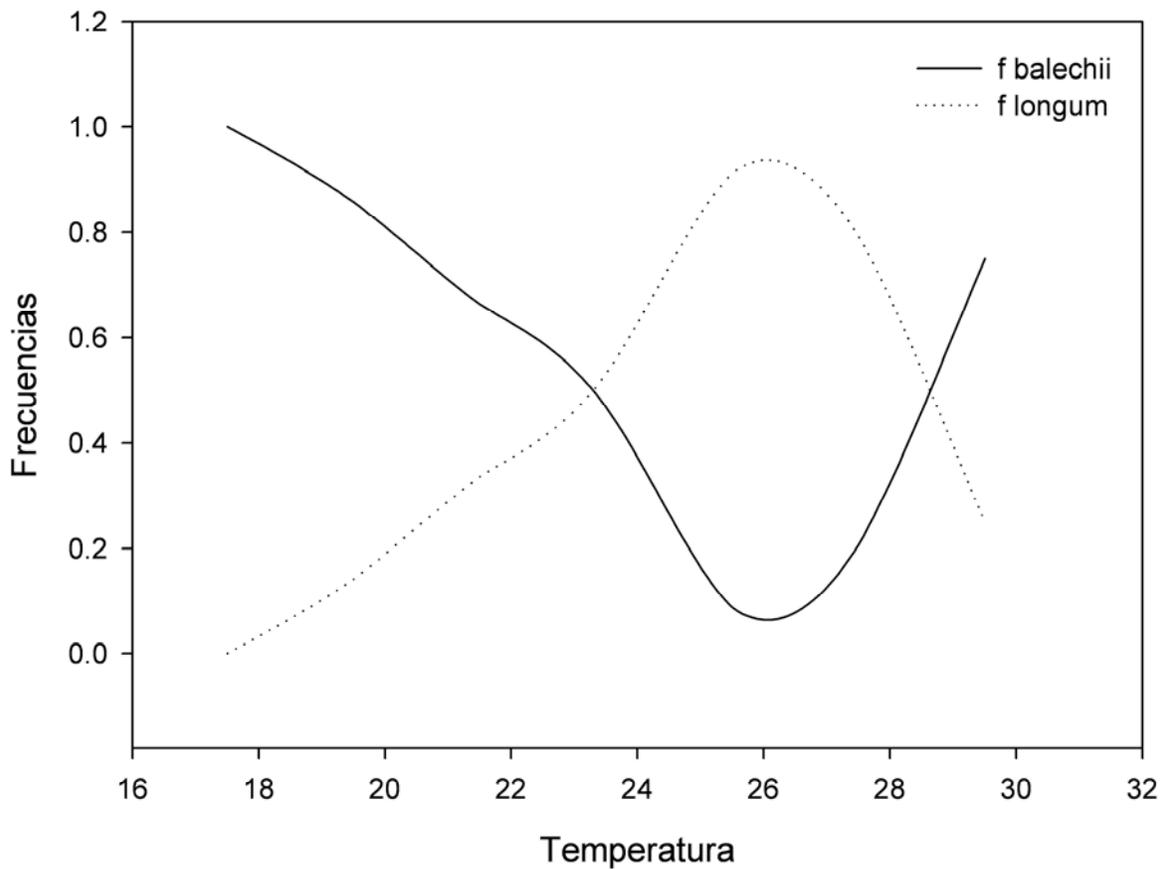


Figura 23. Frecuencias relativas de las formas de *N. balechii* en relación a la temperatura en los años 1999-2000.

Los resultados del ACP aplicados al ciclo bianual de *N. balechii* mostraron que con las tres primeras componentes se tenía una variación acumulada del 94.34%, siendo los siguientes caracteres los que proveen más información: distancia entre cuernos antapicales (dseca), longitud cuerno apical (lca) y transdiámetro (t). En la gráfica de la Figura 24 se observa la formación de dos grupos.

Los resultados del AD aplicado a las formas de *N. balechii* mostraron diferencias significativas para el conjunto de las variables con una $p's < 0.0005$, λ Wilk's = 0.29813 con un 95.8% de los casos correctamente clasificados. En la Figura 25 se muestran las frecuencias de los puntajes ("scores") para cada especie, producto de este análisis. En este caso las variables más importantes para la diferenciación de las formas fueron: longitud total (lt), transdiámetro (t) y la distancia entre cuernos antapicales (dseca).

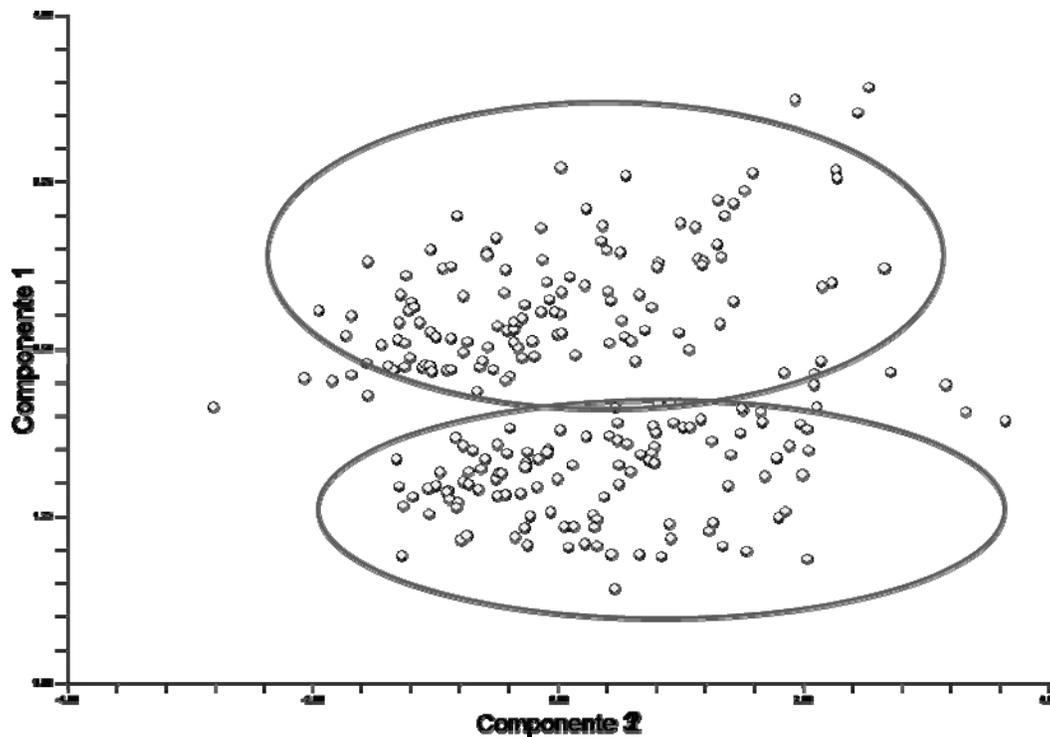


Figura 24. Espacio gráfico del análisis de componentes principales de las formas de *N. balechii* en los años 1999-2000.

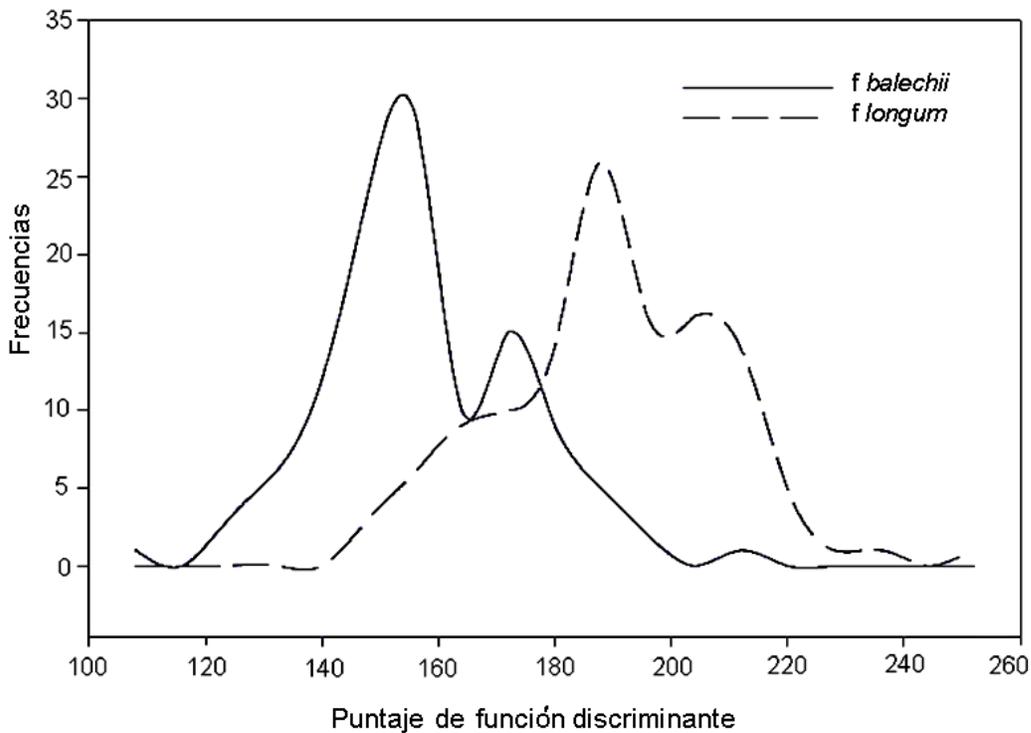


Figura 25. Gráfico de los puntajes obtenidos del análisis de discriminantes de las formas de *N. balechii* en los años 1999-2000.

Tabla 7. Abundancias relativas en % de *Neoceratium balechii* respecto a sus formas a lo largo de 1999 en la bahía de Mazatlán.

MES (1999)	<i>f balechii</i>	<i>f longum</i>
Enero	-	-
Febrero	2	-
Marzo	1	-
Abril	1	-
Mayo	-	2
Junio	32	100
Julio	10	42
Agosto	3	42
Septiembre	-	-
Octubre	-	-
Noviembre	-	14
Diciembre	-	-

Por otra parte, para investigar más a fondo la influencia de la temperatura de la columna de agua en la expresión de las formas de *N. balechii*, se hizo un AD de las formas, considerando el mes en que se presentaban cada una de ellas (Figura 26), encontrándose que con la tercera función discriminante se tenía una varianza acumulada del 91.1% con $p's < 0.00001$ y λ Wilk's < 0.64203 . La primera función principalmente correlacionada con la longitud del cuerno antapical derecho (lcder) y el cuerno antapical izquierdo (lcizq), así como por la longitud total (lt), mientras que la segunda función lo estuvo con la distancia entre los cuernos antapicales (dseca) y el transdiámetro (t), esta combinación se muestra en la Figura 26 en donde se observa la formación de dos conjuntos bien diferenciados, por un lado el de la temporada de junio a septiembre junto con el mes de febrero, en donde predomina la forma *longum* (superando las 215 μm de longitud total) y en los meses de abril–mayo y octubre–noviembre, con longitudes menores a las 200 μm . Con todo lo anterior se confirma la transición o transformación que sufre especie a lo largo del tiempo (ciclomorfismo). *Neoceratium balechii* f. *longum* se presentó en los meses más cálidos de junio a octubre con una temperatura de 25-28 °C mientras que *N. balechii* f. *balechii* se aparece con temperaturas de 18 a 22 °C en los meses de octubre a mayo.

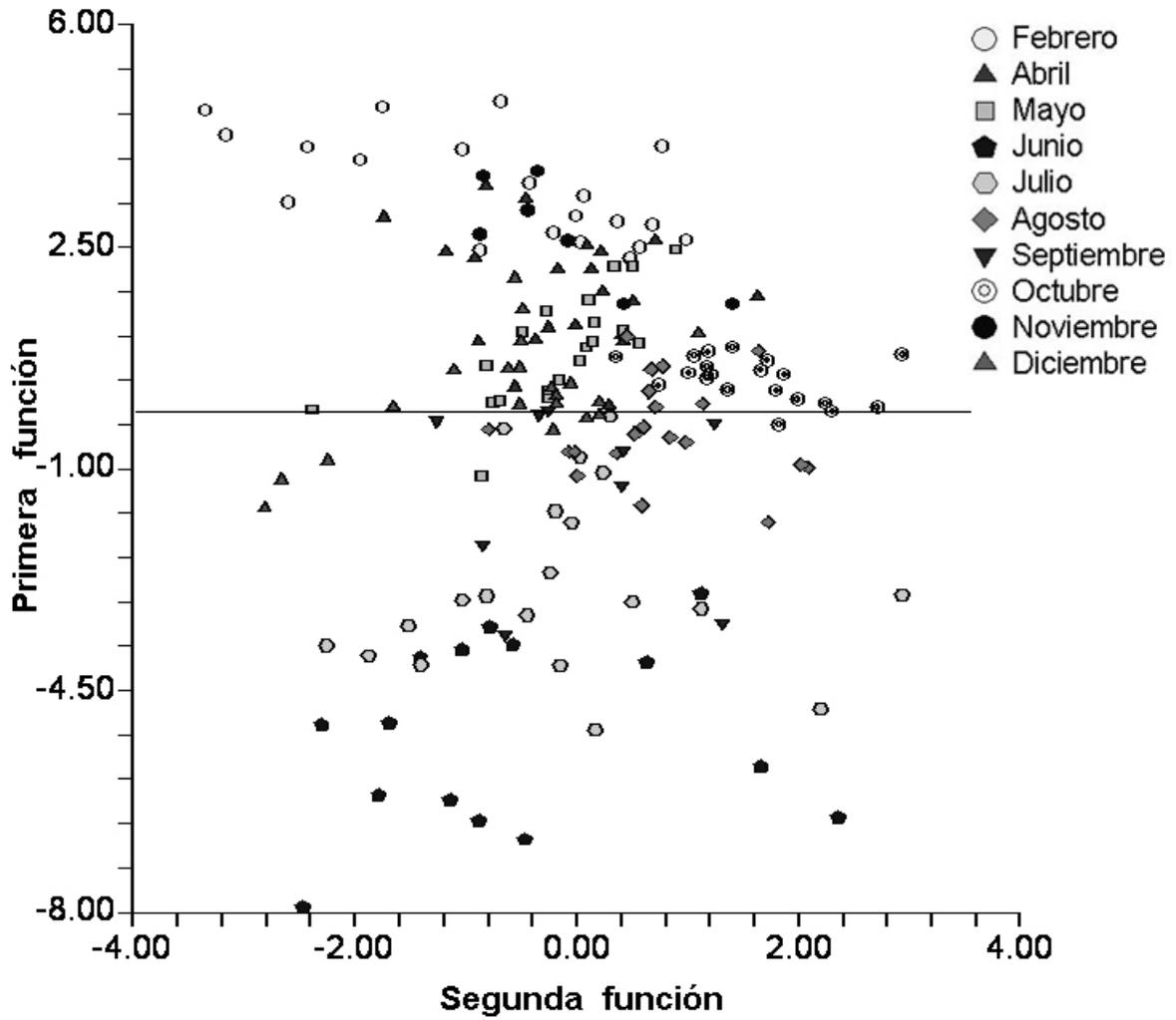


Figura 26. Gráfico resultado del AD de los meses de los años 1999 y 2000 las formas de *N. balechii* (*f. balechii* y *f. longum*) en bahía Mazatlán.

Tabla 8. Abundancias relativas en % de *Neoceratium balechii* respecto a sus formas a lo largo del 2000 en la bahía de Mazatlán.

MES (2000)	f <i>balechii</i>	f <i>longum</i>
Enero	-	-
Febrero	31	6
Marzo	-	-
Abril	52	26
Mayo	72	88
Junio	-	45
Julio	5	45
Agosto	77	26
Septiembre	6	21
Octubre	43	100
Noviembre	15	6
Diciembre	44	44

Toda vez que los valores medios de las temperaturas en las que se presentaban las formas de *N. balechii* son diferentes pero que algunas muestras se reconocieran ambas formas se decidió aplicar un ANOVA para saber si existían diferencias significativas entre dichas temperaturas. La ANOVA mostró diferencias significativas con una $p < 0.0001$ en la figura 27 y tabla 9.

Debe tomarse en cuenta, que durante el periodo de muestreo de 1999 se presentó el Fenómeno del Niño, provocando un incremento mínimo en la temperatura de la columna de agua lo cual pudo haber causado la ausencia de la especie en varios meses de este año.

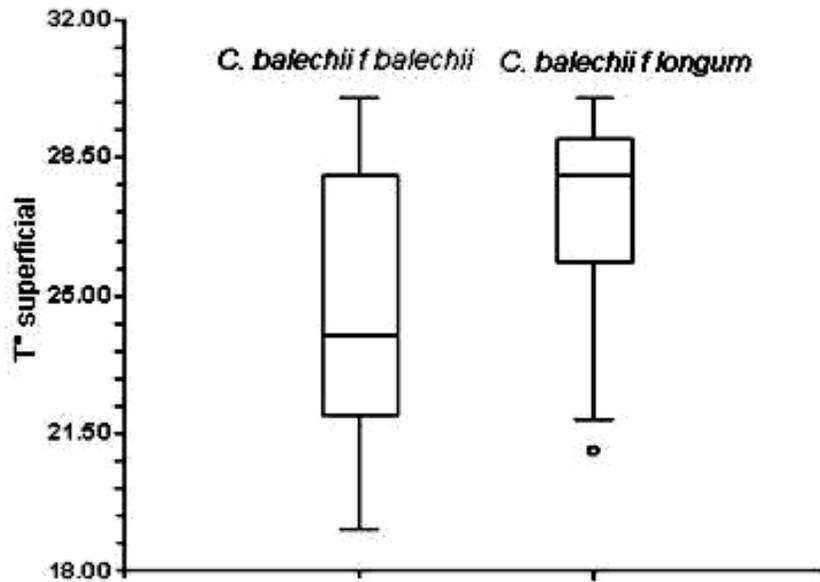


Figura 27. Variación de la la temperatura a la que se presentaron las dos formas de *N. balechii* en la bahía Mazatlán durante el ciclo 1999-2000.

Tabla 9. Intervalo de temperatura superficial (InTS), media (M) y desviación estándar (Ds) presentes en la columna de agua con respecto a las formas.

Variable	InTS °C	M °C	Ds °C
1 <i>C. balechii</i> f <i>balechii</i>	18 – 29	24.08	3.15
2 <i>C. balechii</i> f <i>longum</i>	22 – 29	27.03	2.20

Comportamiento regional de *Neoceratium balechii* en el Pacifico Oriental.

En la Figura 28 se muestra la gráfica resultado del ACP al analizar las localidades de las muestras, se observa la formación de al parecer 2 grupos diferenciados, teniendo con las tres primeras componentes una variación acumulada del 85.82%. La primera componente estuvo principalmente determinada por los siguientes caracteres: longitud del cuerno apical (lca), la proporción de los cuernos antapicales (rc) y el transdiámetro (t), la segunda componente por la longitud del cuerno antapical derecho (lcder) y la longitud total (lt), y la tercera por la combinación de la localidad y forma, así como por la proporción entre cuernos antapicales (rc).

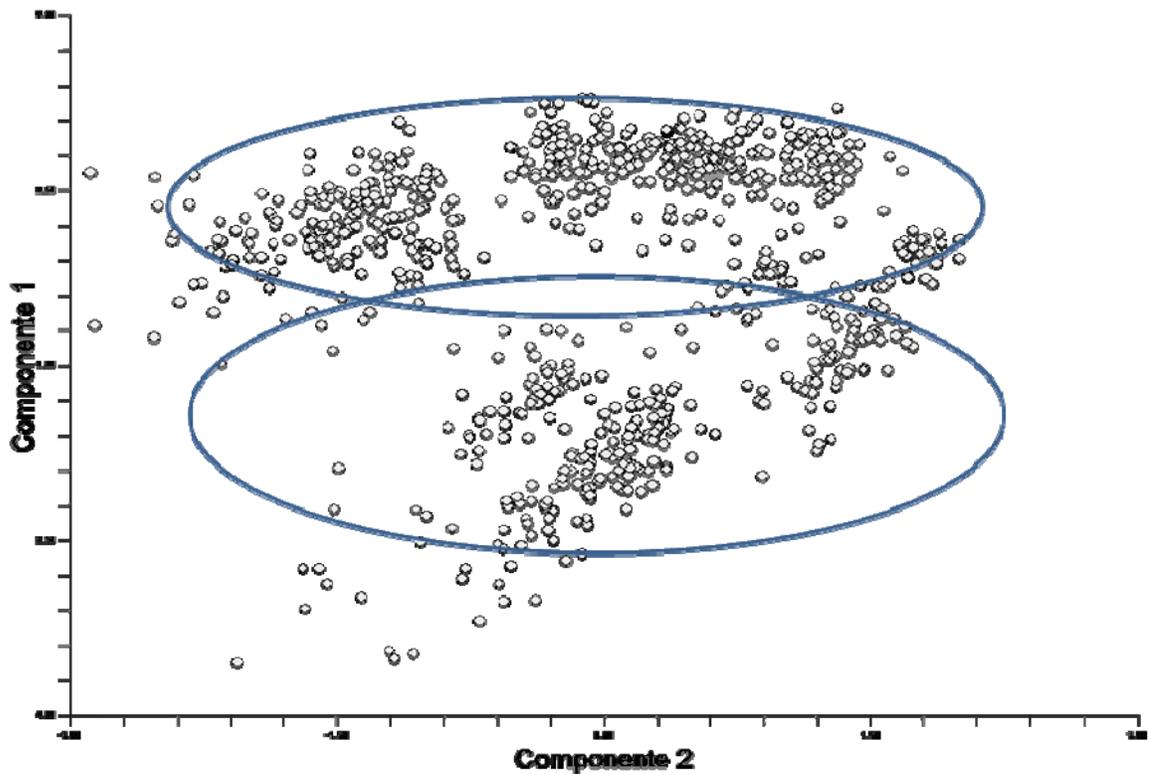


Figura 28. Grafico resultado del ACP de las localidades de las muestras.

Para darle peso y sentido a los resultados anteriores, se presenta el espacio grafico del AD aplicado (Figura 29) en donde se observa la separación de dos grandes grupos. Dicho análisis presenta diferencias significativas con una $p's < 0.0001$, una $\lambda < 0.47853$, con el 97% de la varianza acumulada hasta la segunda función discriminante. En donde la primera función estuvo más influenciada por las variables: proporción de los cuernos antapicales, transdiámetro (t) y longitud del cuerno apical (lca) y la segunda por: longitud total (lt) y longitud del cuerno antapical izquierdo (lcizq) y derecho (lcder). El grupo **a** correspondió a las localidades de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca mientras que el **b** a Baja California, Sinaloa, Costa Rica y Perú.

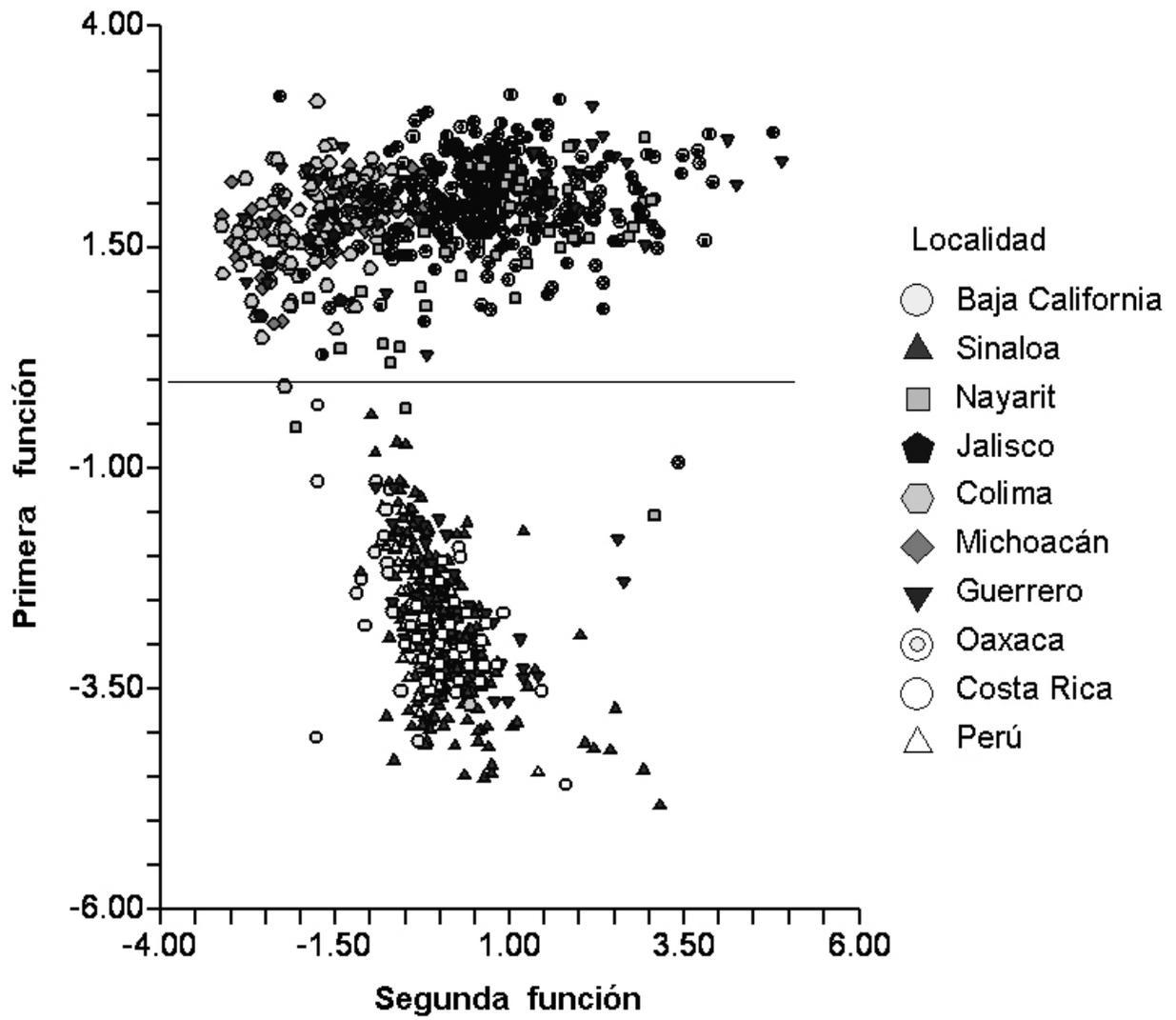


Figura 29. Gráfico resultado del AD de las localidades de las muestras.

ANÁLISIS MOLECULAR.

Se realizó la técnica de PCR a 24 muestras congeladas en agua destilada (16 de *N. balechii*, 3 de *N. macroceros*; 5 de *C. longipes* y 3 muestras congeladas en metanol de *N. balechii*), aunque sin éxito en la amplificación. De *N. divaricatum* nunca se contó con muestras viva.

Como paso previo a la amplificación de las secuencias de ITS, se intentó extraer el ADN, rompiendo las células de acuerdo a los protocolos de extracción a pequeña escala (Fernández, 1997; Marin *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001 y Edvarsen *et al.*, 2003). Posteriormente se procedió a realizar la técnica de PCR con estas muestras para amplificar ADN con el método de Chen *et al.* (2001).

A lo largo del desarrollo de este trabajo encontramos dificultades para la no obtención de ADN de las células (ya que en los geles de agarosa al 0.7%, no se obtuvo alguna banda que indicara la presencia de ADN de las muestras). Al realizar la amplificación directa de las células congeladas y al correr un gel para comprobar amplificación, tampoco presentó ninguna evidencia de ADN.

9. DISCUSIONES

Morfología de las especies.

Dentro de los análisis de componentes principales (ACP) y de discriminantes (AD), los caracteres que sirven mejor en la delimitación de las especies fueron: la longitud total, la longitud del cuerno antapical derecho, la proporción de la longitud de los cuernos antapicales y la longitud del cuerno apical.

LA longitud total es un carácter que ayuda a diferenciar a la especie *Neoceratium balechii* es la especie de mayor tamaño con relación a *N. divaricatum* y *N. longipes*, presentando un intervalo de medida de la longitud total (lt) entre 120-333 μm , mientras que *Neoceratium divaricatum* de 82-192 μm y *N. longipes* (la especie más pequeña) de 68-177 μm (Figura 30).

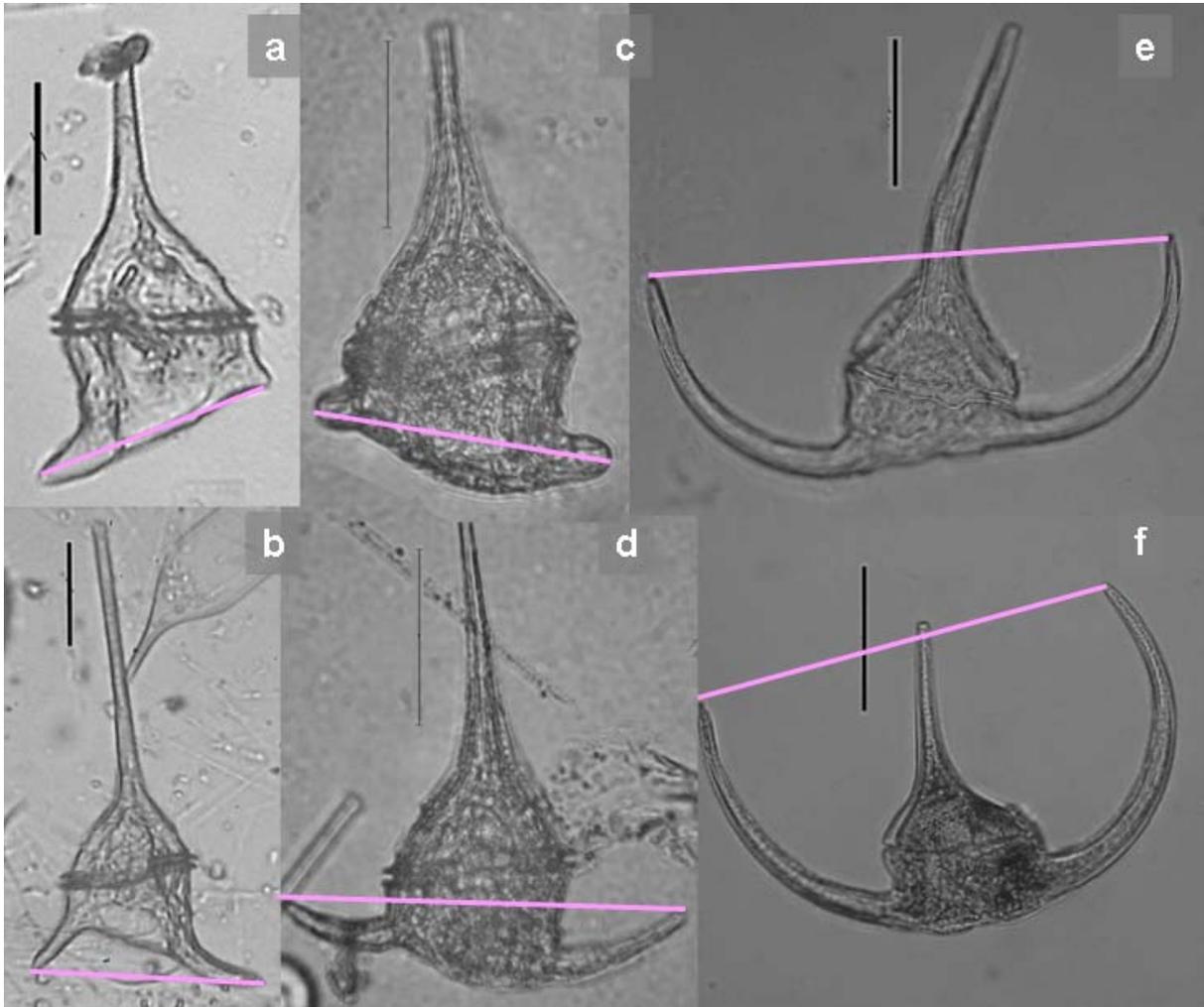


Figura 30. Ejemplares de las tres especies involucradas en los análisis. a-b) *C. balechii*, c-d) *C. divaricatum* y e-f) *C. longipes*. a y e) vista dorsal y b, c, d y f) vista ventral. Escala 50μm.

La longitud mínima en *N. divaricatum* en el cuerno antapical derecho es de 100 μm, seguido de *N. longipes* con una longitud de 142 μm y por último 217 μm en *N. balechi*. Mientras que, la máxima longitud en el cuerno antapical izquierdo ocurrió en *N. longipes* con 140 μm, seguido de *N. divaricatum* con 103 μm y por último *N. balechii*, con apenas 80 μm. Si bien la longitud de los cuernos antapicales es importante para la delimitación de las especies, como ya se mencionó

anteriormente, es aún más importante la combinación de este carácter con la orientación de los mismos, haciendo posible las siguientes aseveraciones:

En *N. balechii* sólo el cuerno antapical izquierdo se separa del cuerpo celular con dirección lateral tal vez un poco hacia la parte apical del organismo pero nunca tan marcado como en las otras especies donde este sobrepasa el nivel del cíngulum como en las otras dos especies, con una longitud máxima de 217 μm . Por otro lado, el cuerno antapical derecho sigue una trayectoria posterior continuando incluso en ejemplares que presentan los cuernos más largos (hasta de 80 μm). Debido al fenómeno de autotomía simultánea, que ocurre en esta especie (Meave *et al.*, 2003), los dos cuernos antapicales pueden estar ausentes e incluso haber indicios de ellos con la presencia de un muñón (Figura 31), teniendo una proporción entre los cuernos desde 0.02 hasta 0.9.

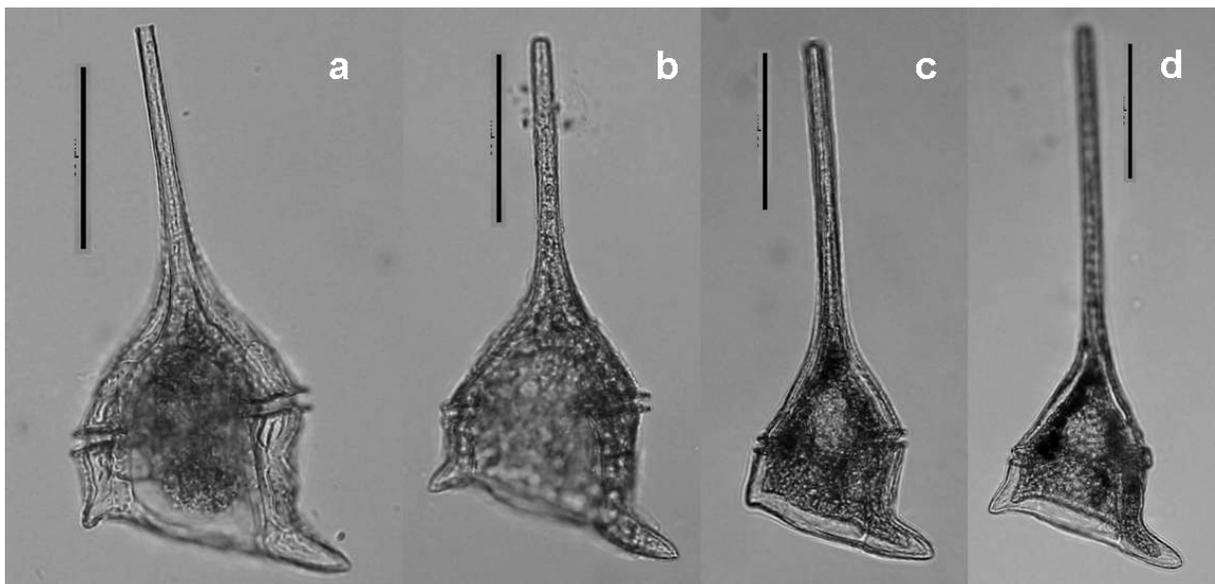


Figura 31. Evidencia de la reducción en muñón de los cuernos antapicales de *Ceratium balechii* cuando estos sufren autotomía. a) , b), c) y d) . Escala 50 μm .

En *N. divaricatum* los dos cuernos se separan del cuerpo celular primeramente de manera lateral y más tarde se dirigen hacia la parte apical del organismo, manteniendo una dirección paralela al cuerno apical. El cuerno antapical derecho con una longitud máxima de 100 μm y el izquierdo de 103 μm , con una proporción entre ellos que va de 0.8 a 2.3. Se ha señalado que esta especie también presenta el fenómeno de autotomía (Kofoid, 1908) y los cuernos en muñón nunca son menores a 5 μm (Figura 32).

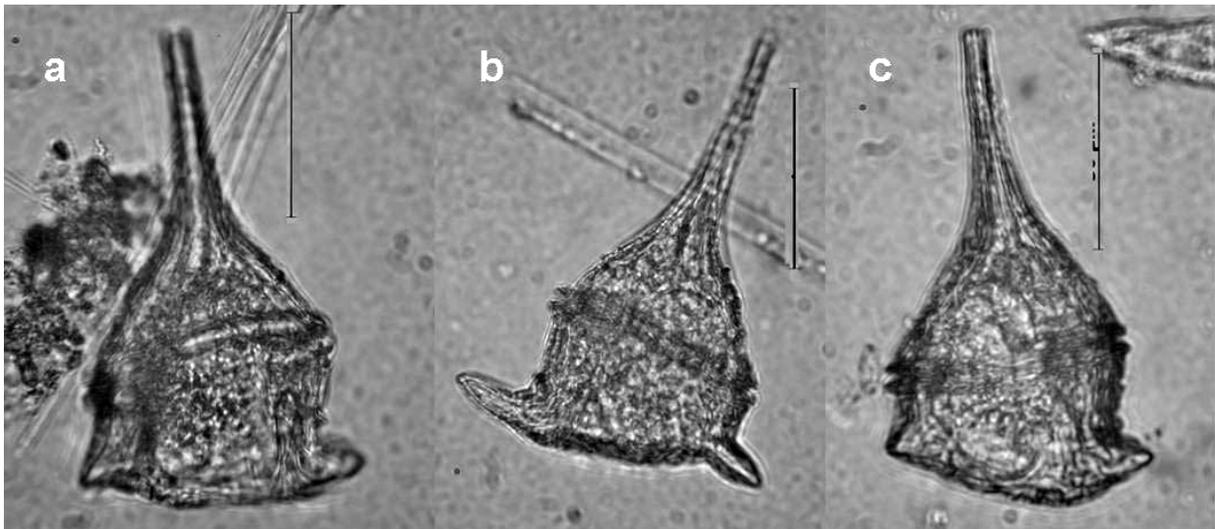


Figura 32. Evidencia de la reducción en muñón de los cuernos antapicales de *Ceratium divaricatum* cuando estos sufren autotomía. Ensenada a y c) vista ventral y b) vista dorsal. Escala 50 μm .

Los cuernos antapicales de *N. longipes* surgen con una dirección latero-apical al igual que *N. divaricatum* pero rápidamente se dirige hacia la porción apical con un crecimiento en forma paralela al cuerno apical. Los cuernos antapicales llegan a tener una longitud máxima de 140 μm y una mínima de 64 μm . Ambos cuernos son muy parecidos entre sí y no se observó que éstos se reduzcan a un simple

muñón, por lo que al parecer no sufren autotomía; la proporción de la longitud entre ambos cuernos antapicales fue de entre 0.85 a 1.22 (Figura 33).

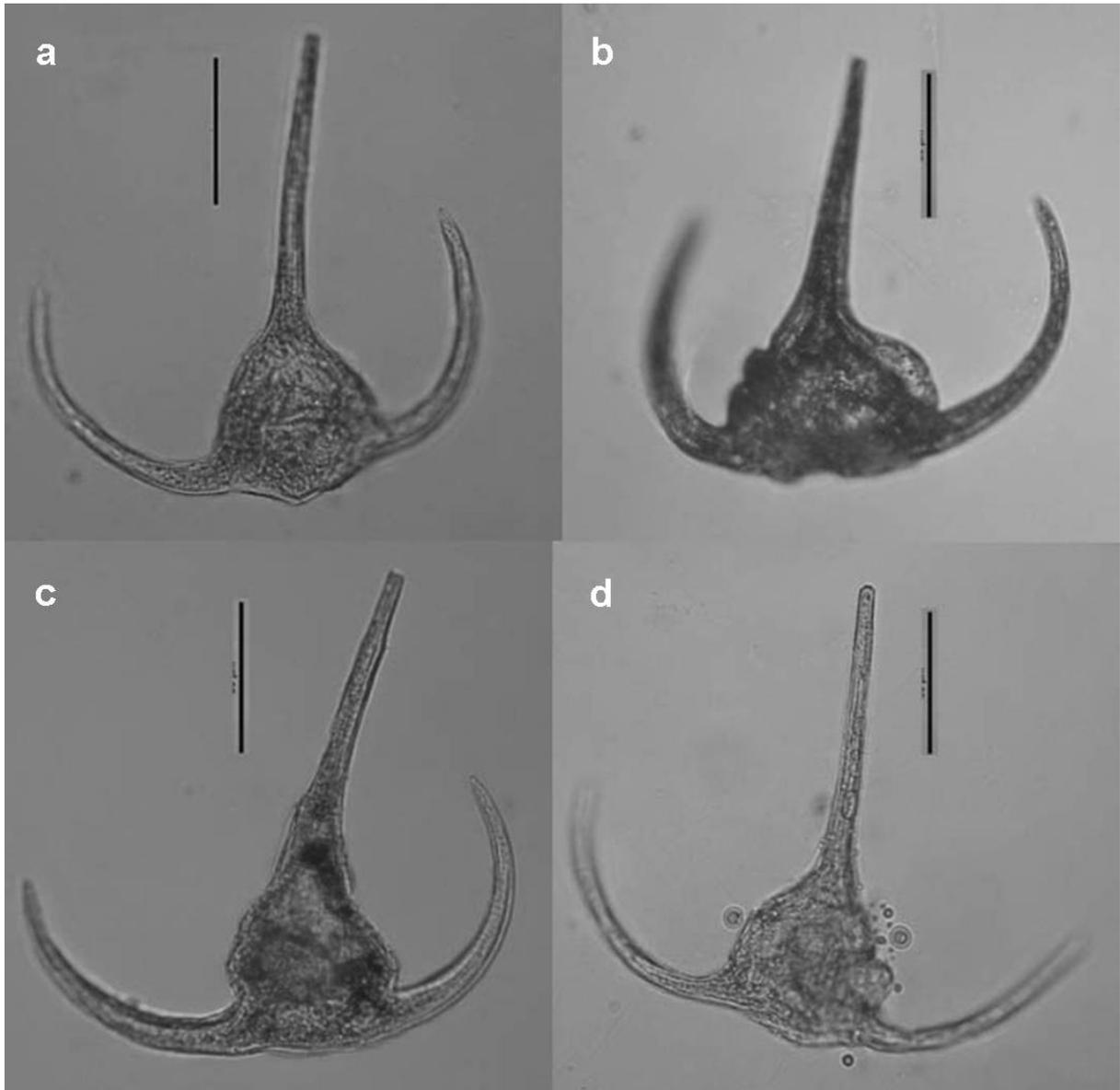


Figura 33. Evidencia de la especie *Neoceratium longipes* no presenta el fenómeno de autotomía, por lo que los cuernos antapicales siempre son visibles y no se presentan en muñón. Escala 50 μm .

En *N. balechii* la distancia entre los cuernos tuvo una longitud máxima de 201 μm , aunque cuando los cuernos estaban reducidos a muñon este carácter se mantiene entre 12 y 16 μm . Lo anterior no ocurrió en *N. divaricatum* y *N. longipes*, ya que en el primero la distancia entre los cuernos antapicales tuvo un intervalo de 67 μm a 211 μm , mientras que en *C. longipes* presentó un intervalo de la distancia entre los cuernos entre 92 a 200 μm .

Aunque la distancia entre la base de la hipoteca a los cuernos antapicales sólo se midió en 30 ejemplares de cada especie estudiada, este carácter resultó muy importante para diferenciar a las 3 especies, ya que al observar una y otra vez las fotografías de los ejemplares se apreció que en este carácter la variación es muy marcada entre las especies objeto de estudio.

En *N. balechii* la base de la hipoteca siempre quedó por abajo de la línea trazada entre la punta de los cuernos antapicales, considerándose como negativa esta medida (Figura 30a-b). En la forma *balechii* este carácter tiene un intervalo de -4 a -14 μm y la f. *longum* uno de -17 a -27 μm . Por el contrario *N. divaricatum* tiene un intervalo de 10-74 μm y *C. longipes* de 47-114 μm , para ambas especies la medida es positiva ya que la línea de la distancia de los cuernos antapicales (dbchc) se mantuvo por arriba de la base de la hipoteca (Figura 30c-f).

El transdiámetro (t) resultó ser un carácter que aportó poca información para la diferenciación de las especies estudiadas, pero cabe resaltar que en *N. balechii* éste puede cambiar en relación a la longitud total (lt) por lo cual tiene alguna

diferenciación en las formas. Del mismo modo la longitud del cuerno apical (lca) sólo pareció ser un carácter importante para diferenciar a las formas. No habiendo diferencias significativas entre las longitudes entre las especies.

Tomando en cuenta el dendograma de la Figura 17, todos los organismos de *N. balechii* se agrupan entre sí y se separan de *N. divaricatum* y *N. longipes*. Por lo que se puede concluir que *N. divaricatum* y *N. longipes* son más similares ya que comparten varias características como son su longitud total y la longitud de los cuernos apicales y antapicales, así como la dirección de los cuernos antapicales.

Morfología de las distintas formas de *N. balechii*.

Teniendo como referencia los datos de la matriz de estructura resultante del AD, la combinación de la primera y tercera función discriminante puede separar a las formas de *N. balechii*, con base en los caracteres: longitud total (lt), longitud del cuerno apical (lca) y la distancia entre los cuernos antapicales (dseca), encontrando que ha este nivel se separan bien las formas quedando en una forma conspicua la etapa de transición de las formas.

Dentro de las formas de la especie *N. balechii*, lo reportado Meave *et al.* (2003), para la longitud total de la f. *balechii* el intervalo es de 120 μm a 215 μm y la f. *longum* de 128 μm a 312 μm , que comparado con lo obtenido en este trabajo específicamente en la f. *longum* se propone ajustar el intervalo de 128 μm a 333

µm. Con esto se puede concluir que la especie es sumamente variable y seguramente ni en este estudio se haya detectado toda la variación.

El cuerno apical tuvo una gran variación entre las formas de *N. balechii*, hecho que a simple vista podría ser imperceptible pero estadísticamente se encontró que cuando la especie *N. balechii* toma el morfotipo en f. *balechii* el cuerno es más reducido, teniendo un intervalo de longitud de 35 µm a 128 µm, mientras que en la forma *longum* este carácter es de mayores dimensiones con un intervalo entre las 51 µm y 202 µm.

En la forma *balechii* con cuernos cortos, el cuerno antapical derecho presentó un intervalo entre 1 µm a 46 µm de longitud y el antapical izquierdo de 16 µm a 137 µm (manteniendo una proporción entre ellos menor a 0.1). La forma *longum*, siempre presenta cuernos antapicales más largos, donde la longitud del cuerno antapical derecho tuvo un intervalo en la longitud de entre 5 µm a 80 µm mientras que el antapical izquierdo de 27 µm a 217 µm (con una proporción entre ellos menor de 1).

De la sucesión de las formas de *Neoceratium balechii*.

Las formas de *Neoceratium balechii* se encontraron asociadas con la temperatura de la columna de agua y ésta temperatura fue estadísticamente diferente en cada forma (usando las medias). *Neoceratium balechii* f. *longum* se presentó en aguas con temperatura entre 25-28 °C y con mayor abundancia relativa en los meses de mayo a agosto, mientras que *N. balechii* f. *balechii* dominó con temperaturas de 18

a 22 °C, que se presentó en los meses de octubre a diciembre. Que contrasta con los resultados de Meave *et al.* (2003) donde se menciona que la especie (en sus dos formas) se presenta en temperaturas mayores a los 26 °C.

Ambas formas estuvieron presentes en las muestras aunque en diferente proporción, dependiendo de la temperatura del agua. Dado que también había transición se puede decir que son la misma especie.

Comportamiento regional.

El grupo colectado en las localidades de Baja California, Sinaloa, Costa Rica y Perú, presentó una longitud total, del cuerno apical y del cuerno antapical izquierdo mucho mayor al que presentaron los ejemplares colectados en las costas del pacifico mexicano de Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. En estas últimas localidades la proporción de los cuernos antapicales fue menor, encontrandose que la proporción entre la longitud de los cuernos era directamente proporcional a la longitud de los mismos. Así pues, los grupos formados como resultado de este análisis, se están diferenciando por el tamaño de los organismos que se presentan en dichas localidades y no por las formas de la especie *N. balechii*. Esto puede deberse a que las zonas del grupo a se encuentran en latitudes mas subtropicales, aclarando que en este análisis no se incluyeron datos de temperatura ni fecha de colecta, resultando un fenómeno importante aunque con muchas interrogantes, entre las que se pueden plantear a continuación ¿Deben la talla los organismos presentes en las localidades de Baja

California, Sinaloa, Costa Rica y Perú a la combinación de factores entre la temperatura y concentración de nutrientes? ya que en estas localidades se encuentran la corriente de California, el domo de Costa Rica y la corriente de Perú, que además son grandes zonas de surgencia y como lo menciona Graham (1941), Margalef (1978) y Smayda (2010) estas dos características presentes en la columna de agua se encuentran fuertemente relacionadas e involucradas en el crecimiento de las especies.

Del estudio Molecular.

Un inconveniente para extraer ADN de las muestras de dinoflagelados tecados como lo es *Neoceratium* (*Ceratium*) es tratar de romper la pared de los organismos y para esto se utilizaron métodos físicos (congelación-descongelación, seguido de centrifugación) así como el método tradicional de extracción de ADN (Fernández Perrino, 1997). Sin embargo no fue posible obtener amplificación de la región deseada por el método de la PCR, tal vez el método físico no fue lo suficientemente energético ya que al revisar bajo un microscopio invertido las células resultantes del proceso de extracción se apreció que en algunas de las células no hubo rotura de la pared. En lo que respecta al método tradicional para la extracción de ADN, estos protocolos se usan para cantidades mayores de muestra, se cree que en los pasos que se siguen en esta técnica el poco material genético pudo haberse perdido por lo que no hubo amplificación de ADN.

La problemática más importante que se tiene para obtención de ADN se encuentra relacionada con la cantidad de muestra con la que se cuenta para la extracción ya que como lo mencionan por autores como Grzbyk *et al.*, (1998), Daugberg *et al.*, (2000) y Adachi *et al.*, (1994), ésta es una parte fundamental del éxito en las investigaciones y que en nuestro caso lamentablemente no la pudimos compensar este hecho ya que en los protocolos de extracción de ADN se contaba con un número reducido de células, en algunos casos siendo esta menor de 100 y mayor de 5 organismo en cada tubo de muestra.

Por otra parte como lo mencionan autores como Marin *et al.* (2001), Cheng *et al.* (2001) y Edvarsen *et al.*, (2003) quienes para trabajar con un número reducido de células (por ejemplo 2 células) en la técnica de PCR recomiendan:

Hacer lavados en buffer TE para por último agregar PBS, todo ello con la finalidad de evitar la inhibición de la PCR ya que los dinoflagelados al momento de la rotura de la célula eliminan contaminantes de ellos mismos.

Antes de llevar la muestra a la reacción de PCR es que esta debe ser congelada por muchos meses (no especificando la cantidad).

O bien usar un kit específico para la extracción de ADN.

Pasos que nunca se llevaron a cabo dentro de este trabajo.

Conclusiones.

Se concluye que *Neoceratium balechii* es una especie diferente a *N. divaricatum* y *N. longipes* con base en las diferencias en las dimensiones, la morfología fina de cada una ellas y los resultados de los análisis estadísticos.

Se apoya la hipótesis de que las formas de *N. balechii* son conespecíficas y no variedades distintas de otra especie como *Ceratium divaricatum* (Hernández Becerril y Alonso, 2004). Esta afirmación puede hacerse aún sin contar con los resultados de las secuencias de las ITS, que serían importantes para concluir tajantemente con esta afirmación. Los resultados de los análisis morfométricos en especial con Análisis discriminantes ya que hasta la 3ra función discriminante es que se separan ambas formas y más aún el carácter nuevo que se incluyó para diferenciar y reconocer a las especies, parece reflejar esta conclusión.

Revisando los resultados de los análisis de discriminantes, se propone ampliar el intervalo en la longitud total de la célula para reconocer las distintas formas de *N. balechii* como sigue:

Si la $lt < 200 \mu\text{m}$ corresponde a *C. balechii* f *balechii*

Si la $lt > 245 \mu\text{m}$ *C. balechii* f *longum*

El intervalo $200 \mu\text{m} - 245 \mu\text{m}$ de longitud total podría representar la transición entre las formas aspecto que reforzaría la idea de que se trata de 2 formas y no de 2 taxa genéticamente distintos (Meave *et al.*, 2005).

Aún cuando se usó un número reducido de caracteres y únicamente continuos, éstos tuvieron una amplia resolución estadística para diferenciar a las especies, aun cuando exista un fuerte traslape entre ellos. Por ello y de acuerdo a los resultados analizados, los caracteres que dan más información para reconocer a las especies son: **a)** la distancia de la base de la hipoteca a los cuernos antapicales, **b)** la longitud total, **c)** la longitud del cuerno antapical derecho, **d)** la longitud del cuerno antapical izquierdo, **e)** la relación entre la longitud de los cuernos antapicales y **f)** la distancia que existe entre ellos.

Neoceratium balechii es una especie que lleva a cabo cambios en su tamaño, en función de la temperatura de la columna de agua, por lo que su morfología se relaciona directamente con el mes de recolecta. Además presenta el fenómeno de autotomía.

Neoceratium balechii es una especie abundante en el Pacífico Mexicano que se distribuye en la zona costera desde Baja California hasta el Golfo de Tehuantepec (aunque es rara en esta última región). De las dos formas que presenta la especie, la forma *balechii* es la más abundante en aguas de las costas mexicanas.

Neoceratium balechii se distribuye además también en gran parte del Pacífico oriental desde Ensenada, costas orientales de Baja California pasando por el Golfo de California en el norte de México hasta la bahía de Valparaíso en Sudamérica (tomando en consideración que en este trabajo se contó con muestras de México, Costa Rica y Perú, así como los reportes de literatura

reportados por Torres y Palacios (2007) y Pesantes (1978) para el Golfo de Guayaquil en Ecuador y Muñoz & Avaria (1980) para Chile y las comunicaciones personales de Ma. Eugenia Zamudio para El Salvador y de Patricia Villanueva para Perú. Con todos los datos anteriores se podría considerar como una especie endémica de la región del Pacífico Oriental ya que no se ha sido reportada para otras localidades fuera de estos límites, presentándose con más regularidad la forma *longum* (mayor tamaño) en las zonas de surgencia y la forma *balechii* en las zonas menos productivas (Smayda T. J. 2010), de acuerdo con los datos obtenidos en los análisis estadísticos. Aunque de una forma extraña como se ha mencionado anteriormente esta es rara en el Golfo de Tehuantepec, Bahías de Huatulco ya que en trabajos sobre diversidad esta especie no es mencionada para esta región (Herrera Galindo, 2002).

10. PERSPECTIVAS

Analizando con detenimiento las fotografías de las especies estudiadas se observa una característica al parecer distinta entre las especies *N. balechii* y *N. divaricatum*, esta es la anchura o grosor de los cuernos antapicales en su inicio al dejar el cuerpo central. Este carácter podría tomarse en cuenta para futuros estudios y análisis sobre la variación de las especies de *Neoceratium* (*Ceratium*).

Esta tesis fue parte del proyecto CONACYT G37560-V “Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacífico Mexicano” para el cual es fundamental resolver la taxonomía de las especies mediante la obtención de datos de secuencias moleculares junto con los morfométricos, que puedan ayudar a su

delimitación, por ello se ha contribuido a esclarecer la delimitación entre *N. balechii* y *C. divaricatum*, sin embargo falta conocer las secuencias moleculares que apoyarían o descartarían esta hipótesis. Razón por la que se pretende continuar intentando en la obtención de ADN siguiendo los protocolos de los investigadores que han tenido éxito en este ámbito. Considerando la posibilidad de continuar en el doctorado con un tema de índole taxonómica usando caracteres morfológicos y moleculares que ayuden a esclarecer otras problemáticas en los subgéneros del género *Neoceratium* pero por lo que respecta en esta etapa solo se presentan los resultados de datos morfométricos.

11. REFERENCIAS.

Adachi, M., S. Yoshihiko & I. Yuzaburo. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Journal Phycology* 30: 857-863.

Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. Mccourt, L. Mendoza, Ø. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel & M. F. Taylor. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399-451.

Band-Schmidt, C. J., E. L. Lilly & D. M. Anderson. 2003. Identification of *Alexandrium* affine and *A. margalefii* (Dinophyceae) using DNA sequencing LSU rDNA based RFLP-PCR assays. *Phycologia* 42: 261-268.

Balech, E. 1988. Los Dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publicaciones Especiales Instituto Español de Oceanografía*, Madrid 1: 1-219, 88 láms.

Bergh, R. S. 1881. Der organismus der cilio-flagellaten. Eine phylogenetische studie. *Morpholog Jahrbuch* 7: 177-288.

Cavalier-Smith, T. 2004. Chromoalveolate diversity and cell magaevolution: interplay of membranes, genomes and cytoskeleton. *In*: Hirt., R., Horner, D. (Eds). Organelles, genomes and eukaryote evolution. *Syst. Assoc. Symp. Taylor & Francis, London*, pp. 71-103.

Cortés, A. R. & A. Núñez. 2000. Distribución y abundancia anual de *Ceratium dens* (Peridiniales: Ceratiaceae) en el Golfo de California, México. *Revista de Biología Tropical*. 48: 305-311.

Chen, Y-Q, N. Wang, L-Q. Qu, T-H. Li & W-M. Zhang. 2001. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochemic Systematic Ecology* 29: 597-607.

Daugberg, N., G. Hansen, J. Larsen & Ø. Moestrup. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39 (4): 302-317.

Dodge, J.D. 1965. Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesokaryotic cell. *Excerpta Med. Int. Congre. Ser.* 91: 339-341.

Durnford, D. G., J. A. Deane, S. Tan, G.I. McFadden, E. Gantt & B.R. Green. 1999. A Phylogenetic Assessment of the Eukaryotic Light-Harvesting Antenna Proteins, with Implications for Plastid Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48: 59-68.

Edwardsen, B., L. K. Medlin, E. Dahl., S. Brubak & E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyse of rDNA. *Journal Phycology* 39: 395-408.

Falkowski, P. G., M. E. Katz, A. H. Knoll, A. Quigg, J. A. Raven, O. Schofield. & F. J. R. Taylor. 2004. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. *Science* 305: 354-360.

Fast, N. M., J. C. Kissinger., D. S. Roos & P. J. Keeling. 2001. Nuclear-Encoded, Plastid-Targeted Genes Suggest a Single Common Origin for Apicomplexan and Dinoflagellate Plastids. *Molecular Biology Evolution* 18 (3): 418-426.

Fenchel, T. 1998. Marine plankton food chains. *Annual reviews Inc.* 19: 19-38.

Fensome, R. A., J.F. Saldarriaga, & F J. R. Taylor. 1999. Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. *Grana* 38: 66-80.

Fensome, R. A., F.J.R. Taylor, G. Norris, W.A.S. Sarjeant, D.I. Wharton & G.L. Williams. 1993. A Classification of Living and Fossil Dinoflagellates. *Micropaleontology* 7 (1): 1-351.

Fernández-Perrino, F. J. 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta biosintética de penicilina. *Doctorado en Biología*. Universidad de León, España, 246 p.

Gaines, G. & M. Elbrächter. 1987. Heterotrophic nutrition. *In*: Taylor, F. J. R. (Ed.). *The biology of Dinoflagellate*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Pp. 224-268.

Gi Young, K., H. Myoung-Gyu, C. Eun Seob., L. Tae-Ho., L. Sang Jun. & L. Jae-Dong. 1999. Molecular identification of *Gyrodinium inpudicum* and *Gymnodinium sanguineum* by comparing the sequences of the internal transcribed spacers 1, 2 and 5.8S Ribosomal DNA. *Journal Fisheries Scientific Technical* 2 (1): 66-77.

Gómez, F. 2005. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Bota. Croatica* 64 (1): 129–212.

Gómez, F., D. Moreira & P. López-García. 2009. *Neoceratium* gen. nov., for all marine species currently assigned to *Ceratium* (Dinophyceae). *Protist*. Pp. 2-20.

Guillard, R.L & S. L. Morton. 2003. Cultures Methods. *In*: Hallegraff G.M, D.M., Anderson & A.D. Cembella. (Eds.) 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, *Unesco*, Paris. P.p. 77-97.

Graham, H., 1941. An oceanographic consideration of the Dinoflagellate genus *Ceratium*. *Ecological Monographs* 11 (1): 101-117.

Graham, L. E & L. W., Wilcox. 2000. *Algae*. *Prentice Hall, Inc.* USA. 640 p.

Grzebyk, D., Y. Sako & B. Berland. 1998. Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons and description of *Prorocentrum panamesis*, sp nov. *Journal Phycology* 34: 1055-1068.

Hallegraeff, G.M. 2005. Harmful algal blooms: a global overview. *In*: Hallegraff G.M, D.M., Anderson & A.D. Cembella. (Eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11, *Unesco*, Paris. Pp. 25-49.

Hernández-Becerril, D. U. 1985. Dinoflagelados en el fitoplancton del Puerto de El Sauzal, Baja California. *Ciencias Marinas* II (1): 65-91.

Hernández-Becerril, D.U. 1989. Species of the dinoflagellate genus *Ceratium* Schrank (Dinophyceae) in the Gulf of California and coasts off Baja California, México. *Nova Hedwigia* 48 (1-2): 33-54.

Hernández-Becerril, D. U. & R. Alonso-Rodríguez. 2004. Study of the marine planktonic dinoflagellate *Ceratium divaricatum* (Dinophyceae), a confused and considerable variable species. *Phycological Research* 52: 346-354.

Hernández Rosas A., M. E. Meave del Castillo, M. E. Zamudio-Resendiz & M. Castillo Rivera. 2007. Morfometría y distribución de especies del género *Ornithocercus* (Dinophysiales: Dinophyta) del Pacífico Mexicano. *Hidrobiológica* 17 (3): 257-272.

Herrera-Galindo, J. E. 2002. Composición, abundancia y distribución de las dinoflageladas en la zona cercana a la línea de costa y marina adyacente al Río Copalita, en Bahías de Huatulco, Oaxaca, (diciembre de 97 - enero de 98). *Tesis de Maestría*. Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca, México. 158 p.

Jeng Chang & E. J. Carpenter. 1994. Inclusion bodies in several species of *Ceratium* Schrank (Dinophyceae) from the Caribbean Sea examined with DNA-specific staining. *Journal Plankton Research* (short communication) 16 (2): 197-202.

Jørgensen, E. 1911. Die Ceratien. Eine kurze Monographie des Gattung *Ceratium* Schrank. *Int. Revue ges. Hydrogr.* 4 (2): 1-124.

Jørgensen, E. 1920. Mediterranean *Ceratia*. *Rep. Danish Oceanogr. Exped. Med. 2 (Biol.), Journal 1*: 1–110.

Kofoed, C. A. 1908. Exuviation, autonomy and regeneration in *Ceratium*. *Zoology* 4: 345-386.

Lee, R. E. 1999. *Phycology*. Cambridge University Press. USA. 614 p.

Lemmermann, E. 1899. Ergebnisse einer Reise nach dem Pacific Planktonalgen. *Abhandlungen Naturwissenschaftlichen Verein Bremen* 16: 313-98.

Licea, D.S., J.L. Moreno, H. Santoyo & G. Figueroa. 1995. Dinoflagelados del Golfo de California. *Universidad Autónoma de Baja California Sur*. 165 p.

López, J. 1966. Variación y regulación de la forma en el género *Ceratium*. *Investigación pesquera* 30: 325-427.

Margalef R. 1974. *Ecología*. Omega. Barcelona. 951 p.

Margalef R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environments. *Oceanologica Acta* 1: 493-509.

Marin, I., A. Aguilera, B. Reguera & J. P. Abad. 2001. Preparation of DNA suitable for PCR amplification from fresh or Dinoflagellates cells. Short technical reports. *Biotechniques* 30: 88-93.

Meave del Castillo, M. E., M. E. Zamudio-Reséndiz, Y. Okolodkov, & I. H. Salgado Ugarte. 2003. *Ceratium balechii* sp. Nov. (Dinophyceae: Gonyaulacales) from Mexican Pacific. *Hidrobiológica* 13 (1): 75-91.

Meave del Castillo, M. E. & M. E. Zamudio-Reséndiz. 2005. "Biodiversidad de dinoflagelados en el Pacífico Mexicano". VII Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe y V Reunión Iberoamericana de Ficología. La Habana, Cuba. 19-24 de septiembre del 2005. p. 57

Meave del Castillo, M.E., M.E. Zamudio-Reséndiz, A. Hernández-Rosas, R. Cortés-Altamirano, M. Castillo-Rivera & G.A. Gallegos. 2005. Análisis de la morfometría del dinoflagelado *Ceratium balechii* en un ciclo bianual (1999-2000) en Bahía Mazatlán, México. Resúmenes. VII Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe y V Reunión Iberoamericana de Ficología. La Habana, Cuba. 19-24 de septiembre del 2005. p. 57

Meave del Castillo, M. E. 2006. Reporte final del proyecto CONABIO BA08 "Diatomeas (Bacillariophyta), Dinoflagelados (Dinophyta) y Silicoflagelados

(Dictyochophyceae) marinos del Pacífico Mexicano con énfasis en la porción tropical". 80 p.

Meave del Castillo, M.E, M.E. Zamudio Resendiz, A. Hernández-Rosas & E. Cohen. Morfometría de especies selectas de dinoflagelados planctónicos de las costas del Pacífico Mexicano. Resúmenes. V Congreso Mexicano de Ficología. Guadalajara, Jalisco. 3 al 8 de abril, 2006.

Muñoz P. & S. P. Avaria. 1980. Estudio taxonómico de los dinoflagelados tecados de la bahía de Valparaíso. I. Género *Ceratium*. *Revista Biología Marina* 17: 1-57.

Okolodkov, Y. B. & I. Gárate-Lizárraga. 2006. An annotated checklist of Dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botánica Mexicana* 74: 1-154.

Ostenfeld, C.H. & J., Schmidt. 1901. Plankton fra det Røde Hav og Adenbugten. *Vidensk. Meddr. Dansk. Naturh. Foren* 25: 141-82.

Pesantes, F. 1978. Dinoflagelados del fitoplancton del golfo de Guayaquil. *Publ. INOCAR (Depto. Ciencias del Mar)* 2: 1-46.

Rodriguez-Palacio M. C. 2006. *Establecimiento de cultivo de Dinoflagelados del Pacifico Tropical Mexicano*. Tesis de maestría. Maestría en Biología. UAM. 108 p.

Saldarriaga, J.F., F.J.R. Taylor, P.J. Keeling & T. Cavalier-Smith. 2001. Dinoflagellate Nuclear SSU rRNA Phylogeny Suggest Multiple Plastid Losses and Replacements. *Journal Molecular Evolution* 53: 204-213.

Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae (Peridineae) *In*: Rabenhorst, L. (Ed.) *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, (Flagellatae)*, Akad. Verlagsges, Leipzig, Sect. 3, fasc. 1-3: 1-617.

Schmidh, J. 1901. Flora of Koh Chang. Contributions to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Peridinales. *Bot Tidsskr* 24: 212-221.

Schnepf, E. & M. Elbrächter. 1999. Dinophyte chloroplasts and phylogeny. A review. *Grana* 38: 81-97.

Scholin, A. S. 1998. Morphological, genetic and biogeographic relationships of the toxic Dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. fundyense*. *Physiological Ecology of harmful algal Blooms*. NATO ASI Series G41: 15-27.

Shao, P., Y. Q. Chen, H. Zhou, J. Yuan, L. H. Qu, D. Zhao, Y-S Lin. 2004. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis. *Marine Biology* 144: 215–224.

Smayda, T. J. 2010. Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellate species in upwelling systems. 2. Motility and migratory behaviour. *Progress in Oceanography* 85: 71–91.

Smalley, G. W. & D. Wayne Coats. 2001. Ecology of the Red-Tide Dinoflagellate *Ceratium furca*: distribution, mixotrophy and grazing impact on ciliate populations of Chesapeake Bay. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 (1): 63-73.

Steemann Nielsen, E. 1934. Untersuchungen über die Verbreitung, Biologie und Variation der in Südlichen Stillen Ozean. *Dana Rep.* 4: 67 p.

Steidinger, K.A. & K. Tangen. 1996. Dinoflagellates. *In*: C. R. Tomas (Ed.). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc., Harcourt B& Company, San Diego. Pp 387-598.

Subrahmanyam, R. 1968 The Dinophyceae of the Indian Seas. Genus *Ceratium* Schrank. *Mem. Mar. Biol. Ass. Indian* 2 (1): 129 p.

Taylor, F.J.R. 1976. Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report on material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963-1964. *Bibliotheca Botanica*. Pp. 132-234.

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

Tilman., J.A., U. Tilman, B. Beszteri, Cembella A. D. & J. Uwe. 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 46: 18–32.

Tomas, C. R. 1997. Identifying marine phytoplankton. Academic Press. USA. 858 p.

Torres, G. & C. Palacios. 2007. Bloom de *Noctiluca scintillans* y *Ceratium dens* en el Golfo de Guayaquil (2004). *Acta Ocenográfica del Pacífico.* 14 (1): 125-130.

Vargas-Montero, M. & E. Freer. 2004. Presencia de los dinoflagelados *Ceratium dens*, *C. fusus* y *C. furca* (Gonyaulacales: Ceratiaceae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 52 (1): 115-120.

Wiktor J.M., Y.B. Okolodkov & K. L. Vinogradova. 1990. Atlas of the marine flora of southern Spitsbergen. *Institute of Oceanology Poland.* 516 p.

Yarranton, G.A. 1967. Parameters for use in distinguishing populations of *Euceratium Gran.* *Bulletin of Marine Ecology* 6: 147- 158.

Yoon, H.S, J.D. Hackett & D. Bhattacharya. 2002. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin- containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *PNAS* 99 (18): 11724-11729.

Paginas WEB

- _ <http://www.ecohabpnw.org/W0308c/pages/Plankton/DSCN1183.htm>
- _ <http://www.ccpm.bigelow.org>
- _ [genbank](#)

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa

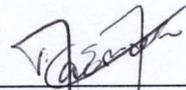
aprobó la tesis que presentó.

ADRIANA HERNÁNDEZ ROSAS.

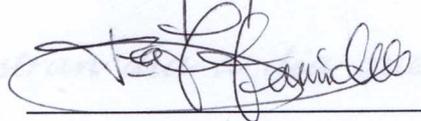
El día 23 de Febrero del 2011.

Comité Tutorial

Dra. María Esther Meave



Dr. Francisco José Fernández Perrino



Dr. Manuel Castillo Rivera.



M. en C. María Guadalupe Figueroa Torres.

M. en Sc. Maribelle Vargas Montero
