

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“MORFOLOGÍA EXTERNA DEL COMPLEJO *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides* Y FILOGENIA MOLECULAR DE *Prorocentrum* (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**

**ERÉNDIRA JULIETA COHEN FERNÁNDEZ**

**CODIRECTORES DE TESIS:**

**Dra. María Esther Meave Del Castillo**

**Dr. José Francisco Flores Pedroche**

**ASESOR:**

**Dr. Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte**

**MÉXICO, D.F.**

**7 DE ENERO DE 2011**

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAM  
(Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco)  
aprobó la Tesis que presentó

**ERÉNDIRA JULIETA COHEN FERNÁNDEZ**

El día 07 de Enero de 2011.

**Sinodales:**

**Dr. José Francisco Flores Pedroche (Presidente)** \_\_\_\_\_

**Dra. María Esther Meave Del Castillo (Secretaria)** \_\_\_\_\_

**Dr. Isaías Hazarmabeth. Salgado Ugarte (Vocal)** \_\_\_\_\_

**Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas (Vocal)** \_\_\_\_\_

**Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa (Vocal)** \_\_\_\_\_

## COMITÉ TUTORIAL

### **Dra. María Esther Meave Del Castillo**

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana

### **Dr. José Francisco Flores Pedroche**

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana

### **Dr. Isaías Hazarmabeth. Salgado Ugarte**

Profesor Titular "A", FES-Zaragoza  
Universidad Nacional Autónoma de México

## SINODALES

### **Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas**

Profesor de Carrera Titular "C", Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México

### **Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa**

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana

El presente trabajo se realizó en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Fitoplancton Marino y Salobre, Laboratorio de Macroalgas, Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción Acuícola, Laboratorio de Ficología Aplicada y el Laboratorio Divisional de Biología Molecular, del Departamento de Hidrobiología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

*A mi mamá, mi primer contacto con la vida*

*A Paloma, Alba y Adolfo*

*A Anayansi, Santiago y David*

*Al Billito, Adrián y Farid*

Agradezco el apoyo y la colaboración de la Dra. María Esther Meave del Castillo, del Dr. Francisco F. Pedroche, del Dr. Santiago Fraga, de Mónica Rodríguez Palacio, de la Dra. Irene de los Ángeles Barriga-Sosa, de Claudia Garnica-Rivera y Abel Chihuahua, Johana Díaz-Larrea, Abel Sentíes Granados y Kurt Dreckman, de Sergio Álvarez Hernández y Cruz Lozano, de María Eugenia Zamudio y Adriana Hernández Rosas y de la Dra. Alejandra Serrato Díaz. Gracias a Sofía Solórzano Lujano, Laura Márquez, Christine Band Schmidt, José Bustillos, al Dr. Isaias H. Salgado y a la Dra. Dení Rodríguez Vargas.

Esta investigación contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto G37560-V y con las generosas aportaciones de la Familia Olea-Cohen.

## Resumen

La presente tesis aborda la sistemática del género *Prorocentrum* desde dos aproximaciones diferentes, pero complementarias: El análisis morfométrico de caracteres morfológicos y el análisis filogenético de caracteres moleculares. Se estudiaron poblaciones de *Prorocentrum micans*, *P. gracile*, y *P. sigmoides*, porque es el complejo de especies más frecuente y abundante del Pacífico mexicano, mediante el uso de herramientas estadísticas; concluyendo que *P. sigmoides* debería ser un sinónimo de *P. gracile* debido a la ausencia de caracteres tanto morfológicos como morfométricos que le sean exclusivos. También se proponen: la existencia de un diente antapical, la presencia de poros redondeados y depresiones del mismo tamaño en la superficie de las valvas, y la presencia de varios poros alargados, como caracteres diagnósticos nuevos para *P. gracile*. En la segunda parte de esta tesis, se presenta la filogenia molecular de 20 especies de *Prorocentrum* presentes en el Pacífico mexicano, a partir de las secuencias de las subunidades grande y pequeña del RNA ribosomal. Se encontró que *P. mexicanum*, *P. gracile* y *P. micans* son especies cercanas y que las especies planctónicas parecen ser más recientes evolutivamente que las epibentónicas. Los resultados apoyan la versión que sugiere que el ancestro del género *Prorocentrum* pudo ser una célula redonda, sin espina apical y con valvas lisas, con la posibilidad de producir sustancias tóxicas y de hábito epibentónico. Se apoya la tendencia a considerar a *P. lima* y *P. concavum* como parte del género *Exuviaella*.

**Palabras clave:** *Exuviaella*, Filogenia, *Prorocentrum*, Morfometría, Pacífico



## Abstract

This thesis is a contribution to the systematics of the *Prorocentrum* genus from two different but complementary approaches: The morphometric analysis of morphological characters and the phylogenetic analysis of molecular characters. The first part of the thesis consists of the morphometrical analysis of several populations of *P. micans*, *P. gracile* and *P. sigmoides*, studied because they form the more abundant and frequent species complex in the Mexican Pacific; concluding that *P. sigmoides* should be considered a junior synonym of *P. gracile* because of its lack of exclusive morphological and morphometrical characters. A new diagnosis for *P. gracile* is presented, that considers the presence of an antapical tooth, the presence of equal size round pores and depressions on the valve surface, as well as the presence of elongated pores. In the second part of the thesis, a phylogenetic analysis of the *Prorocentrum* species is presented, that includes the sequences of the large and small ribosomal RNA subunits from 19 species of the Mexican Pacific; the results show that *P. micans*, *P. gracile* and *P. mexicanum* are the closest species. These results support the proposal that the ancestor of the *Prorocentrum* genus could be an epibenthonic, toxic, round cell, without depressions in the valve surface, and lacking apical spine. The results support the placement of *P. lima* and *P. concavum* as *Exuviaella*.

**Keywords:** *Exuviaella*, Morphometry, Pacific, Phylogeny, *Prorocentrum*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
La taxonomía y filogenia de los dinoflagelados .....	16
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>24</b>
El orden Prorocentrales .....	24
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>38</b>
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO <i>Prorocentrum micans</i>, <i>P. gracile</i> y <i>P. sigmoides</i></b> .....	<b>39</b>
Caracteres morfométricos. ....	43
Análisis estadístico de los datos .....	46
<b>FILOGENIA MOLECULAR DE <i>Prorocentrum</i> (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO</b> ..48	
Obtención de muestras .....	48
Extracción, amplificación y secuenciación de LSU y SSU rDNA. ....	50
Alineación de secuencias .....	53
Secuencias provenientes del banco de genes del NCBI .....	54
Análisis Filogenético .....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO <i>Prorocentrum micans</i>, <i>P. gracile</i> y <i>P. sigmoides</i></b> .....	<b>59</b>
Caracterización de morfotipos .....	59
Diferencias morfométricas entre los morfotipos. ....	66
Análisis discriminante .....	68
Análisis de agrupamientos .....	73
<b>FILOGENIA MOLECULAR DE <i>Prorocentrum</i> (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO</b> ..74	
La calificación de los árboles .....	74
La relación entre las especies. ....	76
La relación entre <i>P. gracile</i> y <i>P. micans</i> .....	83

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>MORFOLÓGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO <i>Prorocentrum micans</i>, <i>P. gracile</i> y <i>P. sigmoides</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>FILOGENIA MOLECULAR DE <i>Prorocentrum</i> (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO ..</b>	<b>89</b>
La relación entre las especies .....	89
Filogenia y ecología.....	92
Consideraciones metodológicas I: El papel de los gaps (-) en los resultados .....	93
Consideraciones metodológicas II: Características de las secuencias de SSU y LSUrRNA.....	94
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>107</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>110</b>

## INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son algas unicelulares móviles que predominan en los ambientes marinos tropicales y han constituido los elementos dominantes de las comunidades planctónicas de dichos ambientes desde el Triásico (Fensome *et al.*, 1993 y 1999). Tienen una indudable importancia económica en México, porque además de contribuir de manera considerable a la productividad primaria y al establecimiento de intrincadas redes tróficas, varias especies son tóxicas y llegan a presentarse en forma de florecimientos. En consecuencia, la identificación certera de las especies resulta indispensable para la aplicación de los monitoreos y las vedas. Es por ello que el CONACYT aprobó el financiamiento del programa de investigación interdisciplinario e interinstitucional: Biología y filogenia molecular de dinoflagelados del Pacífico Mexicano, del cual esta investigación formó parte (proyecto G37560-V).

Los dinoflagelados (Figura 1) son un grupo de organismos unicelulares con características singulares; fueron estudiados y clasificados independientemente por zoólogos, botánicos y paleontólogos, hasta que en 1993 Fensome *et al.* propusieron una clasificación unificada basada principalmente en la morfología externa de estos organismos y que sigue las reglas de la nomenclatura botánica.

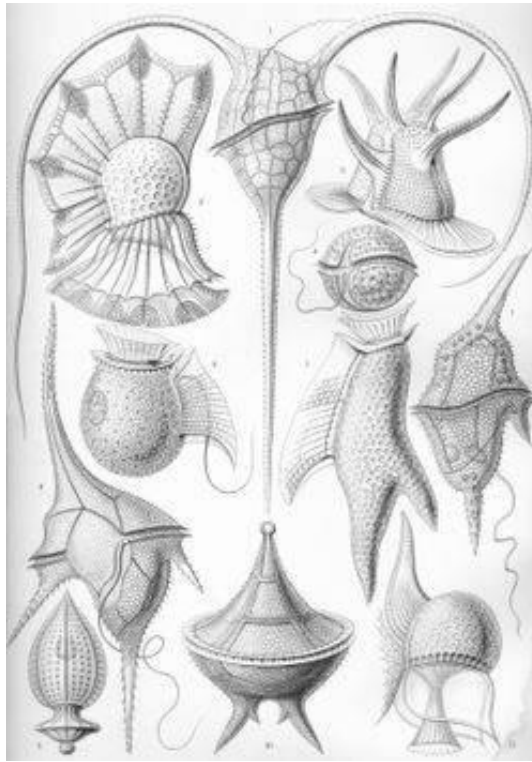


Figura 1. Dinoflagelados ilustrados por Haeckel (1904).

Los dinoflagelados toman su nombre del par de flagelos característicos que se insertan lateralmente en la superficie ventral de la célula, el flagelo transversal con forma de listón ondulado es responsable del giro y el otro, es un flagelo longitudinal, liso y terminado en una fibrilla.

El núcleo de los dinoflagelados tiene muchas características únicas. El ADN tiene secuencias repetidas, como el de otros eucariontes, pero no parece tener histonas (proteínas básicas alrededor de las cuales se organiza el ADN). Los dinoflagelados tienen más ADN en su núcleo que otros eucariontes, tanto así que el núcleo con frecuencia llena la mitad del volumen de la célula.

Un solo dinoflagelado puede tener entre 12 y 400 cromosomas en su núcleo. Los cromosomas están unidos a la membrana nuclear. En la división, la membrana nuclear no se rompe como en las plantas y los animales, en su lugar un *huso* de microtúbulos se desarrolla en canales que permean el núcleo y coordinan la segregación de cromosomas. Los cromosomas permanecen condensados durante la mitosis y aun durante la interfase, aunque sí se separan para la replicación. Esta inusual situación del núcleo se denomina mesocarionte en la creencia de que era transicional entre la estructura de los eucariotas y los procariotas, pero ahora se cree que es una característica derivada única de los dinoflagelados.

El ciclo de vida de los dinoflagelados presenta una alternancia de estados haploide y diploide (Figura 2). Durante los periodos favorables de crecimiento rápido y expansión de la población, domina la fisión binaria produciendo células haploides móviles. La reproducción sexual en el laboratorio puede ser inducida con la reducción de nutrientes, temperatura o luz.

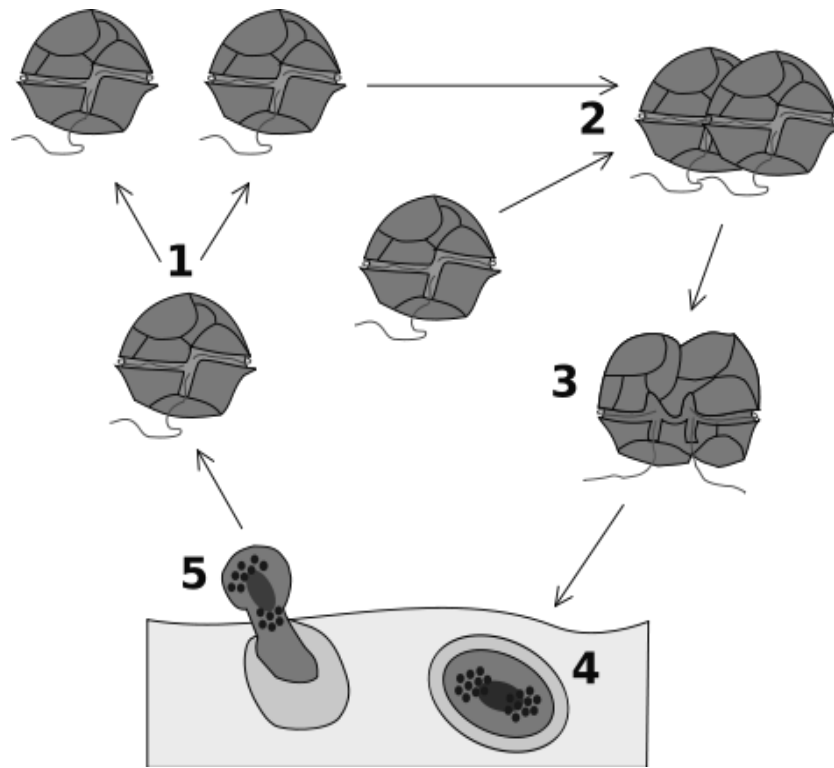


Figura 2. Ciclo vital de un dinoflagelado: 1) fisión binaria, 2) fusión de gametos, 3) planozigoto, 4) hipnozigo, 5) planomeiocito.

## La taxonomía y filogenia de los dinoflagelados

La clasificación dentro del grupo depende del número y arreglo de las placas tectales, que forman una armadura. Fórmulas basadas en las placas se usan para caracterizar muchos géneros, aunque un género puede ser variable por su fórmula particular. Los arreglos también han sido utilizados para crear hipótesis acerca de la evolución del grupo

El origen de los dinoflagelados fotosintéticos se explica con la teoría endosimbiótica. En los dinoflagelados hay una triple membrana alrededor y una pequeña estructura parecida a un núcleo dentro de los plástidos, que sugiere que este es un caso de endosimbiosis secundaria. El *plástido* fue probablemente una diatomea o crisofita, ya que contiene clorofila c y puede contener fucoxantina, ambas solo son encontradas en los Cromista. Se cree que este evento de endosimbiosis ocurrió solamente una vez entre los dinoflagelados, por ello los inusuales pigmentos amarillos perinidina y dinoxantina comunes entre los miembros del grupo.

La filogenia de los Protista coloca a los dinoflagelados en los Alveolata, junto con Apicomplexa, Ciliata y Foraminifera.

La exploración de las relaciones filogenéticas entre los dinoflagelados, basada en el análisis de las secuencias de las subunidades grande y pequeña que constituyen el RNA ribosomal (LSU y SSU rRNA), mostró que la Clase Dinophyceae está formada por varios Ordenes parafiléticos, el de los Procentrales entre ellos (Saldarriaga *et al.*, 2001).



Dinophyceae es la principal clase de la división Dinoflagellata. Incluye a las especies cuyo núcleo permanece dinocarionte durante todo el ciclo celular, que es dominado por la etapa haploide.

Son organismos unicelulares, la mayoría biflagelados, si bien pueden aparecer formas aflageladas: cocoides, filamentosas, palmeloides o ameboides, relacionadas con su gran variedad de formas de nutrición. Generalmente son fotosintéticos, aunque también hay formas heterótrofas: saprofiticas, parásitas, simbióticas y holotróficas. Muchos autótrofos marinos son auxótrofos para varias vitaminas.

Como pigmentos poseen: clorofila a y c,  $\beta$ -caroteno, xantofilas, peridinina, neoperidinina, dinoxantina, neodinoxantina y diatoxantina. Su material de reserva es el almidón.

La pared celular o teca, cuando se presenta, está compuesta fundamentalmente de celulosa.

Los Dinophyceae se clasifican por su morfología. Las especies con teca se dividen en cuatro órdenes basados en la disposición de las placas o tecas de la pared celular: Peridiniales, Gonyaulacales, Dinophysiales y Prorocentrales.

Los miembros del orden Prorocentrales están organizados taxonómicamente en dos familias Haplodiniaceae y Prorocentraceae. A esta última pertenecen los géneros *Exuviaella*, *Mesoporus*, *Plagiodinium* y *Prorocentrum*.

El género *Prorocentrum* fue erigido a finales del siglo XIX, las especies de este orden presentan una gran consistencia morfológica. Son algas unicelulares, que como todos los dinoflagelados, se definen por la presencia de dos flagelos, aunque en su caso, se insertan en la región apical de la célula y dado que uno de sus flagelos es ondulante, es considerado homólogo del flagelo transversal de los demás dinoflagelados. El arreglo de los alvéolos corticales o vesículas anfiesmales de estas células, consiste de dos placas tecales o valvas principales (Dodge 1975), más o menos comprimidas dorso-ventralmente. Alrededor del poro, del que emergen los flagelos, se localizan las placas tecales restantes, muy reducidas en tamaño y en ocasiones fusionadas entre sí. La zona de sutura de las dos valvas principales puede estar más o menos marcada y en algunas especies, en la región apical, la placa derecha se prolonga en una espina. La superficie de las valvas puede estar perforada por poros, generalmente oblicuos, a veces densos y con frecuencia dispuestos en hileras; aunque puede ser lisa, también es posible la presencia de *poroides* densos de poca profundidad o espinas muy pequeñas. Algunas especies son formadoras de florecimientos y productoras de toxinas, por lo que pueden representar tanto un riesgo para la salud pública, como una fuente de importantes pérdidas económicas.

La Tabla 1 muestra que el orden Prorocentrales, posee el 8% del total de las especies de la Clase Dinophyceae reconocidas (<http://www.nodc.noaa.gov>; Steidinger & Tangen, 1996).

Tabla 1. Diversidad taxonómica de la Clase Dinophysea (Guiry y Guiry, 2007 y actualizado de acuerdo a lo publicado en Algalbase 2010.).

Ordenes	Número de Familias	Número de Géneros	Número de Especies
Gymnodiniales	2	17	259
Gonyaulacales	13	40	240
Peridinales	22	43	183
Dinophysiales	2	13	128
<b>Prorocentrales</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>74</b>
Noctilucales	3	8	12
Phytodiniales	1	7	12
Actiniscales	1	3	4
Lophodiniales	1	1	3
Ptychodiscales	1	3	3
Alveondinales	1	1	1
Brachydiniales	1	1	1
Dinamoebales	1	1	1
Dinotrichales	1	1	1
Suessiales	1	1	1
Thoracosphaerales	1	1	1
Blastodiniales	1	1	1
Ebriales	1	1	1
Syndiniales	1	1	1
Total	57	148	921

Los caracteres diagnósticos disponibles para clasificar a estas células en especies y géneros distintos, se reducen a: la forma de la célula y su tamaño, la presencia o ausencia de una espina apical, el patrón de poros en las valvas, la producción de toxinas y el hábito ya sea planctónico o bentónico. Probablemente es por eso que el número de especies que pertenecen a la familia se haya reducido, ya que muchas especies son consideradas sinónimos de otras, resultando en que el género *Prorocentrum* contiene a casi todas las especies del orden.

Durante la segunda mitad del siglo XX, las relaciones de parentesco entre los dinoflagelados y por lo tanto la evolución del grupo, eran equivalentes a la historia de la adquisición y pérdida de las tecas. Tres fueron los modelos evolutivos propuestos. El modelo del incremento de tecas, considera a los tecados, más simples en

estructura, primitivos con respecto a los atecados y dentro de los tecados a los Prorocentrales como el grupo más primitivo. El modelo evolutivo de reducción de tecas se basa en datos paleontológicos sobre registros del Mesozoico al Terciario, aquí la posición de los Prorocentrales se invierte, porque ahora son el grupo más reciente. Finalmente, en el modelo de fragmentación de placas, basado en una síntesis entre el registro fósil y en las características de los organismos actuales, el ancestro hipotético fue atecado, luego viene el desarrollo de numerosas y delgadas placas que tienden a reducirse en número y aumentar en grosor; por lo que en este modelo los Prorocentrales también resultan ser el grupo más reciente. Elegir cuál de estas teorías corresponde realmente a la historia evolutiva del grupo implica, de acuerdo con Taylor (2004), elegir aquella que pueda incluir los siguientes eventos:

- La diferenciación de los flagelos.
- El desarrollo del núcleo característico de los dinoflagelados.
- La dinomitosis, con su cambio de *huso acromático* hacia el exterior del núcleo, incluyendo el hecho de que el núcleo permanece cerrado durante el desarrollo del proceso.
- El desarrollo eventual de placas tecales de celulosa en las vesículas periféricas de la pared celular.
- El desarrollo del ciclo de vida haploide
- La adquisición de un estado de latencia por simbiosis secundarias.

Para Taylor (2004) estos eventos tienen un orden de aparición a partir de un ancestro único. Su propuesta de ancestro es un heterótrofo, flagelado y poseedor de un huso acromático externo. La secuencia de aparición de los caracteres que Taylor considera homólogos, tendría el siguiente orden: adquisición del dinocarion, la formación de las placas de celulosa, la tendencia a perder la zona de sutura y la adquisición de los diversos tipos de plástidos, siendo el de tipo peridinina el primero y después la sucesiva pérdida y adquisición de los otros tipos.

Lo que sabemos de las relaciones filogenéticas de los dinoflagelados proviene del análisis de caracteres moleculares, y sus resultados no coinciden con las relaciones esbozadas por los modelos evolutivos descritos en párrafos anteriores porque revelan que los grupos en los que se han clasificado los dinoflagelados no son grupos monofiléticos. Estos estudios incluyen muy pocas especies, las cuales han sido elegidas como representantes de órdenes que agrupan especies actuales (no extintas) y excluyen a las especies que no poseen un dinocarion. Los once análisis filogenéticos revisados, publicados entre 1998 y 2005, produjeron árboles filogenéticos que revelaron la parafilia de sus miembros (Band-Schmidt *et al.*, 2003; Daugbjerg *et al.*, 2000; Faust & Gullledge, 2002; Fensome *et al.*, 1993; Fensome *et al.*, 1999; Grzebyk *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2000; Hernández-Becerril *et al.*, 2000; Saldarriaga *et al.*, 2004; Saldarriaga *et al.*, 2001; Usup *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

La evaluación de la clasificación basada en los caracteres diagnósticos, aquellos utilizados para identificar y determinar a los organismos, concluyó que las

semejanzas en el desarrollo de las placas tecales no refleja el grado de relación genética entre las especies (Zhang *et al.*, 2005), en otras palabras, las diferencias morfológicas no reflejan diferencias genéticas (Daugbjerg *et al.*, 2000).

Si bien el análisis de la filogenia molecular muestra la parafilia del grupo, permite adelantar una hipótesis alternativa que propone un ancestro fotosintético de los dinoflagelados, en lugar de uno heterótrofo<sup>1</sup>. Dicha hipótesis es resultado del análisis de los genes funcionales que codifican para las proteínas PsbO y GAPDH del cloroplasto (Yoon *et al.*, 2002). La evidencia a favor de un ancestro heterótrofo, que coincide con la hipótesis formulada por Taylor, provino de la sistemática filogenética a través de un estudio que utilizó la secuencia del citocromo b mitocondrial cob (Zhang *et al.*, 2005). Aunque ambas hipótesis son plausibles y ambas fueron resultado de la inferencia bayesiana, la hipótesis del ancestro heterótrofo es aceptada porque las comparaciones basadas en las secuencias del citocromo b mitocondrial cob son más pertinentes para reconocer al ancestro dada su transmisión vertical en el organismo receptor (Zhang *et al.*, 2005).

El estudio de los dinoflagelados es un campo fértil para la sistemática filogenética. Existe la necesidad imperiosa de recuperar clados monofiléticos, reconociendo que los caracteres morfológicos utilizados hasta ahora no son informativos y que es necesario hacer una nueva propuesta de caracteres

---

<sup>1</sup> ... "tal hipótesis requiere de invocar la altamente no-parsimoniosa pérdida repetida de plástidos" (Taylor, 2004)

morfológicos diagnósticos utilizados en la sistemática tradicional, que deberán ser consistente con los árboles obtenidos a partir del análisis molecular.

## **ANTECEDENTES**

### El orden Prorocentrales

El grupo se caracteriza por que sus miembros presentan una teca bivalvar con compresión lateral más o menos notable. En vista lateral, la valva derecha muestra una depresión anterior con forma de “v”, en el lugar en donde se insertan los flagelos. En esta zona, ambas placas aprisionan un conjunto de plaquitas (8 a 9) que delimitan un par de poros por donde emergen los flagelos. En la zona que rodea al conjunto de placas y poros, dos grandes placas laterales se ensanchan formando un reborde interno y a veces también externo. En ocasiones, alguna de las placas se prolonga en un apéndice agudo triangular o espiniforme poco o muy desarrollado. Las dos placas mayores o laterales que forman las valvas, suelen estar perforadas por poros generalmente oblicuos, a veces densos y que con frecuencia se disponen en zonas o en hileras cortas bien definidas. Puede también haber poros densos de poca profundidad (denominados poroides) y espínulas muy pequeñas. La terminología para describir la orientación denomina polo apical a la parte que va hacia adelante cuando la célula se mueve, mientras que el polo antapical es el extremo opuesto (Figura 3).



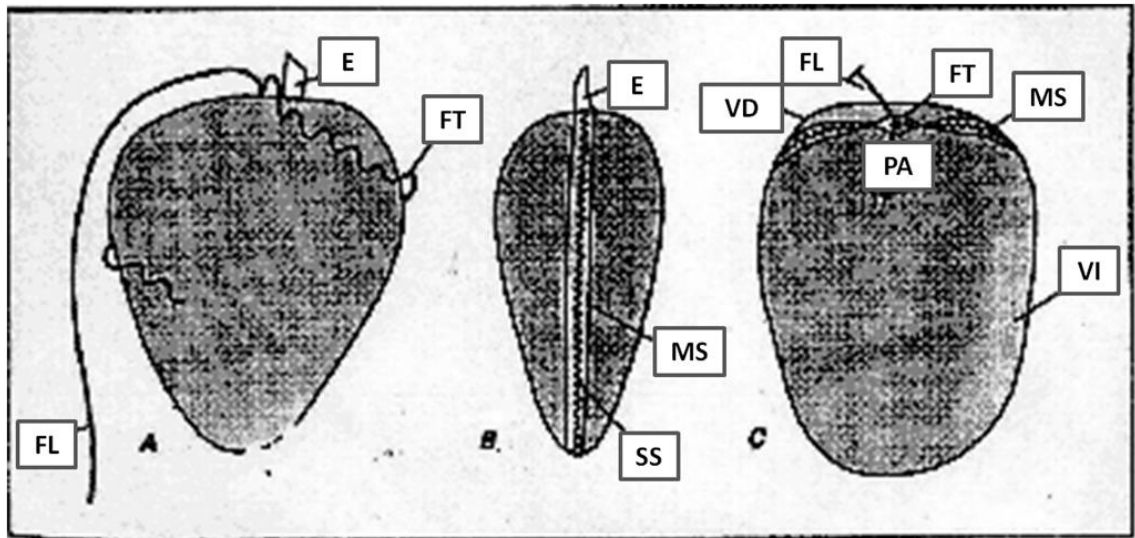


Figura 3. Morfología de los Prorocentrales. FL: Flagelo Longitudinal, FT: Flagelo trasversal, E: Espina apical, MS: Margen de sutura o reborde, SS: Sutura sagital, VI: Valva izquierda, VD: Valva derecha, PA: Poro apical

En la actualidad, se reconocen, con base en la morfología externa, cuatro géneros dentro de la familia Prorocentraceae (Guiry & Guiry, 2007; [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)), aunque el 80% de las especies están incluidas en *Prorocentrum* Eherenberg. Los otros géneros son *Exuviaella* Cienkowski (1881) (*E. cavanillesiana*, *E. cordata*, *E. lima*, *E. sacculus*), *Mesoporus* Lillick (1937) (*M. adriatus*, *M. globulus*, *M. parthasarathicus*, *M. perforatus*) y *Plagiodinium* Faust y Ballech (*P. belizeanum*). Por otra parte, a primera vista parece haber una relación entre la morfología y la toxicidad, en la que se antoja dividir a la familia en dos géneros, uno de los cuales estaría compuesto por células redondeadas, sin espina, tóxicas y productoras de mucosidad lo que les permite un hábito bentónico o epibentónico, en tanto que el otro es de vida libre y no tóxico.

La posición del Orden Prorocentrales dentro de la División varía en dos de los tres modelos, que de acuerdo a Fensome *et al.* (1993), explican la evolución de los

dinoflagelados: El modelo del incremento del número de placas, que se basa en la evidencia paleontológica, sostiene que Prorocentrales es el orden más antiguo y homologa la valva izquierda con la epiteca, la valva derecha con la hipoteca y el área con pequeñas placas asociadas a los flagelos, con el sulcus. En el modelo de reducción de placas, basado en la evidencia neontológica, Prorocentrales es el grupo más avanzado y por último, en el modelo de fragmentación de placas, que trata de conciliar toda la evidencia existente, Prorocentrales es considerado el grupo más antiguo.

La diagnosis taxonómica supraespecífica del género *Prorocentrum*, de acuerdo a la clasificación que unifica los códigos de la botánica y la paleontología propuesta por Fensome *et al.* (1993), es la siguiente:

**División Dinoflagellata:** Dos flagelos, no hay ruptura de membrana nuclear en la mitosis ni uso acromático.

**Subdivisión Dinokariota:** Siempre posee un dinocarion al menos en una fase de su ciclo de vida.

**Clase Dinophyceae:** Posee un dinocarion en todos los estadios del ciclo de vida.

**Subclase Prorocentrophycidae<sup>2</sup>:** Los flagelos se insertan en la parte apical y no hay *cingulum* ni *sulcus*. Presencia de placas tecales y de un flagelo ondulante, éste último claramente homólogo al flagelo transverso de otros dinoflagelados.

Las células están comprimidas lateralmente y su teca consiste de dos grandes valvas unidas en los márgenes (*sutura*) y por pequeñas placas que rodean los dos poros apicales. La valva derecha usualmente posee una muesca. El par de flagelos emerge a través de un poro flagelar grande. Las placas apicales están asociadas con una o dos espinas conspicuas, una siempre más larga que la otra (Fensome *et al.*, 1993, 1999). La mayoría de los representantes de este género son marinos, planctónicos y epibentónicos y algunos forman florecimientos tóxicos que presentan peligros a la salud y a la economía (Steidinger & Tangen, 1996; Faust *et al.*, 1999; Faust & Gullledge, 2002).

La especie *Prorocentrum micans* Ehrenberg es la especie tipo del género. Aunque considerada una especie bien definida, sus características diagnósticas se superponen, en la literatura, con las de *P. gracile* Schütt. Ambas especies son comunes en las costas del Pacífico mexicano, y florecimientos de *P. micans* han sido reportados por Cortés Altamirano y Luna Soria (1997). Otra especie muy semejante a *P. gracile* es *P. sigmoides* Böhm. Dodge (1975) propuso que debería ser considerada un sinónimo de *P. gracile* porque hasta entonces había sido reportada menos de 10 veces, sin duda un criterio muy subjetivo. Sin embargo, en México ha sido reportada

---

<sup>2</sup> La misma información es usada para definir la subclase **Prorocentrophycidae**, al orden Prorocentrales y a la familia Prorocentraceae, en el texto original (Fensome *et al.*, 1993).

consistentemente y tratada con el status de especie (Osorio-Tafall, 1942; Licea *et al.*, 1995; Hernández-Becerril *et al.*, 2000).

La taxonomía clásica de los Prorocentrales se basa en la forma del cuerpo, el tamaño, la relación largo:ancho, la forma y posición de la espina apical, la ornamentación y la densidad de los poros en las principales valvas.

La morfología es la herramienta de análisis taxonómico más accesible, por eso el objeto de esta investigación fue encontrar un conjunto de caracteres diagnósticos, morfológicos y morfométricos, con el potencial para recrear la relación filogenética entre las especies del complejo *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides*. En el mismo sentido, se consideró a la morfometría como un método objetivo para describir la morfología externa de las células y como una herramienta con la resolución suficiente para la distinción entre las especies.

*Prorocentrum micans* es la especie tipo para el género. En la literatura se dice que varía mucho en forma y tamaño. Tienen formas de lágrima o de hoja, redondeadas en el polo apical o parte anterior y con el polo antapical o parte posterior, puntiagudo. Poseen una espina apical bien desarrollada en la valva izquierda. Las células son de tamaño mediano, aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de largo, con una relación largo: ancho comúnmente menor a 2. La banda intercalar es ancha y lisa. (Faust & Gullledge, 2002). El cuerpo de la célula está cubierto por poros y poroides formando hileras (Figura 4). La descripción original en latín de esta especie

es muy escueta y no menciona dimensiones: “*Prorocentrum flavum*, testa compressa, ovata, antico fine late rotundato, mucronato, postico acuto”.

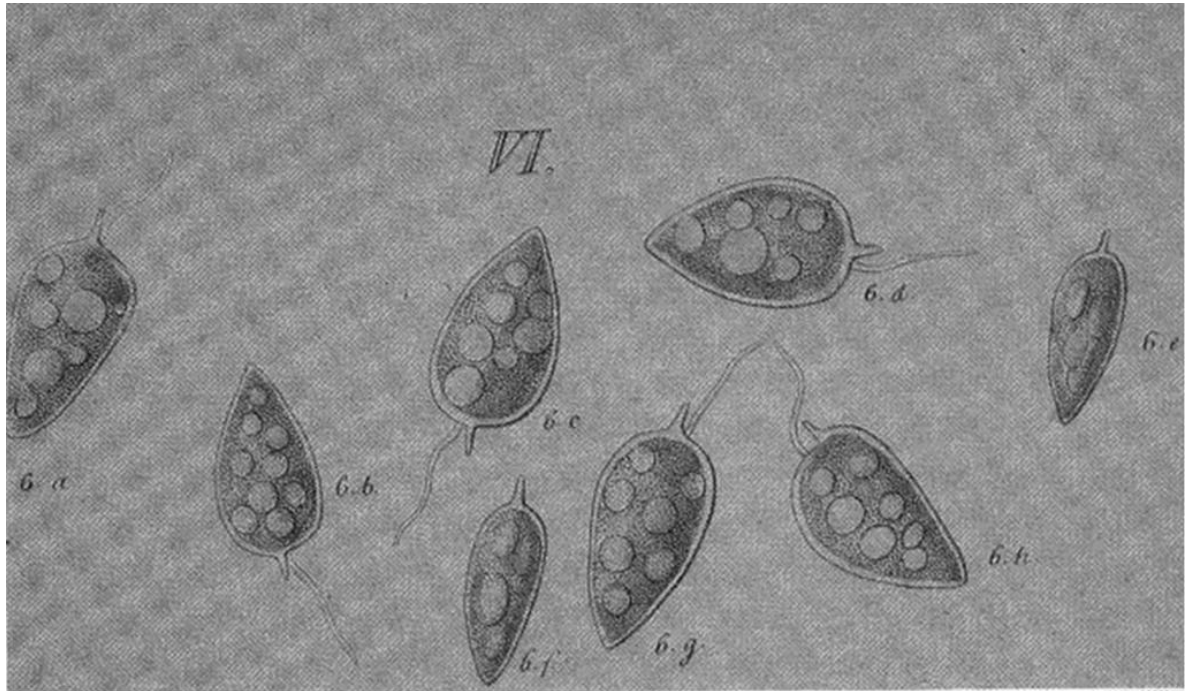


Figura 4. Iconotipo de *Prorocentrum micans* Ehrenberg (1835), tomado de McLachlan et al. (1997).

*Prorocentrum gracile* Schütt se describe como representada por células lanceoladas, más o menos redondeadas en la parte apical y acuminadas en la parte antapical, a veces ligeramente truncadas en el polo posterior. Poseen una espina bien desarrollada, con eje espiniforme robusto y membrana angosta, más o menos invisible. Cuando se observan las células en vista ventral en ocasiones se aprecia una espina basal corta que contribuye a sostener la membrana. Ornamentación del mismo tipo que *P. micans*. Células de tamaño mediano (aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de largo) con una relación largo: ancho comúnmente mayor a 2 (Faust y Gullledge,

2002). La publicación que erige a *Prorocentrum gracile* no tiene descripción ni menciona dimensiones, contiene cuatro imágenes (Figura 5) que combinan partes de varias células y muestran el proceso de descomposición y pérdida de los flagelos, que es el tema central del texto en el cual se nombra a la especie, aunque sólo para ejemplificar este proceso.

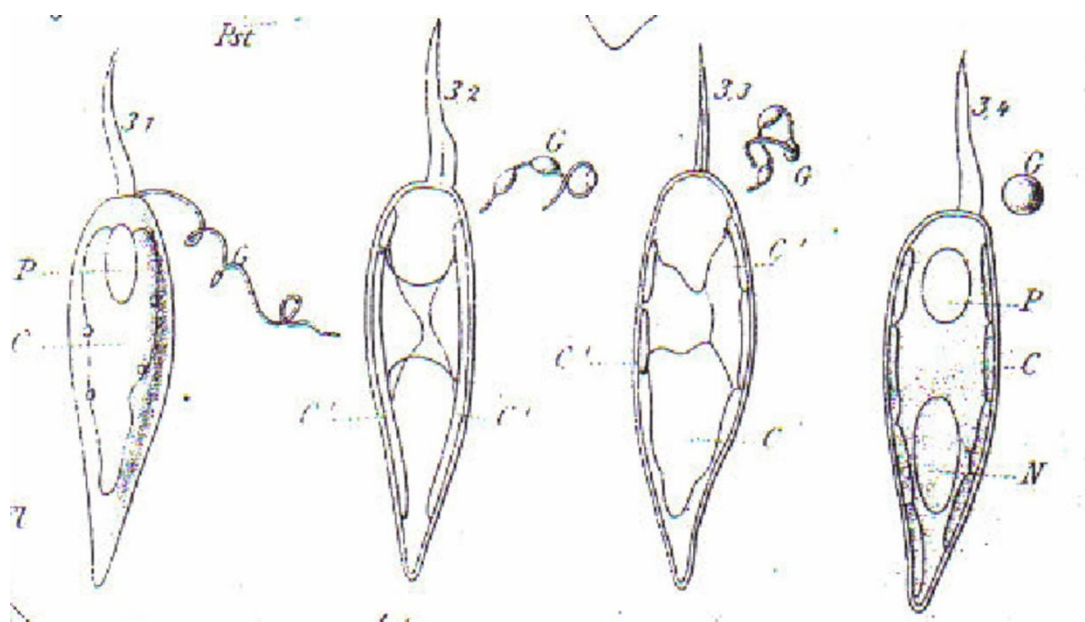


Figura 5. Iconotipo de *Prorocentrum gracile* (Schütt, 1895).

Las referencias bibliográficas de *Prorocentrum sigmoides* Bohm, describen células muy alargadas, lanceoladas y claramente sigmoides, con un extremo posterior puntiagudo y una espina anterior muy alargada, con forma de “S” y alada. Poros distribuidos de manera regular en la teca. Tres o cuatro hileras de poros en el eje principal: una hilera de poros (3-5) irradian oblicuamente hacia el margen más curvado, cerca del extremo posterior (Hernández-Becerril *et al.*, 2000). Con espinas largas y finas dispersas en la superficie de ambas valvas (Osorio Tafall, 1942).

Dodge (1975) consideró que *P. sigmoides* era sinónimo o que está dentro de la circunscripción de *P. gracile*, aunque Hernández-Becerril *et al.* (2000) la consideran una especie válida. En esta investigación se evaluará a *P. sigmoides* como parte del complejo. Böhm (1933:398) presenta una breve descripción en alemán de *Prorocentrum sigmoides* con una ilustración (Figura 6) que muestra ambas valvas, la derecha con la espina apical y la valva izquierda sin espina e incluye dimensiones aunque sin mencionar cuantos organismos fueron medidos.

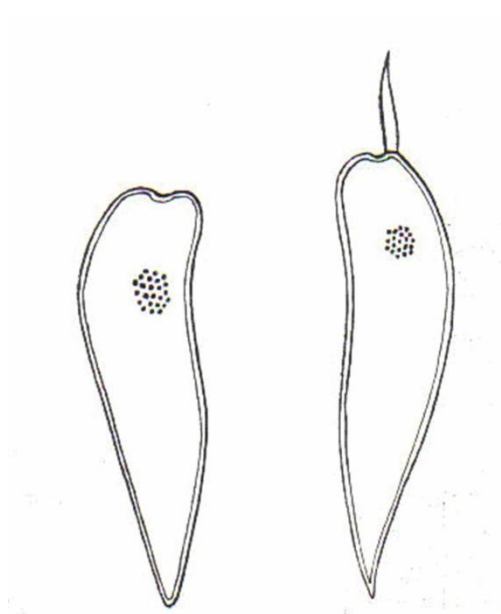


Figura 6. Iconotipo de *Prorocentrum sigmoides*. Tomado de Böhm (1933).

Las Tablas 2 y 3 resumen las características diagnósticas publicadas por varios autores desde 1933 hasta el 2000, su estudio revela que las dimensiones de las especies se superponen y que los autores no siempre coinciden en los caracteres que son importantes de evaluar.

Tabla 2. Resumen de los caracteres\* diagnósticos de *Prorocentrum micans*, *P. gracile*, y *P. sigmoides* definidas en la literatura.

Caracteres	<i>P. micans</i>	<i>P. gracile</i>	<i>P. sigmoides</i>
Forma de la célula	Redondeada en la región anterior y puntiaguda en la posterior	Similar a <i>P. micans</i>	Similar a <i>P. micans</i>
Posición del ancho máximo	A la mitad de la célula	No está indicada en textos	
Largo	15-80µm	40-60µm	68-82 µm
Ancho	15-50µm	23-25µm	20-23 µm
Relación largo – ancho (l:a)	<2	>2	>3
Superficie de la valva	Rugosa con diminutas depresiones someras	Similar a <i>P. micans</i>	Similar a <i>P. micans</i> , pero con espinas en la superficie
Patrón de poros	Líneas cortas con arreglo radial	Similar a <i>P. micans</i>	Similar a <i>P. micans</i>
Densidad de poros	83-139 por valva	No está indicada en texto	
Espina apical	Alada en valva izquierda	Robusta, alada a veces con forma de cabeza de flecha	En valva derecha, a veces sigmoide
Largo de la espina	7-12 µm	8-11 µm	13-20 µm

---

\* De acuerdo con Osorio-Tafall 1942, Bursa 1959, Taylor 1976, Balech 1988, Licea *et al.*, 1995, Steidinger y Tangen 1996, Faust *et al.*, 1999, Hernández-Becerril *et al.*, 2000 y Faust y Gullledge 2002.



Tabla 3. Comparación de las medidas diagnósticas publicadas por varios autores (datos en  $\mu\text{m}$ )

Especie	<i>Prorocentrum micans</i>				<i>Prorocentrum gracile</i>				<i>Prorocentrum sigmoides</i>				Localidad
	lt	am	l:a	le	lt	am	l:a	le	lt	am	l:a	le	
Autor													
Böhm 1933	-	-	-	-	-	-	-	-	72-77	20	3.6-3.9	20	Atlántico sur
Osorio Tafall 1942	-	-	-	-	-	-	-	-	68-82	21-23	3.2-3.9	13-19	México Acapulco, Pacífico sur
Bursa, 1959	36-49 20-80	27-39 15-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Atlántico norte (USA)
Bursa, 1959	15-60	18-48	-	8-12	-	-	-	-	-	-	-	-	Tel-Aviv, Mediterráneo
Dodge 1975	35-70	20-50	-	-	40-60	-	-	-	-	-	-	-	U. K. Atlántico norte
Faust <i>et al.</i> , 1999	35-70	20-50	< 2	-	-	-	> 2	-	-	-	-	-	Varias
Hernández- Becerrilef <i>al.</i> , 2000	40-57	26-30	< 2	7-9	42-51	23-25	> 2	8-11	70-73	22-23	-	16	México Pacífico subtropical

En cuanto a las relaciones filogenéticas, Dodge (1975) fue el primero en explorar las posibles relaciones entre las especies de *Prorocentrum*, basadas en la evolución de los caracteres diagnósticos del grupo. Esto implicaba una dirección en el cambio de los caracteres: de valvas lisas a valvas con depresiones y/o espinas, de células redondas a alargadas y a la adquisición de la espina apical cada vez más larga o a presentar dos espinas (Figura 7). Pero la dirección de los cambios de los caracteres que propuso no fue suficiente para fundamentar una hipótesis comprensiva e incluyente para las 21 especies que consideró en su análisis. Por ello y como bien lo ilustra su diagrama, una cuarta parte de las especies, que incluye el segmento marcado con una línea punteada desde *P. minimum* (Pavillard) Schiller hasta *P. dentatum* Stein, parecen no tener una relación clara con las otras especies.

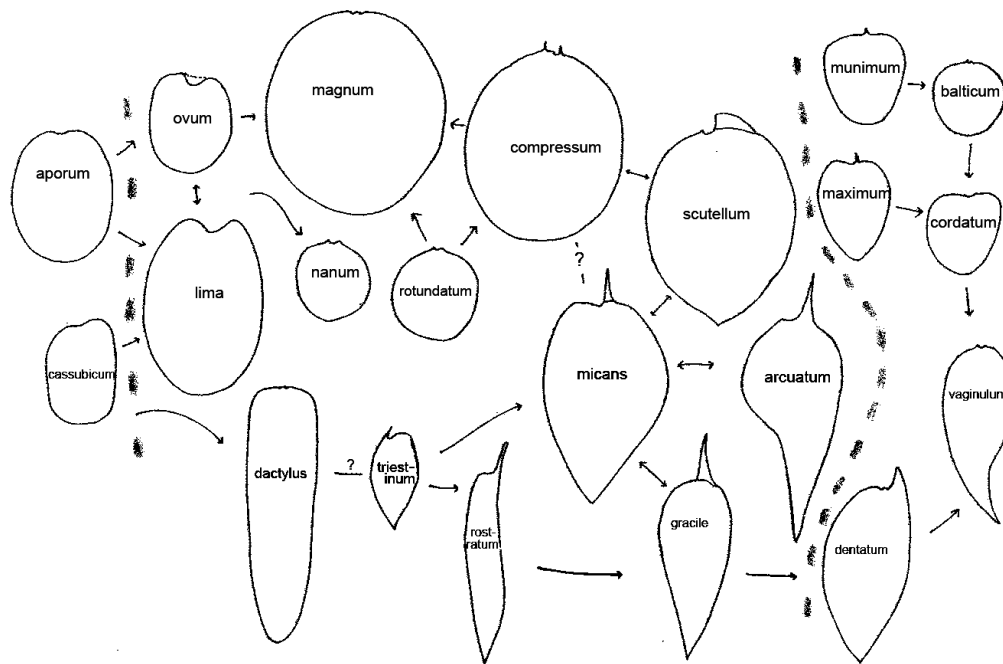


Figura 7. Relaciones filogenéticas entre las especies propuesta por Dodge (1975).

Si la primera aproximación basada sólo en la semejanza entre los caracteres morfológicos reveló las dificultades para establecer relaciones de ancestría-descendencia entre las especies; los estudios que involucraron el análisis molecular de las relaciones entre los dinoflagelados, revelaron que la consistencia morfológica entre las especies de *Prorocentrum* enmascara profundas diferencias moleculares. Los resultados revelan que hay polifilia dentro del orden.

En los análisis de la SSUrRNA (subunidad pequeña del RNA ribosomal) las especies de *Prorocentrum* se intercalan entre especies de los órdenes *Peridinales*, *Suessiales*, *Gymnodinales* y *Dinophysiales* (Saldarriaga *et al.*, 2001) (Figura 8); en tanto que en los análisis de la LSUrRNA (subunidad grande del RNA ribosomal) quedan intercaladas entre las especies de los órdenes *Gymnodinales*, *Dinophysiales*

y *Peridinales*. Un análisis de las especies de *Prorocentrum* que aparecen consistentemente en los árboles publicados, nos muestra que sólo *P. micans* Ehrenberg, *P. mexicanum* Tafall, *P. minimum* (Pavillard) Schiller y *P. lima* (Ehrenberg) Dodge han sido utilizadas sistemáticamente. *P. micans* aparece como el taxon hermano de *P. mexicanum* en 4 de 5 árboles (todos analizando tanto LSU como SSUrRNA), en tanto que en árboles construidos con base en el análisis de la proteína cob y segmentos de la SSUrRNA, *P. micans* es el taxon hermano de *P. minimum* en los árboles donde aparece (Zardoya *et al.*, 1995; Grzebyk *et al.*, 1998; Daugbjerg *et al.*, 2000; Pearce y Hallegraef, 2004; Saldarriaga *et al.*, 2001; Saldarriaga *et al.*, 2004, Taylor, 2004, Zhang *et al.*, 2005).

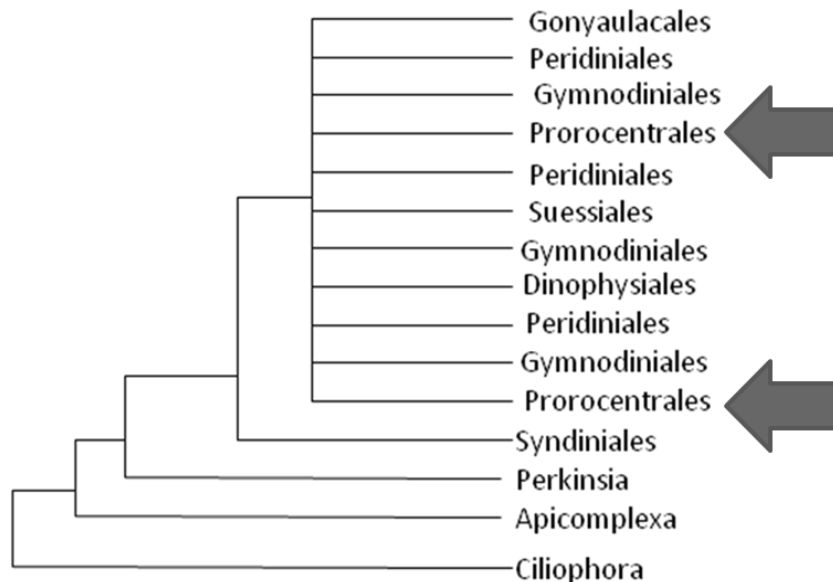


Figura 8. La filogenia molecular (SSUrRNA) más completa de los dinoflagelados, incluye más de 100 especies marinas y de aguas dulces, autótrofas y heterótrofas (resumida y modificada de Saldarriaga *et al.* 2001).

## JUSTIFICACIÓN

La sistemática basada en análisis morfológicos y morfométricos que incluyen el estudio de poblaciones y no sólo de ejemplares tipo, se ha concentrado en el estudio de complejos de especies, es decir de especies que parecen estar aisladas reproductivamente pero que son morfológicamente muy similares y en algunos casos virtualmente idénticas. Estos complejos de especies podrían ser resultado de un proceso de especiación reciente o producto colateral de la sistemática tipológica. Los dinoflagelados son un grupo en el que se ha señalado la presencia de varios de estos complejos y uno de los complejos reconocidos es el formado por *Prorocentrum micans* Ehrenberg, *P. gracile* Schütt y *P. sigmoides* Bohm.

Dado que en el Pacífico Mexicano se han registrado 20 especies de *Prorocentrum* (Hernández-Becerril *et al.*, 2000; Okolodkov & Garate Lizarraga, 2006): *Prorocentrum balticum* (Lohmann) Loeblich, *P. compressum* (Bailey) Abé ex Dodge, *P. concavum* Fukuyo, *P. dactylus* (Stein) Dodge, *P. dentatum* Stein, *P. emarginatum* Fukuyo, *P. gracile* Schütt, *P. lebourae* Schiller, *P. lima* (Ehrenberg) Dodge, *P. maximum* (Gobrrret) Schiller, *P. mexicanum* Tafall, *P. micans* Ehrenberg, *P. minimum* (Pavillard) Schiller, *P. oblongum* (Schiller) Abé, *P. robustum* Tafall, *P. rostratum* Stein, *P. scutellum* Schröder, *P. sigmoides* Bohm, *P. triestinum* Schiller, *P. vaginulum* (Ehrenberg), la posibilidad de recolectarlas y cultivarlas, para su posterior secuenciación, era prometedora en términos de posicionar a las especies del complejo en su relación filogenética con otras especies de *Prorocentrum*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la morfología y filogenia molecular del complejo *Prorocentrum micans*, *P. gracile*, *P. sigmoides* y establecer la relación que tienen con otras especies del mismo género reportadas para el Pacífico Mexicano, región estudiada desde hace varios años por el Laboratorio de Fitoplancton Marino y Salobre de la UAM-Iztapalapa y del que se tiene una importante colección de muestras.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- El análisis morfométrico de caracteres morfológicos
- El análisis filogenético de caracteres moleculares

Debido a que cada objetivo demanda métodos de estudio distintos, la investigación se desarrolla en dos etapas, la primera consiste en el análisis morfométrico y la segunda en el análisis filogenético.

## MÉTODOS

### MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides*

Las características diagnósticas de las especies se establecieron a través del estudio de las descripciones originales y su iconografía (iconotipos de las Figuras 4, 5 y 6), así como de los caracteres mencionados en los libros clásicos de taxonomía de dinoflagelados (Bursa, 1959; Taylor, 1976; Balech, 1988; Steidinger & Tangen, 1996; Faust *et al.*, 1999; Faust & Gullledge, 2002), y los observados en las fotografías de las células del Pacífico Mexicano (Licea *et al.*, 1995; Hernández-Becerril *et al.*, 2000).

La investigación sobre las características diagnósticas de las especies fue utilizada para definir a priori un conjunto de caracteres para cada una de las formas asociadas a cada una de las especies incluidas en el complejo (morfotipos). Cada una de las células observadas al microscopio fue asignada a un morfotipo particular antes de ser medida y antes de que el análisis estadístico se realizara. Los morfotipos se describieron con la mayor cantidad de caracteres cualitativos y cuantitativos, así como con caracteres observables directamente en las células y otros calculados a partir de los primeros, que nos permitieron establecer relaciones entre caracteres cuantitativos y definir con ellos la forma.

El objetivo de trabajar con morfotipos fue establecer tres conjuntos de características independientes, buscando eliminar toda intersección, para utilizarlo

como patrón de referencia para las células observadas, descomponiendo el complejo en especies bien definidas.

El análisis morfométrico se realizó utilizando 563 células provenientes de 10 localidades de las costas del Pacífico Mexicano y de 5 cultivos clonales, varios de ellos donados por el Dr. Santiago Fraga a la Dra. María Esther Meave (Tabla 4, Figura 9). Algunas células fueron medidas directamente en un microscopio óptico Zeiss, equipado con un objetivo micrométrico; otras fueron fotografiadas usando DM LB Leica y medidas sobre la fotografía y otras más se midieron usando fotografías de microscopio electrónico de barrido (MEB). El material para el MEB se fijó en formol al 4% en agua marina, posteriormente fue enjuagado con agua destilada, secado al aire y cubierto con oro para ser examinado con un microscopio Zeiss modelo DMS 94-A operado a 10 kw.



Tabla 4. Datos de recolecta y cultivo de las células analizadas: *Prorocentrum micans* (m), *P. gracile* (g) and *P. sigmoides* (s).

Muestra	Tipo	Latitud (N)	Longitud (W)	Localidad	Fecha	Transecto	Especies
FPM 1195	Recolectado	19°03'35.2"	104°18'46.4"	Bahía de Manzanillo, Colima	200502	Horizontal	m,g,s
FPM 739	Recolectado	18°59'46"	104°21'51"	Bahía de Manzanillo, Colima	080400	Horizontal	m,g,s
FPM 1188	Recolectado	23°12'49"	106°27'46"	Isla Lobos Mazatlán, Sinaloa	180502	Horizontal	m,g,s
FPM 548	Recolectado	17°37'20"	101°33'40"	Bahía de Zihuatanejo (El Peñon), Guerrero	061199	Vertical (50m)	m,g,s
FPM586	Recolectado	21°30'5.4"	105°18'39.5"	Bahía de San Blas , Nayarit	VII-99	Bottle (10m)	m,g
FPM 672	Recolectado	20°29'39"	105°36'44"	Cabo Corrientes, Jalisco	030600	Horizontal	m,g,s
CCMP694*	Cepa	32°25'04"	117°25'25"	La Joya, California, U.S. A.	-----	-----	m
CCMP 684*	Cepa	32°90'00"	117°25'50"	La Joya, California, U. S. A.	-----	-----	M
PMIV***	Cepa	-----	-----	Ria de Vigo, España	-----	-----	M
PGCV1**	Cepa	26°40'732"	111°49'749"	Bahía de Concepción, B. C. S.	-----	-----	G
PMCV1**	Cepa	26°40'732"	111°49'749"	Bahía de Concepción, B. C. S.	-----	-----	M
FPM 1401	Recolectado	-----	-----	Bahía de Concepción, B. C. S.	030902	Vertical	m

FPM1048	Recolectado	16°49'20"	99°53'33"	Bahía de Acapulco, Guerrero	191000	Horizontal	<i>m,g</i>
FPM1197	Recolectado	19°04'28.1"	104°19'59.6"	Bahía de Manzanillo, Colima	200502	Horizontal	<i>m,g,s</i>
FPM 1199	Recolectado	19°04'9.6"	104°21'25.3"	El Faro, Michoacán	250502	Horizontal	<i>g</i>

\*Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton , \*\*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., \*\*\* Instituto Español de Oceanografía-Centro Oceanográfico de Vigo.

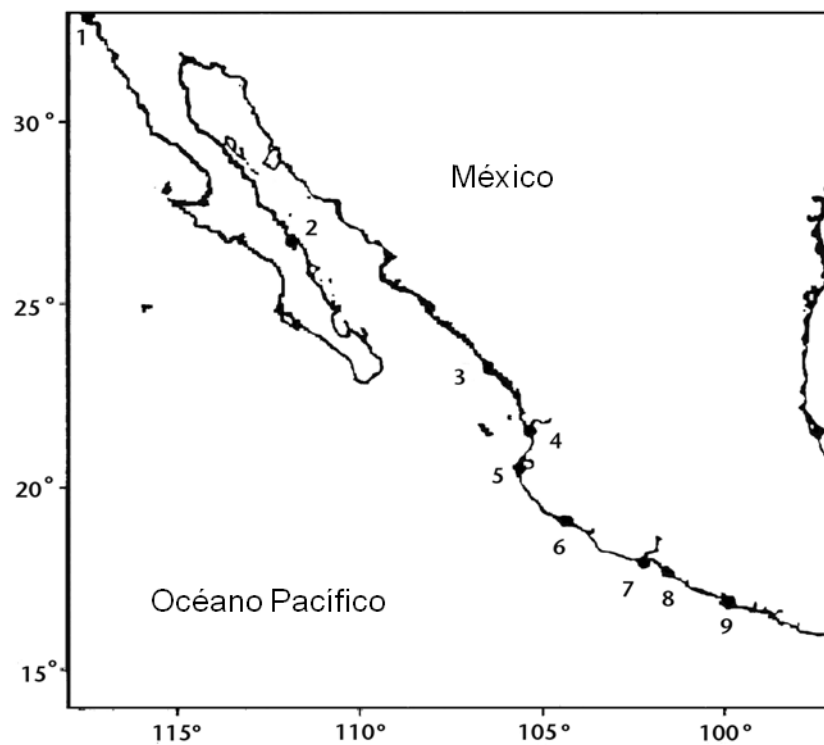


Figura 9. Localización de los sitios de recolecta. 1. La Joya, California, E. U. A., 2. Bahía Concepción, B. C. S., 3. Mazatlán, Sinaloa, 4. San Blas, Nayarit, 5. Cabo Corrientes, Jalisco, 6. Bahía de Manzanillo, Colima, 7. El Faro, Michoacán, 8. Bahía de Zihuatanejo, Guerrero, 9. Bahía de Acapulco, Guerrero.

### Caracteres morfométricos.

Las características que fueron medidas en cada célula se muestran en la Figura 10 y la Tabla 5. El conjunto de caracteres que se usó para definir los morfotipos incluyó la forma de los márgenes de la valva, la presencia de depresiones o poros en la superficie de las valvas y el tamaño de los poros. La Tabla 6 muestra los caracteres calculados a partir de los datos medidos, por ejemplo, la relación entre el largo y el ancho de la célula. Cada individuo observado fue asignado a un morfotipo antes de ser medido.

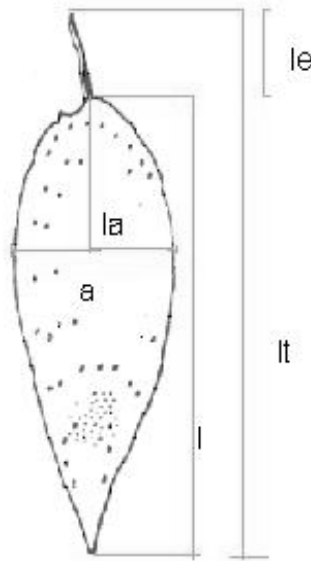


Figura 10. Caracteres medidos. *a*: ancho máximo, *la*: largo hasta el ancho máximo desde la base de la espina, *l*: largo sin espina, *lt*: largo total, *le*: largo de la espina.

Tabla 5. Caracteres medidos u observados directamente en las células.

Carácter		Descripción	Unidad de medida	Siglas
Continuo	Longitud total	Longitud de la célula incluyendo la espina	$\mu\text{m}$	lt
	Longitud de la valva derecha o izquierda	Longitud de la célula sin incluir la espina	$\mu\text{m}$	ls
	Largo hasta ancho máximo	Longitud de la célula de la base de la espina hasta el ancho máximo	$\mu\text{m}$	lam
	Longitud de la espina	Longitud de la espina desde la base de la célula	$\mu\text{m}$	le
	Ancho máximo	Ancho máximo de la célula	$\mu\text{m}$	am
	Forma de la célula	Contorno de la célula	Almendra lágrima chile	1 2 3
Cualitativo	Valva	valva observada	Derecha Izquierda	2 1
	Morfotipo	Morfotipo asignado	<i>P micans</i> <i>P gracile</i> <i>P sigmoides</i>	m g s
	Ornamentación	Poros mismo tamaño Poros diferente tamaño	Homogénea Heterogénea	1 2
	Densidad de poros chicos, en cada cuadrante de $50 \mu^2$	Número de poros	n	n
Cuantitativo	Densidad de poros grandes en cada cuadrante de $50\mu^2$	Número de poros	n	n
	Forma de los poros	Forma de los poros	alargada circular	1 2
Cualitativo	Diente en la parte posterior o antapical de la célula	Presencia de diente antapical	si no	1 2

Tabla 6. Caracteres producto de la relación entre dos medidas

Carácter	Descripción	Siglas
Relación largo/ancho de la célula	$l \div a$	<i>l:a</i>
Ancho máximo	$la \div l$	<i>la:l</i>
largo de la espina/largo de la célula sin espina	$le \div l$	<i>le:l</i>

La densidad de los poros en cada una de las valvas se estimó contando el número de poros en tres cuadrantes de  $50 \mu\text{m}^2$ , localizados al azar en la parte superior, media e inferior de cada valva. El diámetro de los poros se midió sobre fotografías de MEB, utilizando el software de medición Leica IM1000 (Leica, Heerbrugg Suiza).

## Análisis estadístico de los datos

La homogeneidad de la varianza por grupo se probó utilizando los procedimientos de Bartlett y Levene (Levene, 1960). Todos los caracteres, con excepción del carácter definido como le:l (la relación del largo de la célula hasta el ancho máximo entre el largo de la célula sin considerar la espina), fueron heterocedásticos, es decir la varianza de los errores estocásticos para cada observación no es un número constante y por lo tanto, el análisis estadístico comparativo entre las medias de los caracteres morfométricos se llevó a cabo utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *a posteriori* de comparación múltiple de Z de Bonferroni mediante el programa Stata (StataCorp 2003) y el NCSS 2001 (NCSS Company). Para la comparación estadística entre las medias de le:l se usó un ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

Para comprobar el porcentaje de células clasificadas correctamente se utilizó el análisis discriminante, usando los datos continuos en el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). El mismo análisis se utilizó para comparar los datos sin incluir las células provenientes de los cultivos clonales.

Para encontrar la similitud total entre los morfotipos se realizó un análisis de agrupamiento con el programa STATISTICA 6.0, usando distancias euclidianas y distancias simples para medir las similitudes. Se empleó una matriz con los promedios de todas las medidas de los caracteres para cada morfotipo.

Finalmente, se usó la matriz del promedio de las medidas de los mismos caracteres para cada uno de los morfotipos presentes en cada una de las 12 estaciones de campo y de los cinco cultivos para un total de 30 juegos de datos.

## FILOGENIA MOLECULAR DE *Prorocentrum* (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO

### Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de organismos recolectados y cultivados en la UAM-I (Rodríguez, 2006). También se usaron cultivos comprados en ceparios y donados por otras instituciones, las cuales aparecen al pie de la Tabla 7, que muestra el resumen de la información sobre los cultivos de los cuales se obtuvieron secuencias durante la presente investigación.



Tabla 7. Cultivos de *Prorocentrum* de los que proceden las secuencias en el presente estudio.

Especie	Cultivo	Localidad	Coordenadas	Región	Fecha ddmmaa	Colector	Institución	LSU NCBI clave	SSU NCBI clave
<i>P. gracile</i>	51L	Lázaro Cárdenas, Michoacán	17°56'17"N 102°11'6"W	4	081104	MRP/SAH	1	EF517249	EF517263
<i>P. gracile</i>	13A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	070604	MRP/CLR	1	EF517251	_____
<i>P. gracile</i>	PCGR3	Baja California Sur	_____	2	2004	Diana Góngora	1	EF517248	EF517264
<i>P. gracile</i>	PGCV1	Bahía Concepción, BCS	26°40'732" N 111°49'75" O	2	2004	Lourdes Morquecho	2	EF517250	_____
<i>P. micans</i>	PMCV1	Bahía Concepción, BCS	26°40'732" N 111°49'75" O	2	2004	Cristina Band	2	EF517254	_____
<i>P. micans</i>	23A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	070604	MRP/CLR	1	_____	EF517267
<i>P. micans</i>	33A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	070604	MRP/CLR	1	_____	EF517268
<i>P. micans</i>	43A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	070604	MRP/CLR	1	_____	EF517269
<i>P. micans</i>	12A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	040504	MRP/CLR	1	EF517257	EF517270
<i>P. micans</i>	CCMP684	La Joya, California, USA	32°90'00" N 117°25'50" O	CC	2004	_____	3	EF517255	_____
<i>P. mexicanum</i>	24A	Bahía de Acapulco, Guerrero	16°48'58"N 99°53'59"W	4	241104	MRP/CLR	1	EF517259	EF517271
<i>P. mexicanum</i>	31L	Lázaro Cárdenas, Michoacán	17°56'17"N 102°11'6"W	4	081104	MRP/SAH	1	_____	EF517272
<i>P. mexicanum</i>	91L	Lázaro Cárdenas, Michoacán	17°56'17"N 102°11'6"W	4	081104	MRP/SAH	1	EF517258	EF517273
<i>P. mexicanum</i>	PCMX	BCS	_____	2	2004	Diana Góngora	1	EF517260	EF517275
<i>P. mexicanum</i>	VGO680	Ria de Vigo, España	_____	Atlántico	2004	_____	4	EF517260	EF517275
<i>P. lima</i>	PRL1	Isla El Pardo, Golfo de California, BCS	23°35' N 110°49.6' O	2	2004	_____	2	EF517252	EF517266
<i>P. lima</i>	PL7V	Ria de Vigo, España	_____	Atlántico	2004	_____	4	EF517253	EF517266
<i>P. compressum</i>	VGO621	Ria de Vigo, España	_____	Atlántico	2004	_____	4	EF517256	EF517262
<i>P. minimum</i>	3V	Ria de Vigo, España	_____	Atlántico	2004	_____	4	EF517247	_____

Región: Zonas del Pacífico: (1) Costa oeste de Baja California, (2) Golfo de California, (4) Pacífico tropical, (CC) Corriente de California, Templado-Subtropical; Colectores: MRP-Mónica Rodríguez Palacio, SAH-Sergio Álvarez Hernández, CLR-Cruz Lozano Ramírez; Instituciones: (1) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, (2) Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste SC, México, (3) Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, USA, (4) Instituto Español de Oceanografía-Centro Oceanográfico de Vigo, España

Extracción, amplificación y secuenciación de LSU y SSU rRNA.

La extracción exitosa de la mayor cantidad de ADN se obtuvo de células frescas provenientes de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Se cosecharon 1.5 ml de cultivo, los cuales fueron centrifugados a 8000 rpm durante 12 minutos. El medio de cultivo fue eliminado. Las células se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, posteriormente se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de agua inyectable a temperatura ambiente, resuspendiendo las células, para luego centrifugar a 8000 rpm durante 5 minutos y así romper la pared celular. Se extrajo el ADN utilizando DNeasy Plant Minikit de Quiagen, siguiendo el protocolo sugerido por la empresa. La presencia de ADN se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, revelado con EtBr (bromuro de etidio) y fotografiado en una cámara MULTIGENIUS Bio imaging system (Syngene) utilizando el programa GeneSnap 6.02 (Synoptics Ltd.). Algunos geles se muestran en la Figura 11.

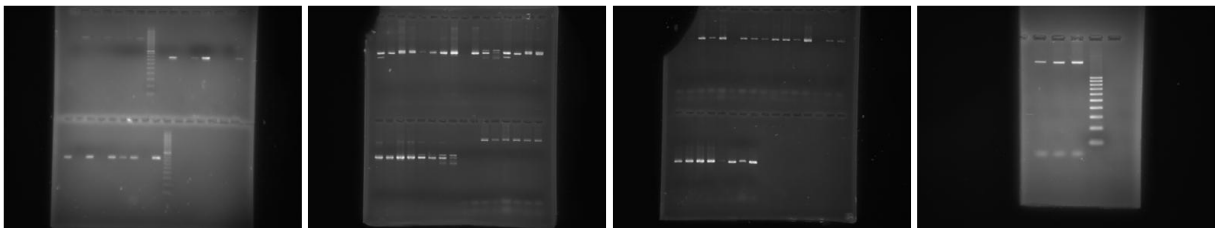


Figura 11. Algunos geles de agarosa. La subunidad SSUrRNA es menos pesada que la LSUrRNA

Para amplificar el segmento de ADN que tradujo la secuencia de LSU rRNA correspondiente a la región D1-D2, mediante el proceso denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores (*primers* en inglés) DIR (5'-ACCCGCTGAAATTTAAGCATA-3') y D2C (5'-

CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA-3') (Bolch, 2001); por otra parte, para amplificar el fragmento de SSUrRNA, se emplearon los iniciadores 16S1N (5'-TCCTGCCAGTAGTCATATGC-3') y 16S2N (5'TGATCCTTCT/CGCAGGTTTAC-3') (Grzebyk *et al.*, 1998). Para amplificar estas regiones se utilizó ACCUPOWER PCR Premix de Bioneer, al cual se añadieron 1.5 µl de una mezcla de ambos iniciadores, 18.5 µl de una mezcla del templado de ADN y agua inyectable para obtener 20 µl de reactivo. El protocolo de amplificación en el termociclador Touchgene gradient (Techne) consistió, para LSUrRNA, en una desnaturalización inicial a 94°C x 2' y 30 ciclos de las siguientes características: desnaturalización: 94°C x 1', unión (*annealing*): 58°C x 1.5', extensión: 72°C x 3' y la extensión final a 72°C x 6'. El protocolo de amplificación para SSU r DNA consistió en una desnaturalización inicial a 94°C x 2' y de 30 ciclos donde la desnaturalización ocurrió a 94°C x 1', unión (*annealing*): 58.6°C x 2', extensión: 72°C x 3' y la extensión final a 72°C x 7'. La presencia de producto amplificado se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%. Estos productos se purificaron utilizando el QIAquick PCR purification kit de Quiagen, siguiendo las instrucciones de la empresa y comprobando nuevamente, mediante una electroforesis de gel de agarosa 1%, la calidad y cantidad del producto de PCR mediante una escalera (*ladder*, en inglés).

Posteriormente se realizó la PCR de secuenciación utilizando el Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit de ABI (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del proveedor, programando el termociclador con una desnaturalización inicial a 96° C x 2 m, seguido de 25 ciclos donde la desnaturalización fue de 95° C x

10 s, unión (*annealing*): 60° C x 5 s, extensión: 60° C x 4 m. El producto se purificó utilizando las columnas de purificación Centri-Sep (52 mg de sephadex G-50 suspendidos en 800 µl de agua inyectable), siguiendo las instrucciones de la empresa.

Los productos de PCR de secuenciación purificados fueron enviados para ser secuenciados al Instituto de Biología de la UNAM y al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I.

Las secuencias obtenidas corresponden a las especies *Prorocentrum gracile*, *P. lima*, *P. micans*, *P. mexicanum* provenientes de las costas de Baja California, Guerrero y Michoacán, recolectadas y cultivadas por la UAM-I y el CIBNOR (Tabla 7).

## Alineación de secuencias

La alineación de las secuencias se realizó en etapas, comenzando por alinear, para cada cultivo, las parejas de secuencias en ambos sentidos mediante el análisis *Pairwise alignment* (optimal GLOBAL alignment) utilizando el programa BioEdit versión 7.0.5.2 (Hall, 1999), las alineaciones resultantes fueron revisadas y mejoradas a simple vista. En un segundo paso se alinearon las secuencias de los cultivos de la misma especie secuenciados durante esta investigación, utilizando dentro del programa BioEdit, el análisis Clustal W, (full multiple alignment with 1,000 bootstrap) (Thompson *et al.*, 1994) revisando y mejorando las alineaciones a simple vista, posteriormente se alinearon con las secuencias de la misma especie publicadas en la página del NCBI.

Secuencias provenientes del banco de genes del NCBI.

Las secuencias fueron seleccionadas considerando que era importante tener acceso a su identidad taxonómica, de manera que se privilegiaron aquellas secuencias provenientes de cepas. También se intentó incluir la mayor cantidad de secuencias provenientes del Océano Pacífico, con objeto de que el análisis de las topologías contribuyera con información sobre labiogeografía del grupo. La información correspondiente a las secuencias obtenidas del banco de genes se muestra en la Tabla 8. El conjunto de todas las secuencias fue alineado con Clustal W.

Tabla 8. Secuencias obtenidas del banco de genes NCBI usados en el presente estudio. F= florecimientos

Especie	Cultivo	LSU NCBI clave	SSU NCBI clave	Localidad de procedencia
<i>Prorocentrum balticum</i> (Lohmann) Loeblich	F	AF042816		Massachussets, USA
<i>P. balticum</i>	D-71		DQ887511	Corea del Sur
<i>P. belizeanum</i> Faust	PBMA_01	AJ567460		Isla Reunión, SW, océano Índico
<i>P. compressum</i> (Bailey) Abé ex Dodge	PCPA_01	AY259169		Port Arthur, Tasmania
<i>P. concavum</i> Fucuyo	PCRN_01	AJ567464		Isla Reunión, SW, océano Índico
<i>P. dentatum</i> Stein		AY833515		China
<i>P. dentatum</i>	CCMP1517		DQ336057	Pacífico Sur
<i>P. emarginatum</i> Fukuyo	PERN_05	AJ567465		Isla Reunión, SW, océano Índico
<i>P. emarginatum</i>	PREU-2		Y16239	Isla Reunión, SW, océano Índico
<i>P. gracile</i> Schütt	PGDW01	AY259165		Derwent River, Tasmania
<i>P. gracile</i>	CCCM765		AY443019	Canadá
<i>P. lima</i> (Ehrenberg) Dodge	PL7V	L38634		IEO, Vigo, España
<i>P. lima</i>	CRLMN-6		AB189778	Limón, Costa Rica
<i>P. mexicanum</i> Tafall		AF260378		Dinamarca
<i>P. mexicanum</i>	SP3		DQ174089	Cat Ba, Hai Phong, Viet Nam
<i>P. micans</i> Ehrenberg	EMBL040623	DQ485144		China
<i>P. micans</i>	F	AF042814		Corea del Sur
<i>P. micans</i>			AJ415519	Noruega
<i>P. minimum</i> (Pavillard) Schiller	F	DQ054539		Mar del este de China, provincia Fijian
<i>P. minimum</i>	PMIN1	L38636		IEO, Lisboa
<i>P. minimum</i>	JA0001		DQ336066	Connecticut, USA
<i>P. rhathymum</i> Tafall	PRLS02	AY259167		Little Swanport, Tasmania
<i>P. triestinum</i> Schiller	MBIC11147		AB183673	Japón
<i>P. triestinum</i>	PT5V	L38638		IEO, Vigo, España
<i>P. triestinum</i>	F	AF042815		Corea del Sur
<i>Toxoplasma gondii</i> Nicolle & Manceaux, 1908		X75429	X75429	Nueva Cork, USA

## Análisis Filogenético

Se utilizaron dos métodos para realizar el análisis filogenético: el método de Parsimonia utilizando el programa PAUP 3.1 (Swofford, 1991) y el análisis Bayesiano, usando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist 2001, Ronquist y Huelsenbeck 2003). En la Tabla 9, se presentan los modelos de optimización elegidos en el análisis de Parsimonia. El método elegido desde el inicio para evaluar las relaciones filogenéticas fue el de Parsimonia, sin embargo se decidió incluir el método Bayesiano debido al artículo publicado en 2005 por Murray *et al.*, que indicaba que dadas las características de LSUrRNA y SSUrRNA, el análisis probabilístico había dado mejor resolución al mostrar las relaciones filogenéticas entre los dinoflagelados.

Tabla 9. Modelos de optimización y funciones objetivas utilizados en el análisis de Parsimonia de cada subunidad de RNA ribosomal.

Matriz	Número de Taxa	Número de bases	Modelo de Optimización	Funciones o estrategias de optimización
LSU	32	639	<i>Full heuristic</i> TBR 100,000 réplicas 3 repeticiones con el mismo resultado	DELTRAN Gap como 5 <sup>ta</sup> base
SSU	23	639	<i>Branch &amp; Bound</i> 100 réplicas 3 repeticiones con el mismo resultado	DELTRAN Gap como 5 <sup>ta</sup> base
LSU+SSU	11	1185	Búsqueda Exhaustiva	<i>DELTRAN</i> Gap como 5 <sup>ta</sup> base

Para reconstruir las filogenias, se utilizó como grupo externo a la especie *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1908 (Apicomplexa, Alveolata).



Se optó por utilizar un solo grupo externo ya que explícitamente en Mr Bayes se indica que un solo taxón externo debe ser colocado encabezando la matriz de datos.

Cada subunidad de RNA ribosomal se analizó de manera independiente. Además se realizaron los análisis aditivo y particionado de una matriz formada por selectas regiones de cada subunidad (LSU+SSU rDNA), incluyendo en el análisis a las especies cuyas secuencias provinieran de la misma cepa. Esta provisión se tomó con base en la dificultad de asegurar la correcta identificación taxonómica de las secuencias en el banco de genes.

Los análisis de parsimonia *Full Heuristic* y *Branch and Bound* se repitieron tres veces, cada vez utilizando una semilla diferente y en cada análisis se le pidió al programa realizar de 1, 000 (*Branch and Bound*) a 100,000 (*Full Heuristic*) réplicas, obteniendo los mismos resultados.

Adicionalmente se utilizó el programa ModelTest (Posada y Crandall 1998), para seleccionar de manera estadística, rigurosa y objetiva, una hipótesis evolutiva a partir de cada matriz de secuencias alineadas (Tabla 10). El resultado obtenido se usó para establecer los parámetros del análisis bayesiano.

Tabla 10. Resultados de ModelTest para las matrices LSU, SSU y LSU+SSU. Se muestran los resultados de AIC, por que representa el resultado de la comparación simultánea de todos los modelos.

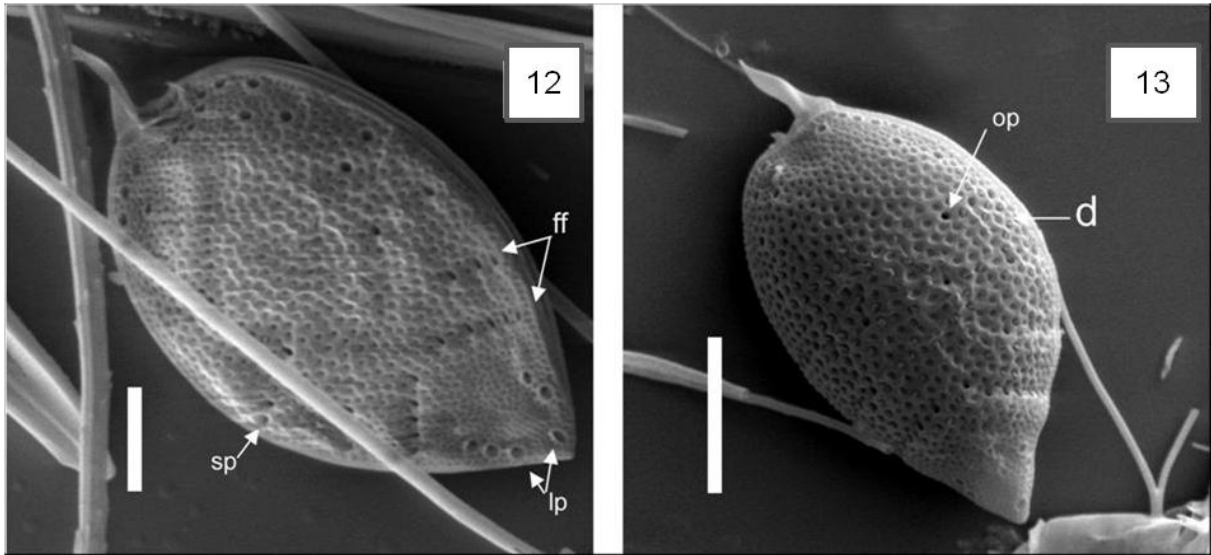
AIC	TrN+G
-Ln	3850.0498
AIC	7712.0996
Frecuencia de las bases	0.2856, 0.1957, 0.2625, 0.2563
Tasas de Cambio	1.0000, 1.5833, 1.0000, 1.0000, 4.3544, 1.0000
Distribución de la tasa de sustitución	Gamma
Forma	1.0705

En todos los casos y de acuerdo a los dos procedimientos estadísticos disponibles para la toma de decisiones: LRT (Prueba de intervalo de probabilidad jerarquizada) y AIC (criterio de información Akaike), el modelo evolutivo fue el mismo, TrN+G (Tamura-Nei plus Gamma [modelo 23]). Este modelo, calculado a partir del análisis de ADN mitocondrial de mamíferos, considera la presencia de fuertes desviaciones en la tasa de transiciones/transversiones (T/T), es decir, que aparecen con frecuencia diferencias en las tasas de sustitución transicionales entre purinas (A y G) y entre pirimidinas (T y C). También considera que a lo largo de la secuencia la tasa de sustitución varía de un lugar a otro de la misma secuencia y que la forma de esta variación se aproxima a la forma de la distribución gamma. Las diferencias en T/T afectan las tasas de cambio de un nucleótido a otro. Estas diferencias se incorporan en el modelo como parámetros de tasas de cambio o parámetros de intervalo. Para un modelo de cambio simétrico, que no considera la posición de los codones, podemos tener 10 parámetros: 6 modelos de sustitución o parámetros de intervalo y 4 parámetros de frecuencias de nucleótidos.

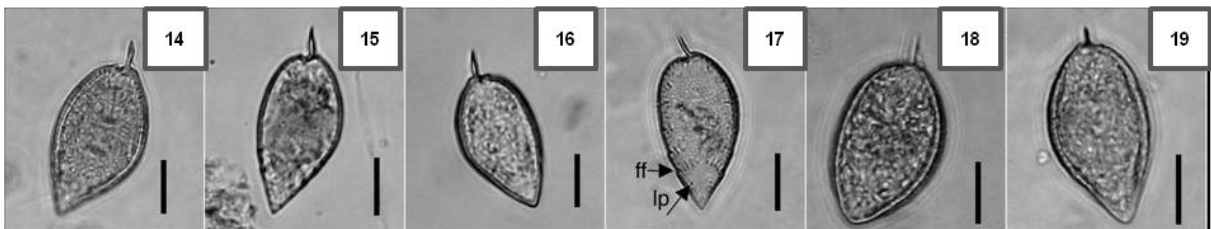
## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides*

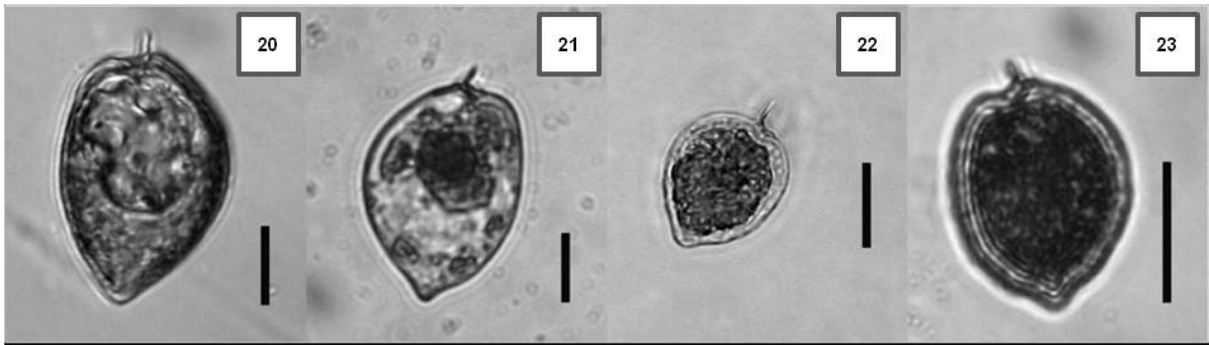
#### Caracterización de morfotipos



Figuras 12-13. Morfotipo de *Prorocentrum micans*. Fotografías de MEB. Fig. 12. Valva izquierda. Fig. 13. Valva derecha. lp= poros grandes, sp= poros pequeños, ff=surcos, op= poros abiertos, d= depresiones o poros cerrados. Escala = 10  $\mu$ m.



Figuras 14-19. Células silvestres de *Prorocentrum micans*. Fotografías de microscopio de luz. Figura 14. FPM1195. Figura 15. FPM1188. Figura 16. FPM548. Figura 17. FPM1401, lp= poros grandes, ff=surcos. Figura 18. FPM1048. Figura 19. FPM1197. Escala = 10  $\mu$ m



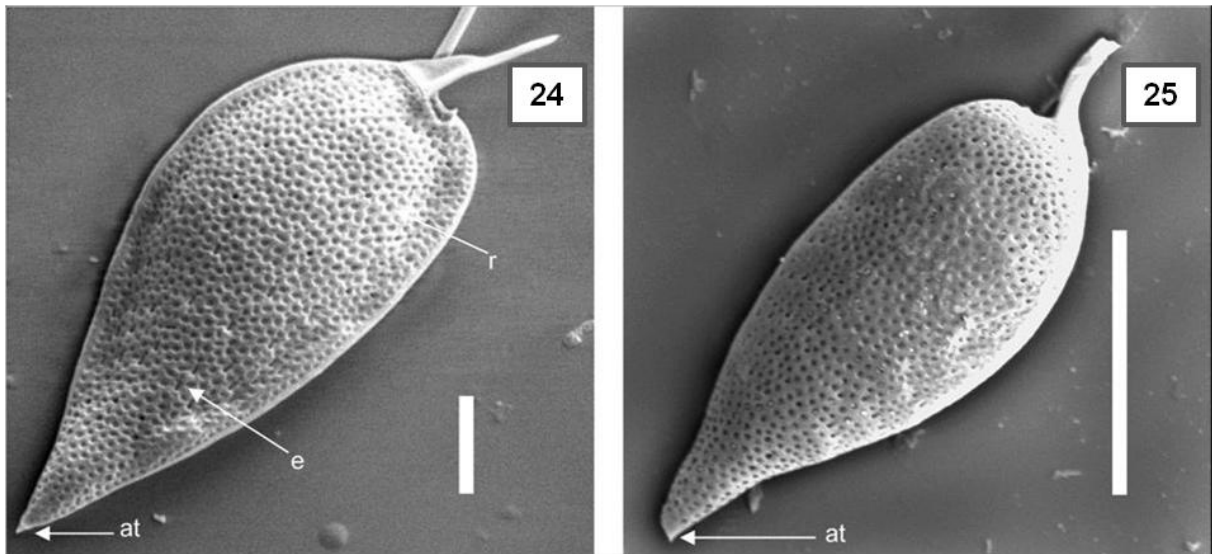
Figuras 20-23. Fotografías de microscopio de luz. Escala = 10 $\mu$ m. Células cultivadas de *Prorocentrum micans*. Figura 20. CCMP 689. Figura 21. CCMP694. Figura 22. PMCV-1. Figura 23. PM1V.

El morfotipo *Prorocentrum micans* incluye células con los márgenes de las valvas simétricos y convexos. La superficie de las valvas posee depresiones, poros redondos formando filas desde el borde de las valvas y corriendo hacia el centro (Figuras.12-23). El patrón de poros (Tabla 11) consiste en poros grandes localizados sobre todo en las regiones apical y antapical; poros pequeños y depresiones que cubren el resto del cuerpo. Comúnmente, el tamaño de los poros disminuye hacia los bordes y también en la posición antapical. Algunos poros son alargados (dos veces más largos que anchos). Cuando éstos están presentes, se encuentran sobre surcos que se distribuyen en líneas que corren desde el borde del margen de la valva hacia el centro y se localizan aproximadamente a lo largo de las dos terceras partes de la longitud del ápice. La valva izquierda tiene una densidad de 0.1 poros grandes por  $\mu\text{m}^2$ , con un diámetro que varía de 0.9 a 4  $\mu\text{m}$ . Los poros pequeños de la valva izquierda tienen una densidad de 1.3 poros por  $\mu\text{m}^2$  y un diámetro de entre 1.3 y 1.8  $\mu\text{m}$ . Aunque los diámetros de los poros grandes y pequeños se superponen, la diferencia entre ellos, dentro de la misma célula, es clara, porque los poros grandes

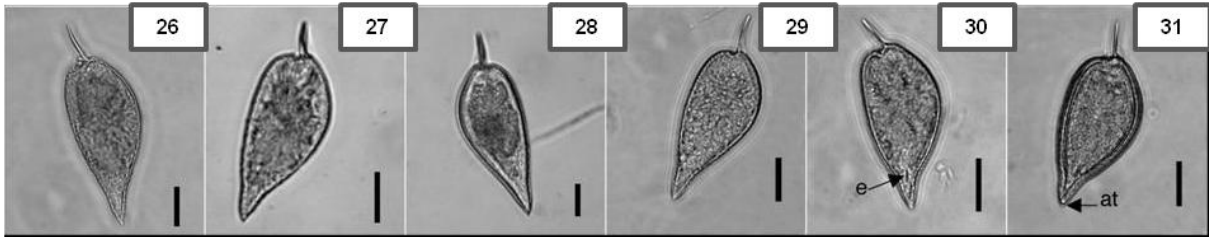
son dos veces más grandes que los pequeños. En la valva derecha, los poros grandes tienen una densidad de 0.1 poros por  $\mu\text{m}^2$  y un diámetro entre 2.7 y 4  $\mu\text{m}$ . Los poros pequeños de esta valva se presentan con una densidad de 1.2 poros por  $\mu\text{m}^2$  y tienen un diámetro de entre 1.6 y 1.8  $\mu\text{m}$ . El patrón de poros se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Patrón de poros de *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides*. Promedios en 3 cuadrantes de 50  $\mu\text{m}^2$  localizados al azar en la parte apical, media y antapical de la superficie de la célula en las valvas izquierda y derecha.

		<i>Prorocentrum micans</i>				<i>Prorocentrum gracile</i>		<i>Prorocentrum sigmoides</i>	
Valva		Izq.		Derecha		Izq.	derecha	Izq.	derecha
apical	Poros promedio	grande 5.7	chico 68	grande 4.3	chico 69	No hay diferencia de tamaño en los poros			
	$\Sigma$	0.9	9.4	1.2	7.5	8.3	5.7	5.2	2.1
	intervalo	5-7	57-80	3-6	59-77	35-55	34-48	24-36	33-38
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
promedio		0.7	41	0	34.7	36.3	25	28.3	30.7
media	$\Sigma$	0.9	10.4	0	6.2	11.1	9.2	3.4	4.2
	intervalo	0-2	33-56	0	26-40	22-49	12-32	25-33	25-35
	N	3	3	3	3	3	3	3	3
promedio		6	85	7.7	79.3	44.3	41.3	37.3	29
antapical	$\Sigma$	1.4	31.1	3.1	18.5	7.4	1.2	2.1	6.7
	intervalo	4-7	62-129	5-12	62-105	35-45	40-43	35-40	22-38
	N	3	3	3	3	3	3	3	3



Figuras 24-25. Fotografías de MEB. Escala = 10  $\mu\text{m}$ . Morfotipo de *Prorocentrum gracile*. Figura 24 valva izquierda. Figura 25 valva derecha. r= poros redondos, e= poros alargados, at= diente antapical (mucrón).



Figuras 26-31. Células silvestres de *Prorocentrum gracile*. Fotografías de microscopio de luz. Escala = 10 $\mu$ m. Figura 26. FPM1195. Figura 27. FPM1188. Figura 28. FPM548. Figura 29. FPM1048. Figura 30. FPM1197, e= poros alargados que parecen espinas. Figura 31. FPM1199, at= diente antapical (mucrón).

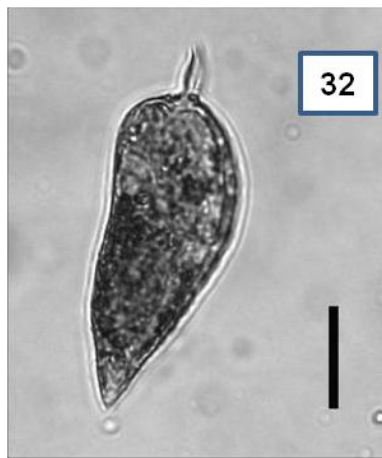
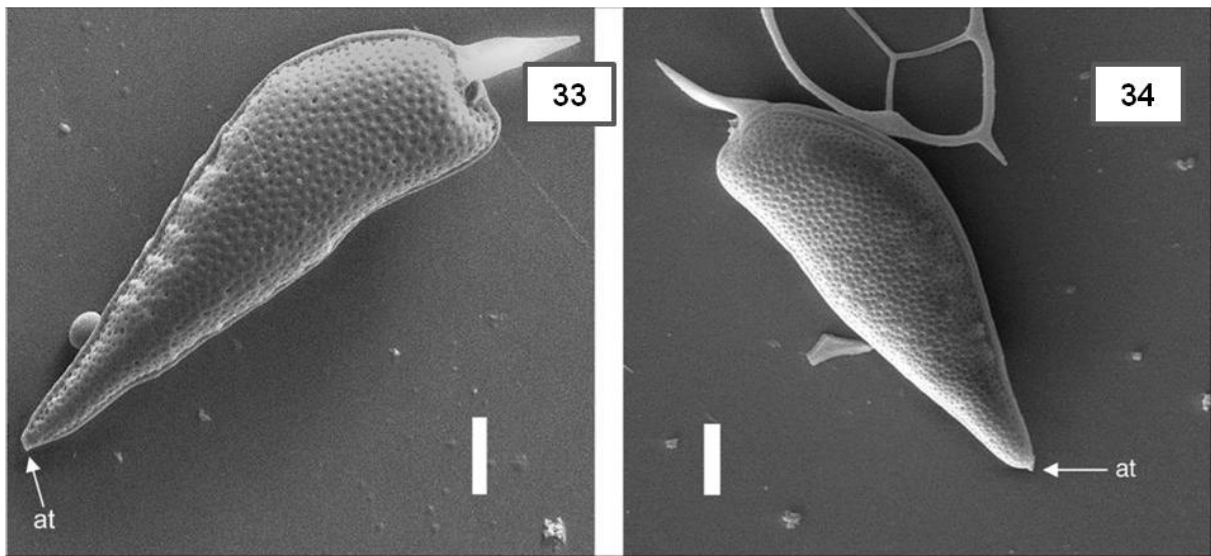


Figura 32. Célula cultivada de *Prorocentrum gracile*. Fotografía de microscopio de luz. Escala = 10 $\mu$ m. PGCV-1.

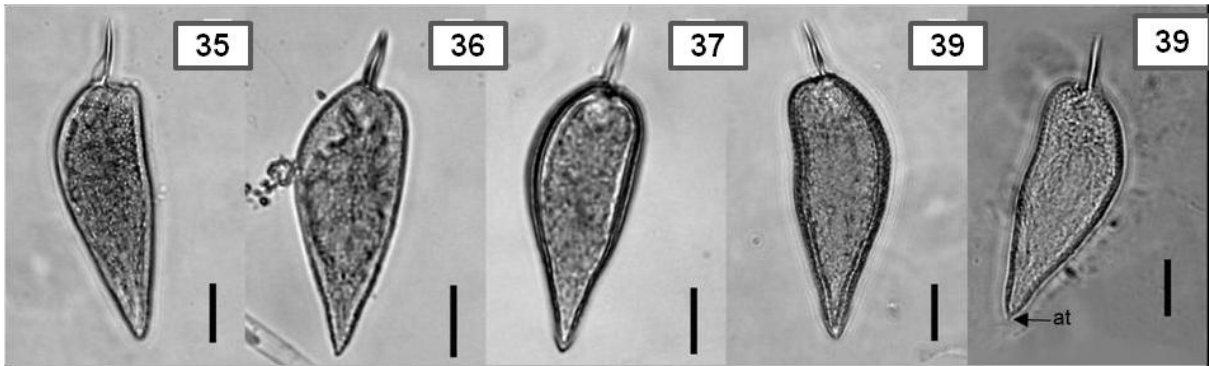
El morfotipo *Prorocentrum gracile* tiene células con los márgenes de las valvas asimétricos, uno recto y el otro convexo, con un mucrón en la región antapical (Figuras. 24-32). Las valvas presentan depresiones y poros circulares de tamaño semejante. Numerosos poros alargados (dos veces más largos que anchos) se encuentran desde la mitad hasta la parte inferior de la célula, distribuidos sin un

patrón aparente sobre toda la superficie de la valva y pueden dar la impresión de ser espinas, cuando son observados a través de un microscopio de luz. La valva izquierda tiene una densidad de 0.8 poros por  $\mu\text{m}^2$  con un diámetro que varía de los 0.35 a los 0.84  $\mu\text{m}$  de diámetro. La valva derecha tiene una densidad de 0.7 poros por  $\mu\text{m}^2$  con un diámetro entre 0.35 y 0.84  $\mu\text{m}$ . El patrón de poros se presenta en la Tabla 11.



Figuras 33-34. Morfotipo de *Prorocentrum sigmoides*. Fotografías de MEB. Escala = 10  $\mu\text{m}$ . Figura 33 valva izquierda. Figura 34 valva derecha. at= diente antapical (mucron).





Figuras 35-39. Células silvestres de *Prorocentrum sigmoides*. Fotografías de microscopio de luz. Escala = 10 $\mu$ m. Figura 35. FPM1195. Figura 36. FPM1188. Figura 37. FPM548. Figura 38. FPM1197. Figura 39. FPM672, at= diente antapical (mucrón).

El morfotipo *Prorocentrum sigmoides* presenta células con los bordes de las valvas asimétricos, un borde es convexo y el otro sigmoide, es decir con una depresión o concavidad, así como una espina apical ligeramente sigmoide o recta y en la región antapical de la célula se puede observar un pequeño diente o mucrón (Figuras 33-39). Las valvas tienen poros y depresiones circulares de tamaño semejante. Pocas células presentaron poros alargados (dos veces más largos que anchos) en la superficie de las valvas, distribuidos en dos terceras partes de la longitud del cuerpo de la célula desde el ápice. La presencia de espinas en la superficie de las valvas de *P. sigmoides* reportada por Osorio-Tafall (1942) no fue observada en las fotos de MEB, aunque es posible que lo que él vio fueran los poros más alargados. Ambas valvas tienen una densidad de poros de 0.6 poros por  $\mu\text{m}^2$  con un diámetro de 0.35 a 0.84  $\mu\text{m}$ . El patrón de poros se presenta en la tabla 11. Este fue el único morfotipo que no se logró cultivar y tampoco se encontró disponible en los bancos de cepas.

Diferencias morfométricas entre los morfotipos.

En la comparación entre las características morfométricas de los tres morfotipos revela que los caracteres largo total y largo de la espina, mostraron diferencias significativas entre el promedio de los morfotipos, aunque los rangos de tamaño se sobreponen (Tabla 12). Sólo *Prorocentrum micans* presenta diferencias significativas con los otros morfotipos en los promedios de cuatro de los seis caracteres que aparecen en la tabla (excepto el ancho máximo y la relación entre la longitud de la espina y el largo de la célula).

Tabla 12. Comparación de los caracteres morfométricos de los morfotipos de *Prorocentrum* (*lt*, *a*, *le* en  $\mu\text{m}$ ). Se incluyen todas las células.

Morfotipos		<i>P. micans</i> (n=244)	<i>P. gracile</i> (n=206)	<i>P. sigmoides</i> (n=34)
<i>lt</i>	promedio	46.8*	66.9*	82.7*
	$\sigma$	10.85	11.9	11.47
	intervalo	19.6-86.5	33.8-119.9	61.3-105.8
<i>am</i>	promedio	25.9	25.7	24.9
	$\sigma$	5.7	4.71	3.8
	intervalo	8.6-36.4	13.5-36	15.9-30.8
<i>le</i>	promedio	6.2*	11.4*	15.8*
	$\sigma$	2.5	2.98	2.97
	intervalo	1.8-18.8	4.9-23.5	10-23.3
<i>l:a</i>	promedio	1.6*	2.2	2.7*
	$\sigma$	0.32	0.5	0.54
	intervalo	1-2.5	1.1-4.2	1.6-4
<i>la:l</i>	promedio	0.4*	0.4	0.3
	$\sigma$	0.1	0.09	0.08
	intervalo	0.19-0.78	0.14-0.71	0.21-0.68
<i>le:l</i>	promedio	0.2	0.2	0.2
	$\sigma$	0.05	0.04	0.04
	intervalo	0.04-0.42	0.08-0.36	0.15-0.32

\*promedios significativamente diferentes Bonferroni t, K-Wallis  $z > 2.64$

Las células cultivadas presentaron formas ligeramente distintas a las silvestres. Al comparar los mismos caracteres entre células silvestres, se encontró que las diferencias significativas entre los morfotipos se incrementaron, al incluir una diferencia significativa en la relación entre el largo y el ancho de la célula promedio

de cada morfotipo (Tabla 13). En la misma tabla se observa que el conjunto de las células de *Prorocentrum gracile* silvestres está formado por individuos cuyo promedio es significativamente más delgado comparado con el de los otros dos morfotipos.

Tabla 13. Comparación de los caracteres morfométricos de los morfotipos de *Prorocentrum* incluyendo solamente a las células silvestres (*lt*, *a*, *le* en  $\mu\text{m}$ ).

Morfotipos	<i>P. micans</i> (n=128)	<i>P. gracile</i> (n=166)	<i>P. sigmoides</i> (n=34)
<i>lt</i>			
promedio	52.2*	68.3*	82.7*
$\sigma$	8.52	12.75	11.47
intervalo	33.6-86.5	33.8-119.9	61.3-105.8
<i>am</i>			
promedio	25.2	11.84*	15.8
$\sigma$	3.64	3.08	2.97
intervalo	16-35.3	14.8-36	15.9-30.8
<i>le</i>			
promedio	8*	27.2*	24.9*
$\sigma$	2.03	3.70	3.84
intervalo	3.7-18.8	4.9-23.5	10-23.3
<i>l:a</i>			
promedio	1.8*	2.1*	2.7*
$\sigma$	0.3	0.43	0.54
intervalo	1-2.5	1.1-4.2	1.6-4
<i>la:l</i>			
promedio	0.4*	0.4	0.3
$\sigma$	0.12	0.09	0.08
intervalo	0.19-0.78	0.14-0.71	0.21-0.68
<i>le:l</i>			
promedio	0.2	0.2	0.2
$\sigma$	0.05	0.04	0.04
intervalo	0.09-0.42	0.08-0.36	0.15-0.32

\*promedios significativamente diferentes Bonferroni t, K-Wallis  $z > 2.39$

## Análisis discriminante

Al morfotipo *Prorocentrum micans* se le asignó el porcentaje de clasificación correcta más elevado en el Análisis Discriminante tanto en el análisis de los caracteres medidos de manera directa (*lt, a, le*), como en el análisis de los caracteres indirectos (*l: a, la:l y le:l*), utilizando el conjunto de datos y al considerar sólo las células silvestres (Figuras 40, 41, 42 y 43).

El porcentaje de células correctamente discriminadas como *Prorocentrum sigmoides* mejoró al excluir del análisis a las células cultivadas. Se obtuvieron probabilidades significativamente muy altas asociadas a las calificaciones del conjunto del análisis de la Lambda de Wilk's, (Tablas 14 y 15). *P. sigmoides* se confunde con *P.gracile*.

Tabla 14. Análisis discriminante de todas las células.

Caracteres considerados: lt, a y le		
Morfotipo	% clasificado correctamente	Probabilidad
<i>Prorocentrum micans</i>	88.5	0.504
<i>Prorocentrum gracile</i>	81.6	0.426
<i>Prorocentrum sigmoides</i>	50	0.070
Caracteres considerados: l:a, la:l y le:l		
Morfotipo	% clasificado correctamente	Probabilidad
<i>Prorocentrum micans</i>	87.29	0.504
<i>Prorocentrum gracile</i>	82.04	0.426
<i>Prorocentrum sigmoides</i>	29.41	0.070

Tabla15. Análisis discriminante incluyendo únicamente células silvestres.

Caracteres considerados: lt, a y le		
Morfotipo	% clasificado correctamente	Probabilidad
<i>Prorocentrum micans</i>	81.25	0.3902
<i>Prorocentrum gracile</i>	76.50	0.5061
<i>Prorocentrum sigmoides</i>	52.94	0.1037
Caracteres considerados: l:a, la:l y le:l		
Morfotipo	% clasificado correctamente	Probabilidad
<i>Prorocentrum micans</i>	75	0.3902
<i>Prorocentrum gracile</i>	78.92	0.5061

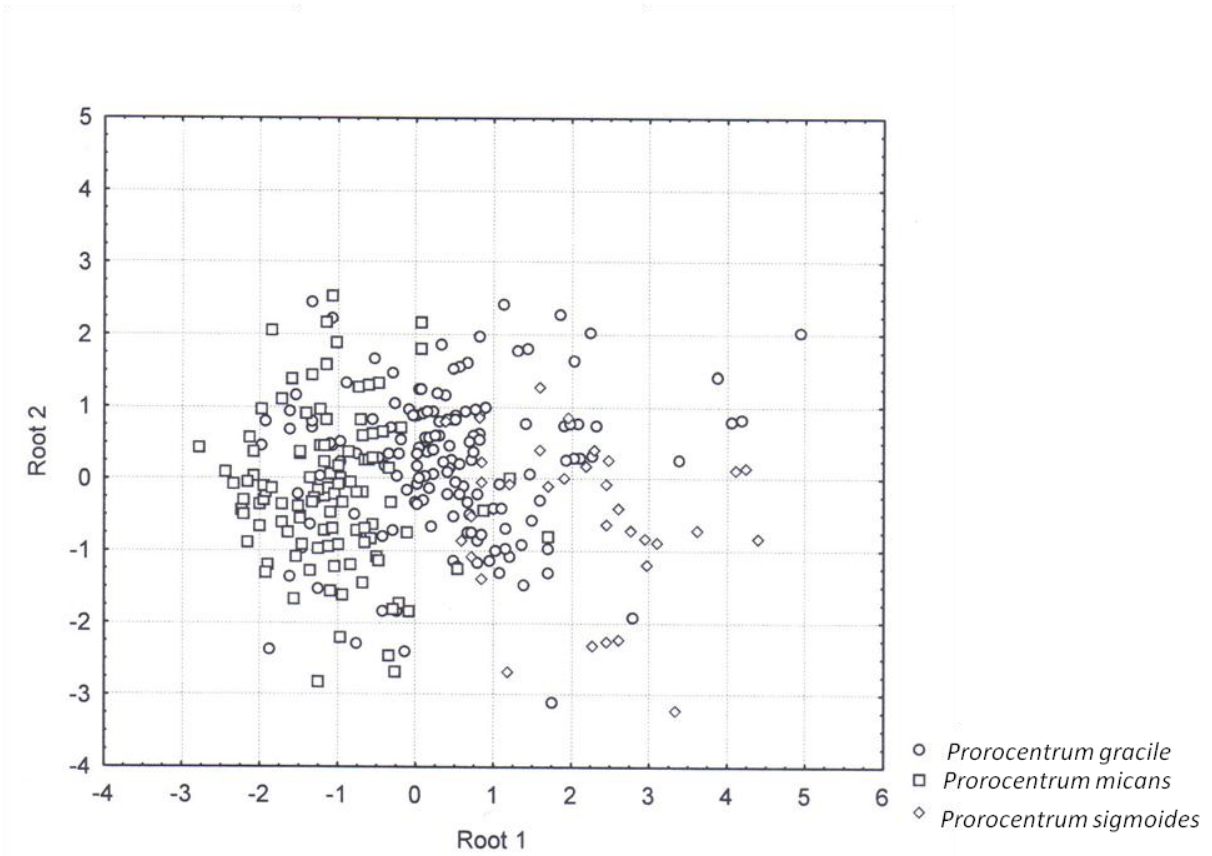


Figura 40. Análisis Discriminante de las poblaciones silvestres. Medidas consideradas: It, a y le.

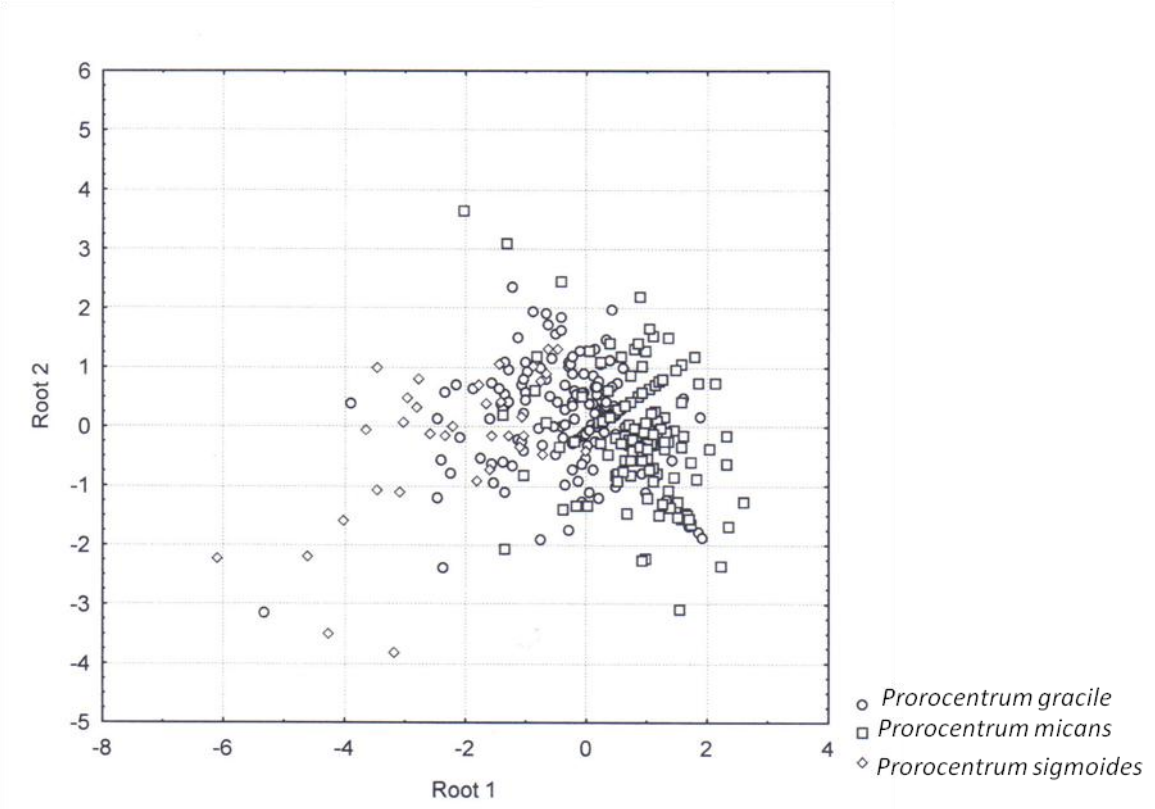


Figura 41. Análisis Discriminante. Poblaciones silvestres. Caracteres indirectos: *l:a*, *la:l* y *le:l*.

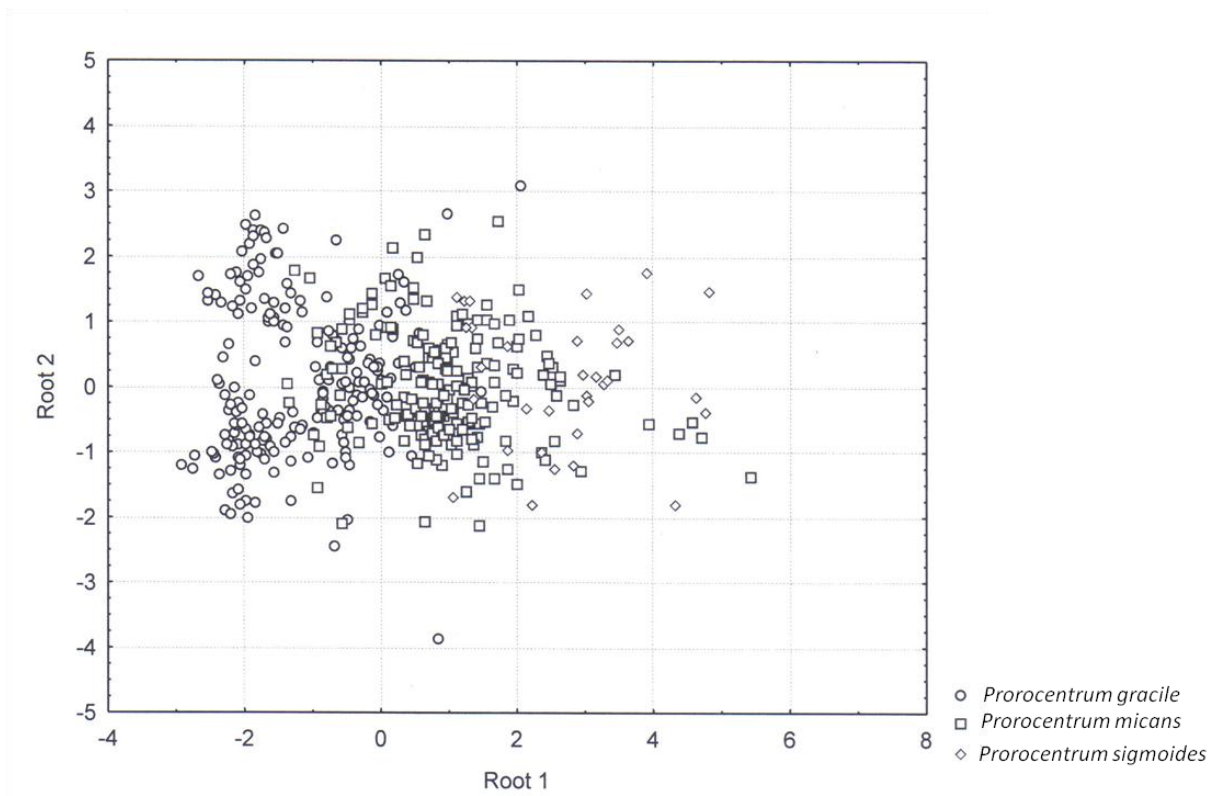


Figura 42. Análisis Discriminante. Poblaciones silvestres y cultivadas. Medidas consideradas: *a*, *lt* y *le*.

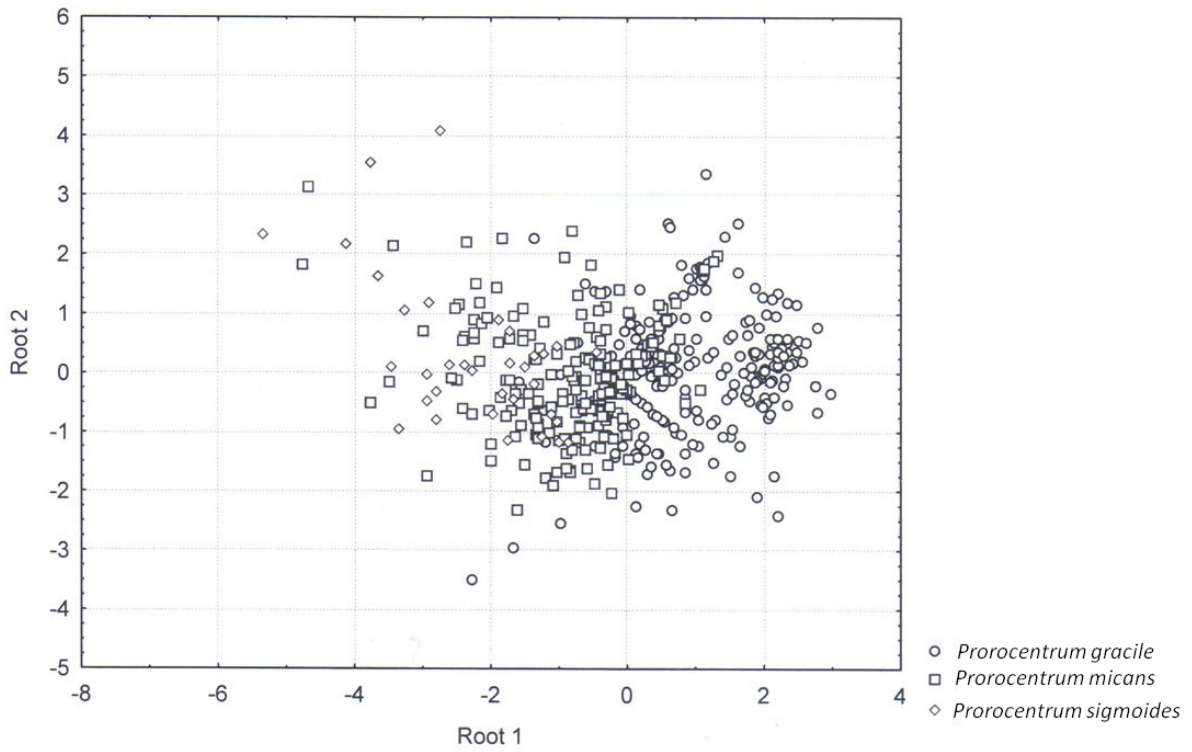


Figura 43. Análisis Discriminante. Poblaciones silvestres y cultivadas. Caracteres indirectos: *l:a*, *la:l* y *le:l*.



## Análisis de agrupamientos

El análisis de agrupamiento (Figura 44) mostró que los morfotipos más cercanos entre sí fueron *Prorocentrum gracile* y *P. sigmoides*. Al nivel de población, considerando cada muestra como una población independiente, el análisis agrupó por un lado a los morfotipos *P. gracile* y *P. sigmoides* y por otro el otro a *P. micans*.

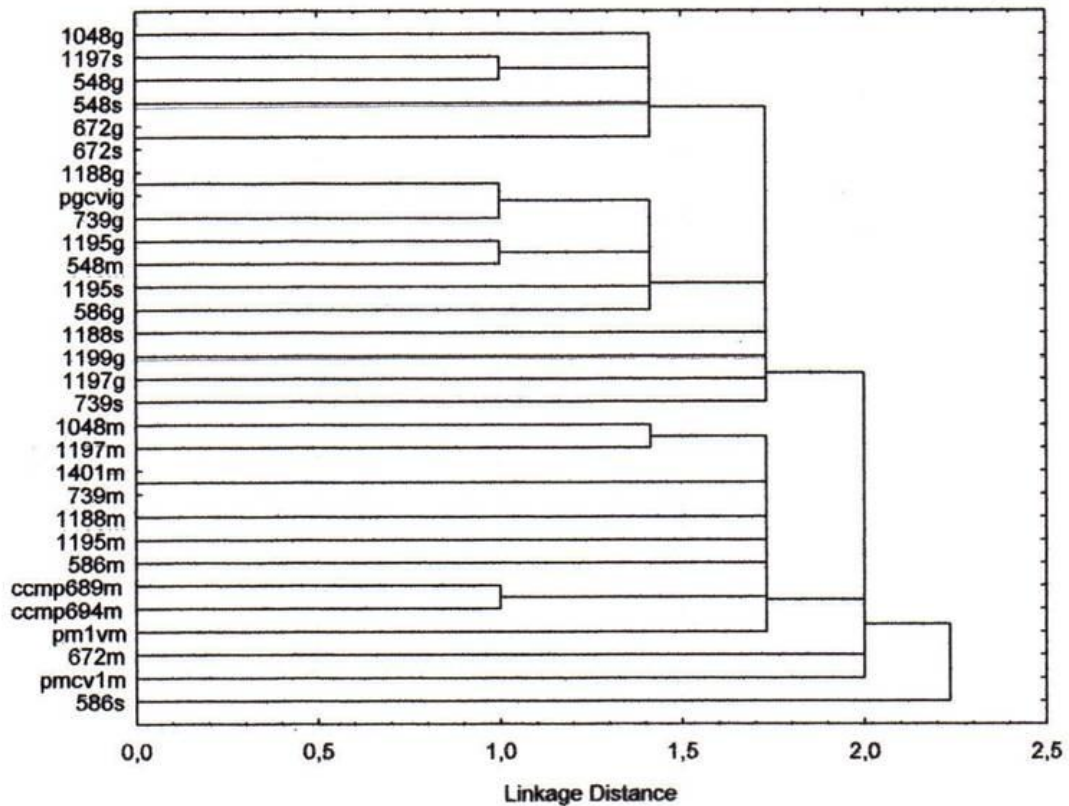


Figura 44. Análisis de agrupamiento de las muestras utilizando el promedio de las medidas de los caracteres *lt*, *a*, *le*, *l:a*, *la:l* y *le:l*. Las letras al final del nombre de las muestras o de los cultivos representa a los morfotipos: (m) *P. micans*, (g) *P. gracile*, (s) *P. sigmoides*.

## FILOGENIA MOLECULAR DE *Prorocentrum* (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO

### La calificación de los árboles

En el análisis de parsimonia, al evaluar la divergencia entre las subunidades tal y como se observa en la Tabla 16, el fragmento LSUrRNA resultó ser el de mayor número de caracteres parsimoniosamente informativos, aunque su índice de consistencia (CI) fue el más bajo. En contraste, en el análisis bayesiano el fragmento SSUrRNA fue el que proporcionó mayor información, con una media armónica menor (Tabla 17).

El análisis de la adición de los fragmentos de ambas subunidades SSUrRNA + LSUrRNA tuvo la misma resolución al realizar el análisis particionado, que un análisis en donde no se indicara la procedencia distinta de la mitad de la secuencia de cada taxon en la matriz de secuencias alineadas, a pesar de que el resultado de la prueba de homogeneidad de las partes (ILD test) demostró que había diferencias significativas entre las particiones. En la prueba de parsimonia (Tabla 16) la matriz SSUrRNA + LSUrRNA obtuvo el árbol con mejor calificación (menos pasos) y el mejor índice de consistencia. En tanto que en el análisis bayesiano (Tabla 17) obtuvo la mayor credibilidad con el menor número de árboles analizados.

Tabla 16. Resultados del análisis Parsimonia.

Análisis	Número de caracteres informativos	Calificación del mejor árbol	Índice de Consistencia	<i>ILD test</i>
LSU	300	1158	0.737	
SSU	147	1128	0.884	
SSU+LSU	262	834	0.932	P=0.001

Tabla 17. Resultados del análisis Bayesiano.

Análisis	# generaciones	d. e. promedio de probabilidades	Media harmónica total	95% credibilidad
LSU	2,000,000	0.008	-4473.12	36,757/38,732
SSU	2,500,000	0.008	-3184.45	20,506/22,981
SSU+LSU	1,000,000	0.003	-4294.89	142/536

Las propuestas de relación filogenética producidas por el método de análisis Bayesiano fueron menos esclarecedoras que las resultantes del análisis de Parsimonia, por lo que no se les utilizó para discutir las relaciones filogenéticas entre las especies de *Prorocentrum* (los árboles bayesianos pueden verse en el Anexo al final de la tesis).

La relación entre las especies.

El árbol LSUrRNA (Figuras 45), está formado por conjuntos de tricotomías. El primero incluye a *Prorocentrum gracile*, *P. micans* y *P. mexicanum* el segundo incluye la primera tricotomia, la compuesta por *P. mimum*, *P. balticum* y *P. dentatum* y a *P. tristinum*; la tercera tricotomía está formada por la segunda tricotomía, por la tricotomía formada por *P. lima* y *P. belizeanum* y por *P. emarginatum*. *P. concavum* es la especie más cercana al grupo externo.

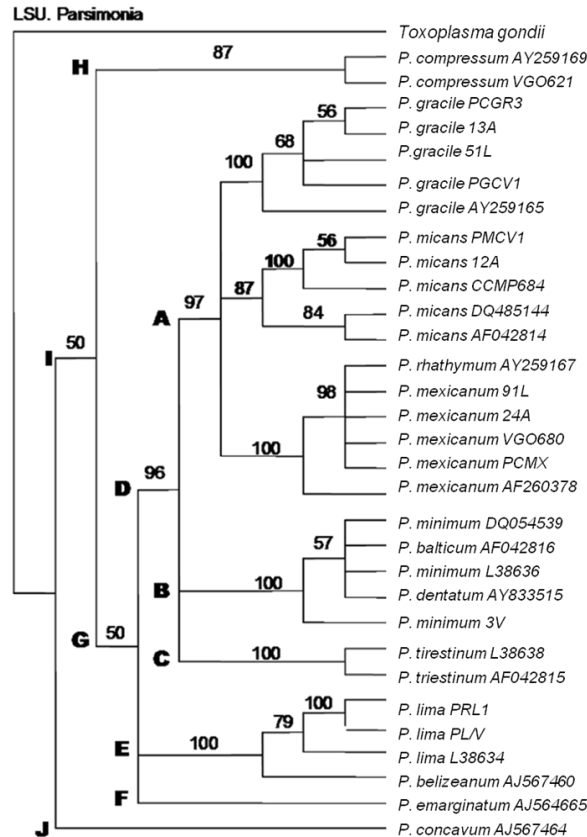


Figura 4545. Análisis de Parsimonia, LSUrRNA, Full Heuristic, TBR, 100,000 réplicas.

El árbol SSUrRNA (Figura 46) está formado por una primera politomía que incluye a *Prorocentrum gracile* y *P. mexicanum*, al interior de la cual las dos secuencias de *P. gracile* forman una dicotomía. *P. micans* es la especie más cercana a las anteriores y en conjunto forman una dicotomía con *P. compressum*. Se mantiene la estrecha relación entre *P. balticum*, *P. minimum* y *P. dentatum* y al igual que en el árbol de LSUrRNA, forman una tricotomía que incluye a *P. tristinum*. Se presenta una dicotomía formada por *P. lima* y *P. emarginatum*.

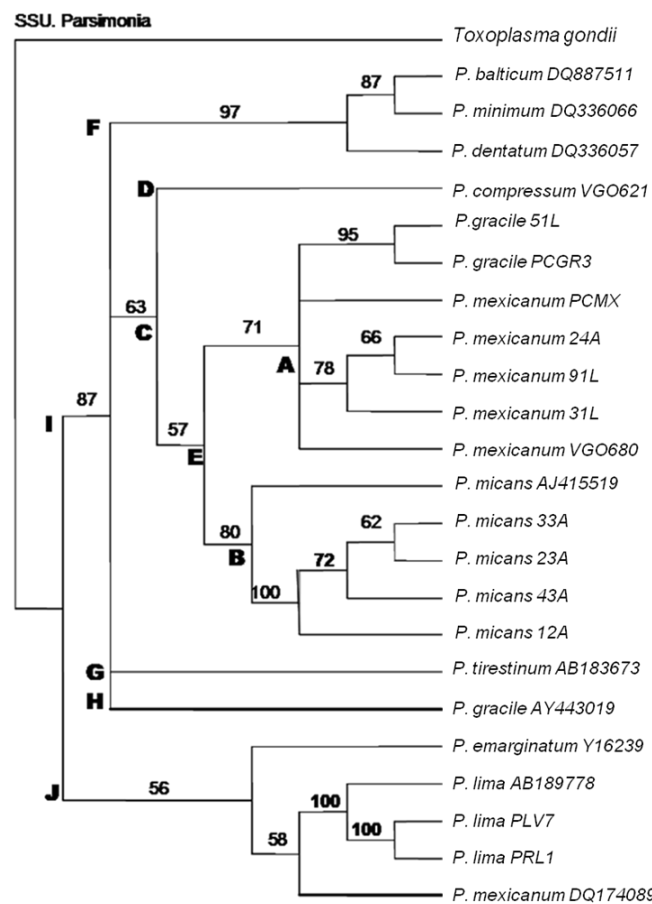


Figura 46 Análisis de Parsimonia, SSUrRNA, *Branch and Bound*, 100 replicas. Se obtuvo el mismo resultado de tres repeticiones consecutivas, cada una con 100 réplicas.

El árbol LSUrRNA+SSUrRNA (Figura 47) mantiene el mismo patrón de relación entre las especies, con una tricotomía que une a *P. gracile*, *P. mexicanum* y *P. micans*, la especie hermana a este grupo fue *P. compressum* y *P. lima* fue la especie más cercana al grupo externo.

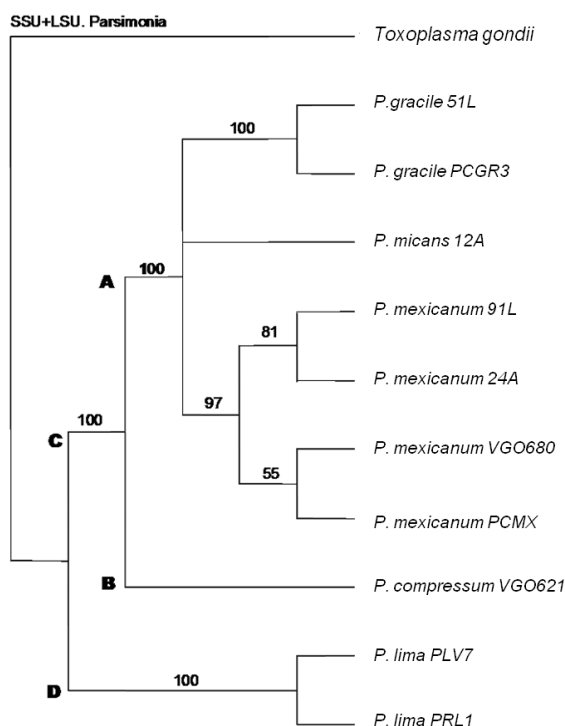


Figura 47. Análisis de Parsimonia, SSUrRNA+LSUrRNA. Búsqueda Exhaustiva.

La posición de *P. compressum* fue la misma en los árboles SSRrDNA y LSUrRNA+SSUrRNA.

Se consideraron como secuencias mal identificadas las que corresponden a *Prorocentrum rhathymum* (AY259167), a *P. gracile* (AY443019) y *P. mexicanum* (DQ174089). Estas secuencias fueron obtenidas del banco de genes y no son resultado de organismos colectados, cultivados y secuenciados durante esta investigación.

Con objeto de establecer la relación entre las *Prorocentrum* consideradas en el análisis de filogenia molecular, se presenta en la Tabla 18 un resumen de las características morfológicas, taxonómicas y ecológicas de las especies consideradas; y en las figuras 48, 49 y 50, un resumen ilustrado de los árboles LSUrRNA, SSUr DNA y LSUrRNA+SSUrRNA.

Tabla 18. Características generales de las especies de *Prorocentrum* de este trabajo de acuerdo a (Faust, *et al.*, 1999, Hernández-Becerril, *et al.*, 2000, Faust y Gulledge 2002).

Especie	Hábito	Morfología similar a	Ex <i>Exuviaella</i>	Toxicidad
<i>P. balticum</i>	Planctónico	<i>P. minimum</i>	Si	Ninguna
<i>P. belizeanum</i>	Epibentónico	<i>P. compressum</i>	No	DSP (diarrea por envenenamiento con mariscos), Ácido ocaidaico, DTX-1
<i>P. compressum</i>	Planctónico	<i>P. belizeanum</i>	No	Ninguna
<i>P. concavum</i>	Epibentónico	<i>P. lima</i>	Si	FAT (toxina de acción rápida), DSP
<i>P. dentatum</i>	Planctónico		No	Ácido ocaidaico
<i>P. emarginatum</i>	Epibentónico	<i>P. rhathymum</i>	No	Ninguna
<i>P. gracile</i>	Planctónico	<i>P. mexicanum</i>	No	Ninguna
<i>P. lima</i>	Epibentónico	<i>P. sigmoides</i>	No	FAT, Prorocentrolide, Ácido ocaidaico, DSP, DTX-1, DTX-2, DTX-4
<i>P. mexicanum</i>	Planctónico	<i>P. concavum</i>	Si	DSP, DTX-1, DTX-2, DTX-4
<i>P. micans</i>	Planctónico	<i>P. emarginatum</i>	No	Ninguna
<i>P. minimum</i>	Planctónico	<i>P. rhathymum</i>	No	Ninguna
<i>P. rhathymum</i>	Epibentónico	<i>P. gracile</i>	No	Ninguna
<i>P. triestinum</i>	Planctónico	<i>P. balticum</i>	Si	Venerupina (hepatotoxina)
		<i>P. emarginatum</i>	No	FAT <sup>3</sup>
		<i>P. mexicanum</i>	No	Ninguna
		<i>P. micans</i>	No	Ninguna

<sup>3</sup> La Comisión Oceanográfica Intergubernamental (IOC) de la organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) indica que en todos los casos la toxicidad ha sido debida a *P. rhathymum* y no a *P. mexicanum*.

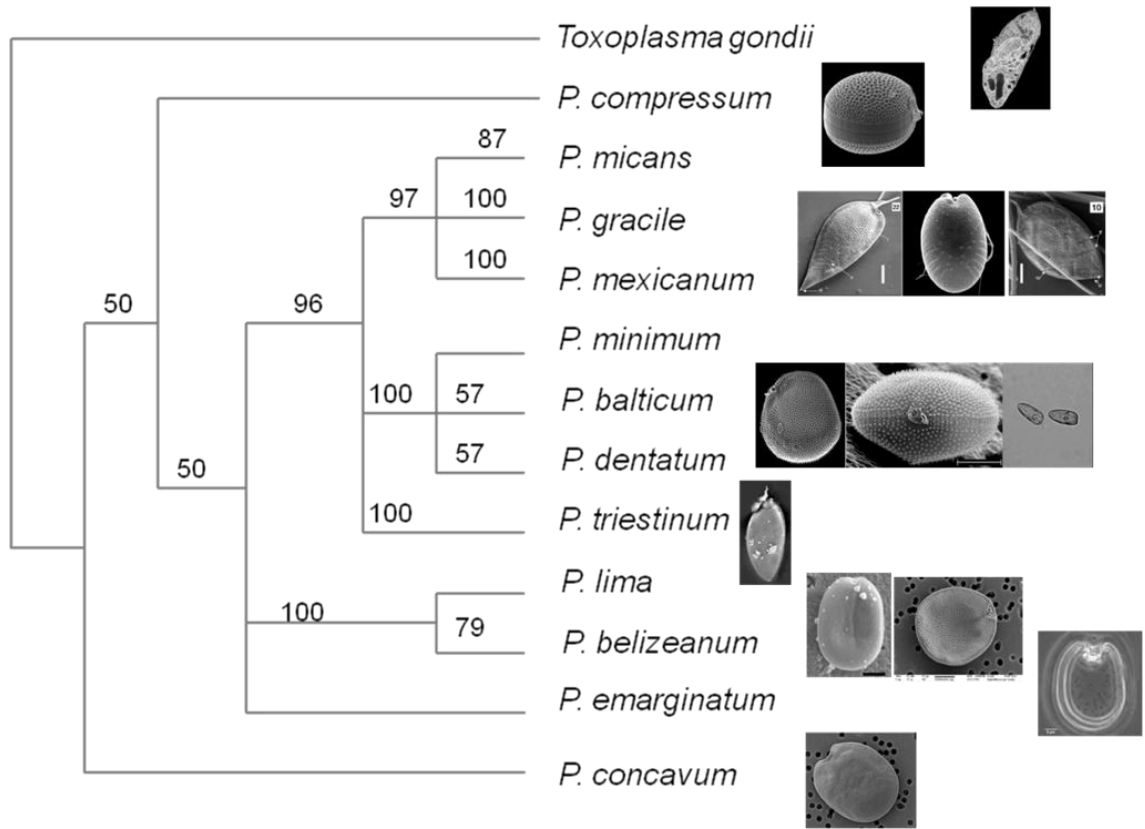


Figura 48. Resumen ilustrado LSUrRNA, Full Heuristic, TBR, 100,000 réplicas.



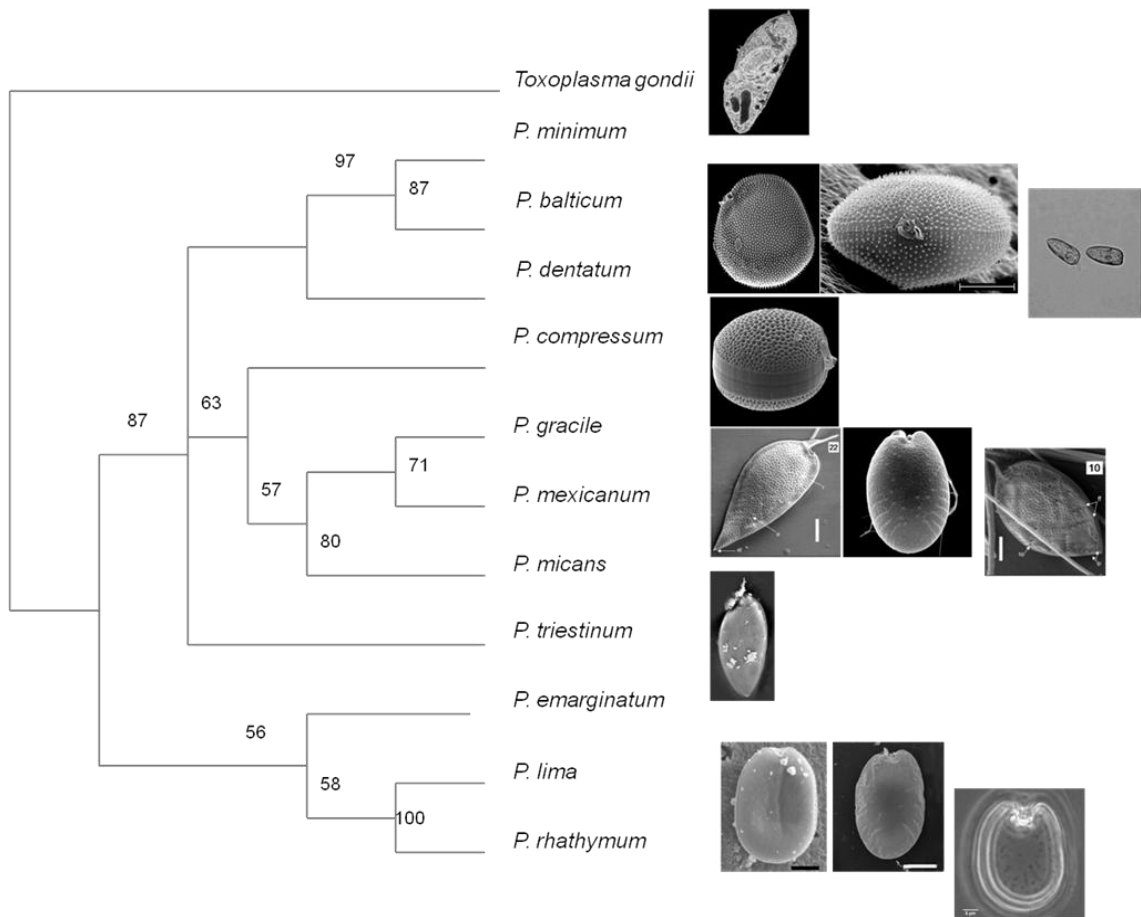


Figura 49. Resumen ilustrado, SSUrRNA, *Branch and Bound*, 100 réplicas. Se obtuvo el mismo resultado de tres repeticiones consecutivas, cada una con 100 réplicas.

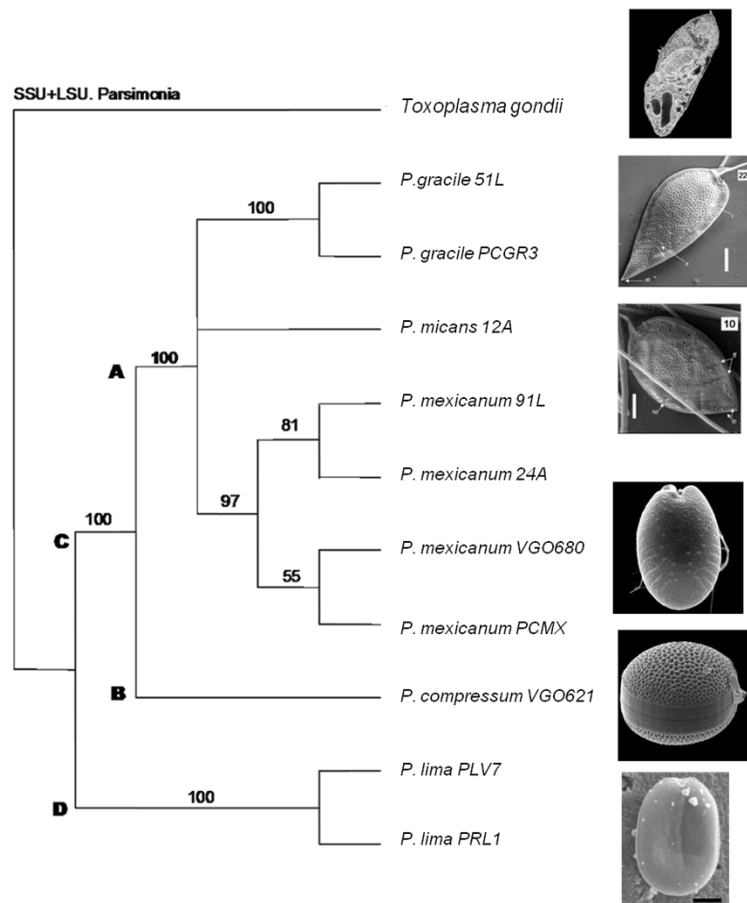


Figura 50. Resumen ilustrado, SSUrRNA+LSUrRNA. Búsqueda Exhaustiva

## La relación entre *P. gracile* y *P. micans*

Los resultados muestran que todas las secuencias identificadas como pertenecientes a *Prorocentrum gracile*, corresponden a una misma especie aunque las formas de las células tuvieran características que correspondían al morfotipo *P. sigmoides* (Figuras 51, 52 y 53).

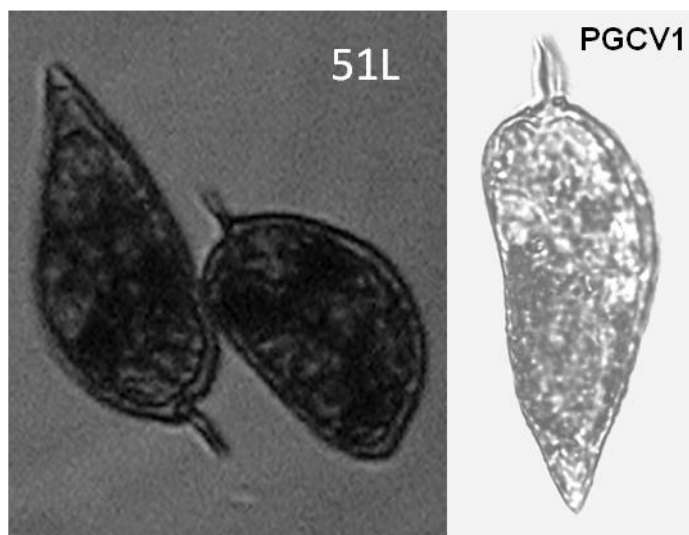


Figura 51. Ejemplos de *Prorocentrum gracile* provenientes de los cultivos 51L y PGCV1, cuyas células presentaron características de los morfotipos *P. gracile* y *P. sigmoides* y cuyas secuencias se agrupan en una politomía.

Un resultado inesperado fue la tricotomía que ambas especies formaron con *Prorocentrum mexicanum*, como se muestra en los segmentos de los árboles LSUrRNA y SSUrRNA de las figuras 52 y 53, donde se presentan las fotografías de células provenientes de algunos de los cultivos secuenciados.

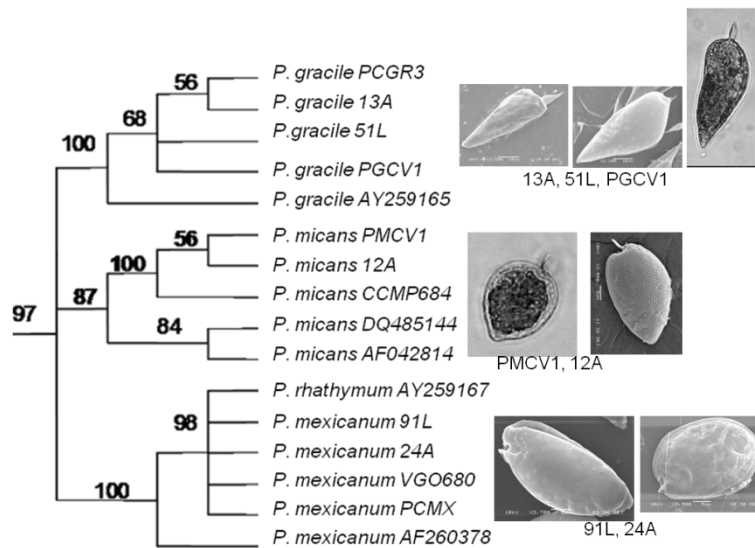


Figura 52. Resumen ilustrado de la relación entre *Prorocentrum gracile* y *P. micans*. LSUrRNA

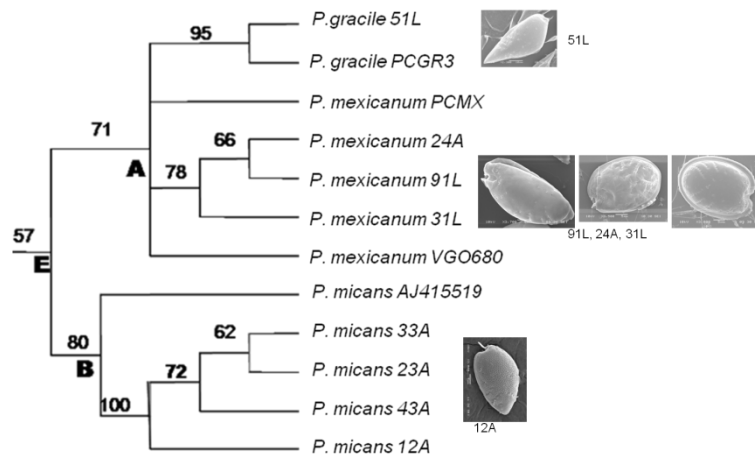


Figura 53. Resumen ilustrado de la relación entre *Prorocentrum gracile* y *P. micans*. SSUrRNA

## DISCUSIÓN

### MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL COMPLEJO *Prorocentrum micans*, *P. gracile* y *P. sigmoides*

En las Tablas 2 y 3 se pone en evidencia que los caracteres diagnósticos de las especies no han sido registrados o publicados de manera consistente por todos los autores, ya sea porque no todos los caracteres han sido observados en todos los representantes o porque los autores difieren en su opinión sobre qué caracteres son diagnósticos al nivel de especie dentro del orden Prorocentrales.

Algunas células mostraron caracteres asignados a ambos morfotipos (*Prorocentrum gracile* y *P. sigmoides*), como espinas apicales ligeramente sigmoides con márgenes de valva rectos, o bien un margen de valva sigmoide y una espina larga y recta. Algunas células de *P. gracile* provenientes de los cultivos PGCV-1 y 51L presentaron valvas con el margen ligeramente sigmoide.

El patrón de poros de *Prorocentrum micans*, con la presencia de poros grandes y pequeño, resulta ser un carácter diagnóstico adecuado para distinguir a *P. micans* de otros morfotipos del complejo. También el análisis del patrón de poros permitió distinguir solamente al morfotipo *P. micans*.

El mismo resultado se obtuvo con el análisis estadístico de los caracteres morfométricos. Solo *Prorocentrum micans* se distingue y no se encontró una manera clara de separar a los morfotipos *P. gracile* y *P. sigmoides*. En los análisis morfológicos y morfométricos no se encontró un solo carácter que fuera exclusivo de *P. sigmoides*.

En el análisis filogenético tampoco se encontró una sola secuencia que pudiera corresponder a *Prorocentrum sigmoides*. El hecho de que todas las secuencias de cultivos en los que se registraron células cuya forma tenía características de ambos morfotipos *Prorocentrum gracile* y *P. sigmoides*, se agruparan en una misma politomía, nos lleva a considerar que el morfotipo *P. sigmoides* no posee las características de una especie.

La secuencia de *Prorocentrum gracile* AY443019, que se agrupó con la secuencia de *P. triestinum* está mal identificada y debe ser considerada un *P. triestinum*.

Nuestros resultados confirman la observación generalizada de que la morfología y morfometría de estos organismos es muy variable. Tal variabilidad puede mantenerse debido a procesos de mezcla durante la reproducción sexual (Faust 1993 a, b; Soyer-Gobillard *et al.* 2002).

En el análisis estadístico se utilizó un tamaño de muestra que resultó en valores de desviación estándar reducidos, pero amplió la sobreposición en los intervalos, lo que indica que los caracteres morfométricos considerados no son mutuamente excluyentes. Hay una falta de independencia entre los estados de carácter, a pesar de las diferencias significativas entre el promedio de las medidas de largo total (lt) y largo de la espina (le) de las células de cada morfotipo. La similitud morfológica general puede indicar la cercana afinidad genética entre los morfotipos, pero también puede enmascarar diferencias genéticas importantes.

Encontrar una gran variabilidad en los organismos ha impulsado la reflexión acerca de la naturaleza de los caracteres diagnósticos ¿Descubrimos a los caracteres o los construimos? ¿Son los promedios de las poblaciones de datos caracteres que representan atributos biológicos adecuados para el trabajo taxonómico? Estas cuestiones están implícitas cuando transformamos en categorías a conjuntos de datos que se distribuyen de manera continua en la población. El resultado del análisis estadístico muestra que considerar los promedios de poblaciones como caracteres reduce artificialmente la variación de éstos y se puede caer en el error de considerar como miembros de otra especie a individuos cuyas medidas están dentro del rango. Al utilizar los promedios como caracteres diagnósticos se está construyendo un carácter, no descubriéndolo. Los promedios no son atributos biológicos, describen poblaciones de datos, no de células y paradójicamente, tienden a caracterizar la especie de manera más cercana al pensamiento tipológico que al poblacional.

La selección de los caracteres considerados diagnósticos ha cambiado con el desarrollo de la disciplina, por ejemplo, registrar la posición de la espina apical en la valva derecha o izquierda, ya no es considerado un carácter diagnóstico desde que la valva que posee la espina apical es, por convención, la derecha (ver Fensome *et al.*, 1993, 1999).

Un carácter diagnóstico reportado en la literatura que no fue posible analizar en el presente estudio, fue el número de placas apicales, porque de la disección de la teca consistentemente se obtuvieron dos valvas y una espina apical.

Es importante resaltar el hecho de que la relación entre el largo y el ancho de la célula, considerado uno de los caracteres más importantes en el diagnóstico al nivel de especie, sólo resultara estadísticamente significativo cuando se excluyeron del análisis los datos de las células cultivadas. El cambio en la forma de las células producto de las condiciones de cultivo, también puede ocurrir en condiciones de vida silvestre debido a una gran variedad de factores nutricionales y ambientales. Por ello la relación entre el ancho y el largo de las células fue más útil al comparar células de la misma localidad, que al comprar células provenientes de muestras de localidades distintas.



## FILOGENIA MOLECULAR DE *Prorocentrum* (DINOFLAGELLATA) DEL PACÍFICO MEXICANO

### La relación entre las especies

La primera tricotomía con especies cercanas incluye a *Prorocentrum gracile*, *P. mexicanum* y *P. micans*, su morfología tiene en común la presencia de una espina apical y un patrón de ornamentación de las valvas con poros y depresiones (Tabla 18, Figuras 51, 52 y 53). Se trata de especies planctónicas y no tóxicas, cuya pertenencia al género *Prorocentrum* no ha sido puesta en duda. La secuencia de LSUrRNA de *P. rhathymum* (AY250167) está mal identificada y corresponde a *P. mexicanum*, debido a que *P. rhathymum* es una especie tóxica y epibentónica. Por la misma razón, la secuencia de SSUrRNA de *P. mexicanum* (DQ174081) corresponde a un *P. rhathymum* y no a un *P. mexicanum*.

La segunda tricotomía incluye a *Prorocentrum minimum*, *P. balticum* y *P. dentatum*. La semejanza morfológica entre *Prorocentrum minimum* y *P. balticum* es reconocida en la literatura (Faust y Gullledge, 2002) y ambas fueron consideradas *Exuviaella* aunque ya no se les considera parte de ese género (Tabla 18, [www.algabase.org](http://www.algabase.org)). La cercana asociación entre *P. dentatum* y *P. minimum* corrobora la reportada en la literatura (Lin *et al.*, 2006). *P. mínimo* y *P. balticum* tienen las valvas ornamentadas con pequeñas espinas y poros (Figuras 48 y 49). Las tres especies son planctónicas y tanto *P. dentatum* como *P. balticum* no son tóxicas, por lo que es posible que la secuencias de *P. mínimo* utilizadas en el análisis correspondan a *P. balticum*, por que la tricotomía queda siempre inserta entre especies no tóxicas.

*Prorocentrum lima*, *P. belizeanum* y *P. rhathymum* constituyen la tercera tricotomía en el árbol SSUrRNA. Las tres tienen la forma de la célula redondeada, de valvas lisas, son epibentónicas y tóxicas. En el árbol LSUrRNA hay una dicotomía que une a *P. lima* y *P. belizeanum*, y *P. rhathymum* aparece en la politomía de los *P. mexicanum*, pero considero que esto es producto de un error de identificación del cultivo del que provino la secuencia, originado por el gran parecido entre estas especies, y no representa necesariamente un error del análisis filogenético o un problema biológico a explorar (Figuras 48 y 49).

*Prorocentrum emarginatum* se colocó como parte de, o muy cerca de las dicotomías que incluyen a *P. lima* y *P. belizeanum* y a *P. lima* y *P. rhathymum*. No es una especie tóxica, pero si es epibentónica, de forma redondeada y de valvas lisas (Figuras 48 y 49).

La posición de *Prorocentrum compressum* en los árboles SSUrRNA y SSUrRNA+LSUrRNA puede indicar que se posee caracteres intermedios entre las especies planctónicas e inofensivas y las tóxicas y epibentónicas. La información resumida en la Tabla 18 y las Figuras 48 y 49, la presenta como una especie parecida a *P. belizeanum*, planctónica, no tóxica, de forma circular y cubierta profusamente de poroides.

*Prorocentrum concavum* solo se incluyó en el árbol LSUr DNA (Figura 48), donde quedó en la posición más cercana al grupo externo y por ello representa a la

especie más parecida a la ancestral. Es una especie parecida a *P. lima*, tóxica, epibentónica de forma redondeada y lisa.

Dodge (1975) no pudo dilucidar la posición de una cuarta parte de las especies, aquellas redondeadas y con espina apical que incluyen a *Prorocentrum minimum* y *P. balticum*, separándolas del resto de las especies por una línea punteada que incluía a *P. dentatum* (Figura 7). En los párrafos anteriores se planteó la posibilidad de que las tres secuencias pertenecieran a *P. minimum*, sin embargo suponiendo que son secuencias identificadas correctamente, es notorio que los árboles más parsimoniosos consistentemente los agruparon en la misma tricotomía con la mayoría de las especies planctónicas. Por otra parte, la posición de *P. compressum* entre las especies planctónicas e inofensivas y las planctónicas y tóxicas hacen pensar que las especies no tóxicas parecen ser derivadas de las tóxicas.

¿Tendrán todas las especies de *Prorocentrum* la capacidad de producir toxinas? ¿Dependerá la toxicidad de las materias primas disponibles en el medio y por ello un mayor número de especies con hábitos epibentónicos tienen acceso a una mayor concentración de compuestos precursores de toxinas depositados en el fondo o adheridos a detritos? De ser así, será importante establecer un programa de monitoreo que registre de manera sistemática la presencia de florecimientos de cualquier especie de *Prorocentrum*, su toxicidad y las condiciones ambientales bajo las que el florecimiento se produjo, incluyendo la presencia de residuos químicos provenientes de procesos industriales o agroindustriales.

## Filogenia y ecología

El Pacífico mexicano ha sido dividido en 5 regiones: (1) Costa oeste de Baja California, (2) Golfo de California, (3) Zona de transición templado-tropical, (4) Pacífico tropical, y (5) Golfo de Tehuantepec (Meave del Castillo *et al.*, 2003 b). Las poblaciones de *Prorocentrum gracile*, *P. micans*, *P. mexicanum* que se incluyen en este análisis provinieron de las regiones 2 y 4 (Tabla 7). Sin embargo los resultados no alcanzaron la resolución suficiente para mostrar la relación entre las regiones de procedencia de las secuencias analizadas.

Aceptando los cambios en la identidad de las especies de las que provienen las secuencias analizadas, que resultó del patrón mostrado por los árboles más parsimonioso, podemos concluir que las especies de *Prorocentrum* tóxicas quedaron juntas y están representadas por *P. lima* y *P. concavum* las cuales han sido clasificadas dentro del género *Exuviaella*. Por lo tanto se apoya la tendencia a considerarlas como parte del género *Exuviaella*.

De acuerdo con los resultados, también se apoya la hipótesis de que las especies del género *Prorocentrum* comparten un ancestro tóxico.

## Consideraciones metodológicas I: El papel de los gaps (-) en los resultados

La característica del análisis de parsimonia que hizo posible una mejor resolución de la filogenia molecular fue a la incorporación de los gaps (-) en el análisis como una “quinta base”.

Los gaps (-) son resultado de la alineación de dos o más secuencias y representan la pérdida o la ganancia de un nucleótido por parte de un taxon. Siempre son parte implícita del análisis filogenético, porque la posición de los nucleótidos en la secuencia está influida por la presencia de los gaps (-) que les anteceden y por lo tanto, estos determinan que una base sea considerada una homoplasia en una posición determinada.

En la práctica, este hecho significa que los gaps son considerados de manera indirecta en cualquier análisis, en la medida en que la posición de los nucleótidos analizados ha sido establecida por los gaps que le anteceden en la secuencia alineada. Sin embargo, la posibilidad de considerarlos como una “quinta base”, permite analizarlos como una representación de la adquisición o pérdida de un carácter heredable, que es un tipo de mutación distinto a la sustitución de un nucleótido por otro. Por ello es recomendable incluir los gaps como quinta base en el análisis filogenético.

## Consideraciones metodológicas II: Características de las secuencias de SSU y LSURNA.

El análisis filogenético de los dinoflagelados basado en las secuencias de LSU y SSURNA, presenta dificultades producto de las características de las secuencias, que no habían sido establecidas cuando se decidió realizar esta tesis. La publicación de Murray *et al.* (2005) propuso que la incertidumbre en la monofilia de los linajes que persiste en los resultados, se debe al uso de modelos evolutivos que no se ajusten a los datos. Mencionan varias características que pueden confundir la reconstrucción filogenética: regiones de hélices pareadas que contienen sitios que no evolucionan de manera independiente, altos niveles de heterogeneidad en la composición de algunas de las secuencias y diferentes tasas de heterogeneidad entre sitios; por lo que sugirieron privilegiar los análisis probabilísticos.

En consecuencia se analizaron las secuencias con el método Bayesiano, que no mejoró el patrón de relaciones presentado por los árboles más parsimoniosos.

## CONCLUSIONES

1. *Prorocentrum sigmoides* es un sinónimo de *P. gracile* debido a la ausencia de caracteres exclusivos de *P. sigmoides*.
2. Esta conclusión fue ratificada por el análisis de filogenia molecular, ya que no se encontró evidencia de que el morfotipo *Prorocentrum sigmoides* tuviera una identidad molecular distinta a la de *P. gracile*.
3. Son caracteres diagnósticos de *Prorocentrum gracile*: la presencia de un diente antapical o mucrón, la presencia de poros redondeados y depresiones del mismo tamaño en la superficie de las valvas, y la presencia de varios poros alargados. El análisis filogenético apoya la hipótesis de que el ancestro de las especies del género *Prorocentrum* fue una especie de forma redondeada, lisa, con la posibilidad de producir sustancias tóxicas y de hábito epibentónico.
4. Los resultados favorecen la propuesta de McLachlan *et al.*, (1997) de que *Prorocentrum lima* y *P. concavum* pertenecen al género *Exuviaella*.

## PERSPECTIVAS

La investigación sobre el orden Prorocentrales deberá profundizar en el conocimiento de las características peculiares de la información genética de los dinoflagelados, para encontrar las secuencias que permitan establecer los patrones de relación filogenética entre las especies.

Lo anterior permitirá hacer inferencias sobre las relaciones entre la biogeografía y la filogenia de estos organismos. Habrá que abordar un estudio que incluya el análisis del agua de lastre de los barcos, para conocer que especies están migrando en ellos y en qué cantidades.

Será importante establecer un programa de monitoreo que registre de manera sistemática la presencia de florecimientos de cualquier especie de *Prorocentrum*, su toxicidad y las condiciones ambientales bajo las que el florecimiento se produjo, incluyendo la presencia de residuos químicos provenientes de procesos industriales o agroindustriales.

Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies, es una herramienta que permite hacer predicciones de importancia en la salud pública y la economía. La correcta identificación de las especies es indispensable y para ello, aun no hay una forma más fácil, barata y adecuada que utilizando caracteres morfológicos. Por lo tanto establecer caracteres diagnósticos mutuamente excluyentes es una tarea muy importante.



La investigación sobre la historia evolutiva de los dinoflagelados se concentrará en encontrar estados de carácter asociados a los numerosos eventos de endosimbiosis que les han dado origen; en particular en los campos de la biología celular y molecular de la División Dinophyta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balech, E. 1988. *Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental*. Publ. Esp. Inst. Esp. Oceanogr., Madrid, 219 pp.

Band-Schmidt, C. J., E. L. Lilly, and D. M. Anderson. 2003. Identification of *Alexandrium affine* (Inoue & Fukuyo) and *Alexandrium margalefi* Balech, using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assays. *Phycologia* 42 (3): 261-268.

Bolch, C. J. S. 2001. PCR protocols for genetic identification of dinoflagellate cells and cysts. *Phycologia*, 40:162–167.

Böhm, A. 1933. Zur Kenntnis der antarktischen Dinophysiacea. *Int. Rev. Jena* 29 (1-2):398

Bursa, A. 1959. The genus *Prorocentrum* Ehrenberg. Morphodynamics, protoplasmatic structures and taxonomy. *Can. J. Bot.* **37(1)**: 1-31.

Cienkowski, L. (1881) Otchet' o byelomorskoy ekskursii 1880 g *Sanktpetersburgskoe Obshchestvo Estestvoispytatelei, Trudy* 12 (1): pages 130-171, pl. 1-3.

Cohen-Fernández, E. J., E. Meave Del Castillo, I. H. Salgado Ugarte, F. F. Pedroche. 2006. Contribution of external morphology in solving a species complex: The case of *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum gracile* and *Prorocentrum sigmoides* (Dinoflagellata) from the Mexican Pacific Coast. *Phycological Research* Volume 54, Issue 4, Pages 330–340.

Cohen-Fernández, E. J., F. F. Pedroche, M. Rodríguez Palacio, S. Álvarez Hernández and E. Meave del Castillo. 2010. Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the Pacific Coast of Mexico based on the parsimony analysis of fragments of LSUrRNA and SSUrRNA. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* Vol. 2(3), pp.29-37.

Cortés Altamirano, R. y R. Luna Soria. 1997. *Mareas rojas*. AGT Editores, México, 170 pp.

Cortés-Altamirano, R. y A. P. Sierra-Beltran. 2003: Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 39: 221-225.

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

De Luna, E., JA. Guerrero y T. Chew-Taracena. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15(3): 351-370.

Dodge, J. D. 1975. The Prorocentrales (Dinophyceae). II. Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 103-125.

Ehrenberg, C. G. 1835. Das leuchten des meeres. Neue Beobachtungen nebst Übersicht der Hauptmomente der geschichtlichen Entwicklung diese merkwürdigen Phänomens. *Abh. Akad. Wiss.* (Berlin): Figura. VI, 6 a-h.

Faust, M. A. 1993a. Sexuality in a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (Eds.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 121-126.

Faust, M. A. 1993b. Alternate asexual reproduction of *Prorocentrum lima* in culture. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (Eds.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 115-120.

Faust, M.A. & E. Balech. 1993. A further study of marine benthic dinoflagellates from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including *Plagiodinium belizeanum* gen et sp. nov. *Phycologia* 37: 47-52.

Faust, M. A., J. Larsen y Ø. Moestrup. 1999. *Potentially toxic phytoplankton. 3. Genus Prorocentrum (Dinophyceae)*. ICES Identification leaflets for plankton. International Council for the Exploration of the Sea. 24 pp.

Faust, M. A. y R. A. Guedge. 2002 *Identifying harmful marine dinoflagellates*. Contributions from the United States National Herbarium, Department of Systematic Biology – Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 42:1-141.

Fensome, R. A., F. J. R. Taylor, G. Norris, W. A. S. Sarjeant, D. I. Wharton y G. L. Williams. 1993. A classification of fossil and living dinoflagellates. *Micropaleontology Press*. Special Publication 7: 1-351.

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

Grzebyk, D., Y. Sako y B. Berland. 1998. Phylogenetic analysis of nine species *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S Ribosomal DNA sequences, morphological comparisons and descriptions of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *J. Phycol.* 34:1055-1068.

Guiry, M.D. y G. M. Guiry. 2007. AlgaeBase version 4.2. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 11 May 2007.

Haeckel, E. 1904. *Kunstformen der Nature*. Verlag, Alemania. 100 ils.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hansen, G., N. Daugbjerg y P. Henriksen. 2000. Comparative Study of *Gymnodubuyn mikimotoi* and *G. aureolum*, Comb. Nov. (*Gyrodinium aureolum*) based on Morphology, Pigment Composition and Molecular data. *J. Phycol.* 36:394-410.

Hernández-Becerril, D. U., R. Cortés-Altamirano y R. Alonso. 2000. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coast of the Mexican Pacific. *Hidrobiologia* 418: 111-121.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES. Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Levene, H. 1960. Robust test for equality of variance. In: Olkin I., S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow y H. B. Mann (Eds.) *Contributions to probability and Statistics: Essays in honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, California, pp. 278-292.

Licea, S., Moreno J. L., H. Santoyo y G. Figueroa. 1995. *Dinoflagelados del Golfo de California*. México: UABCS-SEP-FOMES. 165 pp.

Lin, S., H. Zhang y N. Jiao. 2006. Potencial utility of mitochondrial cytochrome *b* and ITS mRNA editing in resolving closely related dinoflagellates: A case study of *Prorocentrum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 42:646-654.

McLachlan, J. L., G. T. Boalch y R. Jahn. 1997. Reinstatement of the genus *Exuviaella* (Dinophyceae, Prorocentrophycidae) and an assessment of *Prorocentrum lima*. *Phycologia* 36:38-46.

Meave del Castillo, M. E., M. E. Zamudio-Resendiz, Y. Okolodkov y I. H. Salgado Ugarte. 2003a. *Ceratium balechii* sp. nov. (Dinophyceae: Gonyaulacales) from the Mexican Pacific. *Hidrobiológica*. 13 (1): 75-90.

Meave del Castillo, M. E., M. E. Zamudio-Resendiz, J. Aké-Castillo, S. L. Guerra-Martinez y I. F. Barbosa-Ledezma. 2003b. Biodiversidad de Diatomeas (Bacillariophyta) en la columna de agua del Pacífico Mexicano, cap. 3:43-84. *En*: Barreiro-Güemes, M. T., M. E. Meave del Castillo, M. Signoret-Poillon y M. E. Figueroa-Torres (Eds.) *Planctología Mexicana*. 2003.. Sociedad Mexicana de Planctología, A. C. México. 300p.

Murray, S., M. F. Jorgensen, S. Y. W. Ho, D. J. Patterson y L. S. Jermin. 2005. Improving the analysis of Dinoflagellate phylogeny based on rDNA. *Protist.*, Vol. 156, 269-286.

Okolodkov, Y. B. y I. Garate Lizarraga. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the mexican pacific. *Acta Botánica Mexicana*. 74: 1-154.

Osorio-Tafall, B. 1942. Notas sobre dinoflagelados planctónicos marinos de México, con descripción de nuevas especies. *An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx.* 2: 435-447.

Pearce, I. y G. M. Hallegraeff. 2004. Genetic affinities, ecophysiology and toxicity of *Prorocentrum playfairii* and *P. foveolata* (Dinophyceae) from Tasmanian freshwaters. *Phycologia* 43 (3):271-281.

Posada, D. y K. A. Crandall 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.

Rodríguez, M. 2006. *Establecimiento de Cultivos de dinoflagelados del Pacífico Mexicano*. Tesis Maestría en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. México. 112 pp.

Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Saldarriaga, J. I., F. J. R. Taylor, P. J. Keeling y T. Cavalier-Smith. 2001. Dinoflagellate nuclear SSUrRNA phylogeny suggest multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.* 53:204-213.

Saldarriaga, J. I., F. J. R. Taylor, T. Cavalier-Smith, S. Manden-Deuer y P. J. Keeling. 2004. Molecular data and evolutionary history of dinoflagellates. *Eur. J. Protistol.* 40:85-111.

Schütt, F. 1895. Die Peridineen der Plankton Expedition. *Ergbn. Plankton Exp. Humbolt Stift.* 4: 1-170.

Soyer-Gobillard, M. O., Y. Bhaud y D. Saint Hilaire. 2002. New data on mating in an autotrophic dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *Vie et Milieu* 52(4): 167-176.

Steidinger, K. A. y K. Tangen. 1996. Dinoflagellates. In: Omas C.R. (Ed.) *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Academic Press, San Diego, pp. 387 – 584.



Swofford, D. L. 1991. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey. Champaign. Illinois.

Taylor, F. J. R. 1976. Dinoflagellates from the East Indian Ocean Expedition. A report on material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963-1964. *Biblioteca Botánica* 132. 234 pp.

Taylor, F. J. R. 2004. Illumination or confusion? Dinoflagellate molecular phylogenetic data viewed from a primarily morphological standpoint. *Phycological Research* 52: 308-324.

Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 11:4673-80.

Usup, G., L. C. Pin, A. Ahmad, y L. P. Teen. 2002. Phylogenetic relationship of *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) to other *Alexandrium* species based on ribosomal RNA gene sequences. *Harmful Algae* 1:59-68.

Walsh D., R. A. Reeves, D. J. Saul, R. D. Gray, L. MacKendie, P. R. Bergquist y P. L. Bergquist. 1998. Heterogeneity of SSU and LSU rDNA sequences of *Alexandrium* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26:495-509.

Yoon H. S., D. J. Hackett y D. Bhattacharya. 2002. A single of the peridinin- and fucoxanthin- containing plastids in diniflagellates through tertiary endosymbiosis. *PNAS* 99:11724-9.

Zardoya, R., E. Costas, V. López-Rodas, A. Garrido-Pertierra y J. M. Bautista. 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular análisis of larga subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 44:637-645.

Zhang, H., D. Battacharya y S. Lin. 2005. Phylogeny of Dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 41:411-420.

## ÍNDICE DE TABLAS

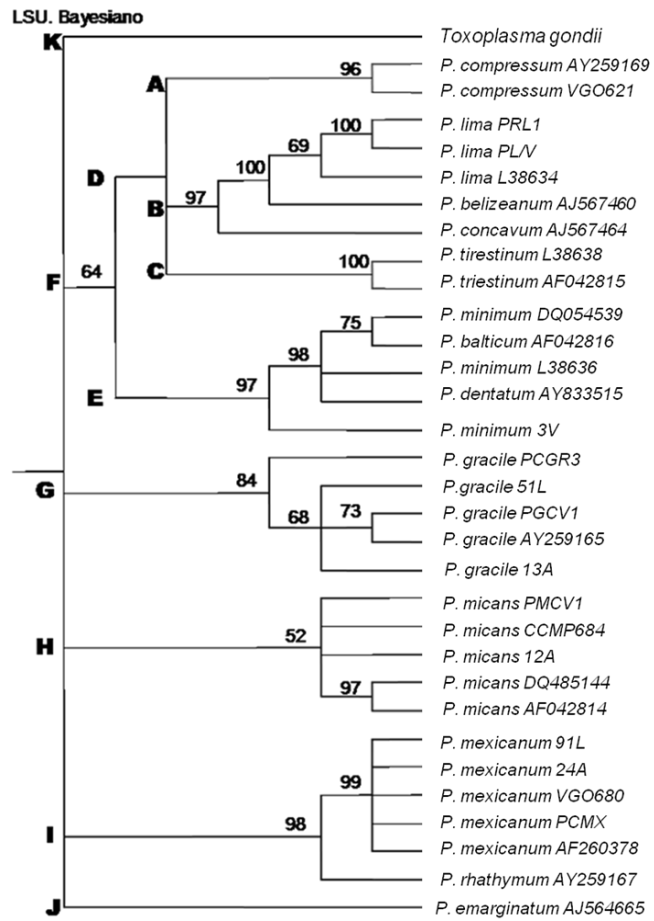
TABLA 1. DIVERSIDAD TAXONÓMICA DE LA CLASE DINOPHYSEA (GUIRY Y GUIRY, 2007 Y ACTUALIZADO DE ACUERDO A LO PUBLICADO EN ALGABASE 2010.).....	19
TABLA 2. RESUMEN DE LOS CARACTERES DIAGNÓSTICOS DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> , <i>P. GRACILE</i> , Y <i>P. SIGMOIDES</i> DEFINIDAS EN LA LITERATURA. ....	32
TABLA 3. COMPARACIÓN DE LAS MEDIDAS DIAGNÓSTICAS PUBLICADAS POR VARIOS AUTORES (DATOS EN $\mu\text{M}$ )	33
TABLA 4. DATOS DE RECOLECTA Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS ANALIZADAS: <i>PROROCENTRUM MICANS</i> ( <i>M</i> ), <i>P. GRACILE</i> ( <i>G</i> ) AND <i>P. SIGMOIDES</i> ( <i>S</i> ). ....	41
TABLA 5. CARACTERES MEDIDOS U OBSERVADOS DIRECTAMENTE EN LAS CÉLULAS. ....	44
TABLA 6. CARACTERES PRODUCTO DE LA RELACIÓN ENTRE DOS MEDIDAS .....	44
TABLA 7. CULTIVOS DE <i>PROROCENTRUM</i> DE LOS QUE PROCEDEN LAS SECUENCIAS EN EL PRESENTE ESTUDIO. ....	49
TABLA 8. SECUENCIAS OBTENIDAS DEL BANCO DE GENES NCBI USADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO. F= FLORECIMIENTOS .....	55
TABLA 9. MODELOS DE OPTIMIZACIÓN Y FUNCIONES OBJETIVAS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE PARSIMONIA DE CADA SUBUNIDAD DE DNA RIBOSOMAL.....	56
TABLA 10. RESULTADOS DE MODELTEST PARA LAS MATRICES LSU, SSU Y LSU+SSU. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS DE AIC, POR QUE REPRESENTA EL RESULTADO DE LA COMPARACIÓN SIMULTÁNEA DE TODOS LOS MODELOS.....	58
TABLA11. PATRÓN DE POROS DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> , <i>P. GRACILE</i> Y <i>P. SIGMOIDES</i> . PROMEDIOS EN 3 CUADRANTES DE $50 \mu\text{m}^2$ LOCALIZADOS AL AZAR EN LA PARTE APICAL, MEDIA Y ANTAPICAL DE LA SUPERFICIE DE LA CÉLULA EN LAS VALVAS IZQUIERDA Y DERECHA.....	62
TABLA 12. COMPARACIÓN DE LOS CARACTERES MORFOMÉTRICOS DE LOS MORFOTIPOS DE <i>PROROCENTRUM</i> ( <i>LT</i> , <i>A</i> , <i>LE</i> EN $\mu\text{M}$ ). SE INCLUYEN TODAS LAS CÉLULAS. ....	66
TABLA 13. COMPARACIÓN DE LOS CARACTERES MORFOMÉTRICOS DE LOS MORFOTIPOS DE <i>PROROCENTRUM</i> INCLUYENDO SOLAMENTE A LAS CÉLULAS SILVESTRES ( <i>LT</i> , <i>A</i> , <i>LE</i> EN $\mu\text{M}$ ).....	67
TABLA 14. ANÁLISIS DISCRIMINANTE DE TODAS LAS CÉLULAS. ....	68
TABLA15. ANÁLISIS DISCRIMINANTE INCLUYENDO ÚNICAMENTE CÉLULAS SILVESTRES. ....	68
TABLA 16. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PARSIMONIA. ....	74
TABLA 17. RESULTADOS DEL ANÁLISIS BAYESIANO.....	75
TABLA 18. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ESPECIES DE <i>PROROCENTRUM</i> DE ESTE TRABAJO DE ACUERDO A (FAUST, <i>ET AL.</i> , 1999, HERNÁNDEZ-BECERRIL, <i>ET AL.</i> , 2000, FAUST Y GULLEDGE 2002). 79	

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DINOFLAGELADOS ILUSTRADOS POR HAECKEL (1904). .....	13
FIGURA 2. CICLO VITAL DE UN DINOFLAGELADO: 1) FISIÓN BINARIA, 2) FUSIÓN DE GAMETOS, 3) PLANOZIGOTO, 4) HIPNOZIGOTO, 5) PLANOMEIOCITO.....	15
FIGURA 3. MORFOLOGÍA DE LOS PROROCENTRALES. FL: FLAGELO LONGITUDINAL, FT: FLAGELO TRASVERSAL, E: ESPINA APICAL, MS: MARGEN DE SUTURA O REBORDE, SS:SUTURA SAGITAL, VI: VALVA IZQUIERDA, VD: VALVA DERECHA, PA: PORO APICAL.....	25
FIGURA 4. ICONOTIPO DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> EHRENBERG (1835), TOMADO DE MCLACHLAN <i>ET AL.</i> (1997).....	29
FIGURA 5. ICONOTIPO DE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> (SCHÜTT, 1895). .....	30
FIGURA 6. ICONOTIPO DE <i>PROROCENTRUM SIGMOIDES</i> . TOMADO DE BÖHM (1933).....	31
FIGURA 7. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS ESPECIES PROPUESTA POR DODGE (1975). .....	34
FIGURA 8. LA FILOGENIA MOLECULAR (SSURRNA) MÁS COMPLETA DE LOS DINOFLAGELADOS, INCLUYE MÁS DE 100 ESPECIES MARINAS Y DE AGUAS DULCES, AUTÓTROFAS Y HETERÓTROFAS (RESUMIDA Y MODIFICADA DE SILDARRIAGA <i>ET AL.</i> 2001). .....	35
FIGURA 9. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE RECOLECTA. 1. LA JOYA, CALIFORNIA, E. U. A., 2. BAHÍA CONCEPCIÓN, B. C. S., 3. MAZATLÁN, SINALOA, 4. SAN BLAS, NAYARIT, 5. CABO CORRIENTES, JALISCO, 6. BAHÍA DE MANZANILLO, COLIMA, 7. EL FARO, MICHOACÁN, 8. BAHÍA DE ZIHUATANEJO, GUERRERO, 9. BAHÍA DE ACAPULCO, GUERRERO. ....	42
FIGURA 10. CARACTERES MEDIDOS. A: ANCHO MÁXIMO, LA: LARGO HASTA EL ANCHO MÁXIMO DESDE LA BASE DE LA ESPINA, L: LARGO SIN ESPINA, LT: LARGO TOTAL, LE: LARGO DE LA ESPINA. ....	43
FIGURA 11. ALGUNOS GELES DE AGAROSA. LA SUBUNIDAD SSURRNA ES MENOS PESADA QUE LA LSURRNA .....	50
FIGURAS 12-13. MORFOTIPO DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> . FOTOGRAFÍAS DE MEB. FIG. 12. VALVA IZQUIERDA. FIG. 13. VALVA DERECHA. LP= POROS GRANDES, SP= POROS PEQUEÑOS, FF=SURCOS, OP= POROS ABIERTOS, D= DEPRESIONES O POROS CERRADOS. ESCALA = 10 µm. ....	59
FIGURAS 14-19. CÉLULAS SILVESTRES DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> . FOTOGRAFÍAS DE MICROSCOPIO DE LUZ. FIGURA 14. FPM1195. FIGURA 15. FPM1188. FIGURA 16. FPM548. FIGURA 17. FPM1401, LP= POROS GRANDES, FF=SURCOS. FIGURA 18. FPM1048. FIGURA 19. FPM1197. ESCALA = 10µm .....	59
FIGURAS 20-23. FOTOGRAFÍAS DE MICROSCOPIO DE LUZ. ESCALA = 10µm. CÉLULAS CULTIVADAS DE <i>PROROCENTRUM MICANS</i> . FIGURA 20. CCMP 689. FIGURA 21. CCMP694. FIGURA 22. PMCV-1. FIGURA 23. PM1V. ....	60
FIGURAS 24-25. FOTOGRAFÍAS DE MEB. ESCALA = 10 µm. MORFOTIPO DE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> . FIGURA 24 VALVA IZQUIERDA. FIGURA 25 VALVA DERECHA. R= POROS REDONDOS, E= POROS ALARGADOS, AT= DIENTE ANTAPICAL (MUCRÓN). ....	62
FIGURAS 26-31. CÉLULAS SILVESTRES DE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> . FOTOGRAFÍAS DE MICROSCOPIO DE LUZ. ESCALA = 10µm. FIGURA 26. FPM1195. FIGURA 27. FPM1188. FIGURA 28. FPM548. FIGURA 29. FPM1048. FIGURA 30. FPM1197, E= POROS ALARGADOS QUE PARECEN ESPINAS. FIGURA 31. FPM1199, AT= DIENTE ANTAPICAL (MUCRÓN). ....	63
FIGURA 32. CÉLULA CULTIVADA DE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> . FOTOGRAFÍA DE MICROSCOPIO DE LUZ. ESCALA = 10µm. PGCV-1. ....	63
FIGURAS 33-34. MORFOTIPO DE <i>PROROCENTRUM SIGMOIDES</i> . FOTOGRAFÍAS DE MEB. ESCALA = 10 µm. FIGURA 33 VALVA IZQUIERDA. FIGURA 34 VALVA DERECHA. AT= DIENTE ANTAPICAL (MUCRON).....	64
FIGURAS 35-39. CÉLULAS SILVESTRES DE <i>PROROCENTRUM SIGMOIDES</i> . FOTOGRAFÍAS DE MICROSCOPIO DE LUZ. ESCALA = 10µm. FIGURA 35. FPM1195. FIGURA 36. FPM1188. FIGURA 37. FPM548. FIGURA 38. FPM1197. FIGURA 39. FPM672, AT= DIENTE ANTAPICAL (MUCRÓN). ....	65
FIGURA 40. ANÁLISIS DISCRIMINANTE DE LAS POBLACIONES SILVESTRES. MEDIDAS CONSIDERADAS: LT, A Y LE. ....	69
FIGURA 41. ANÁLISIS DISCRIMINANTE. POBLACIONES SILVESTRES. CARACTERES INDIRECTOS: L:A, LA:L Y LE:L. ....	70

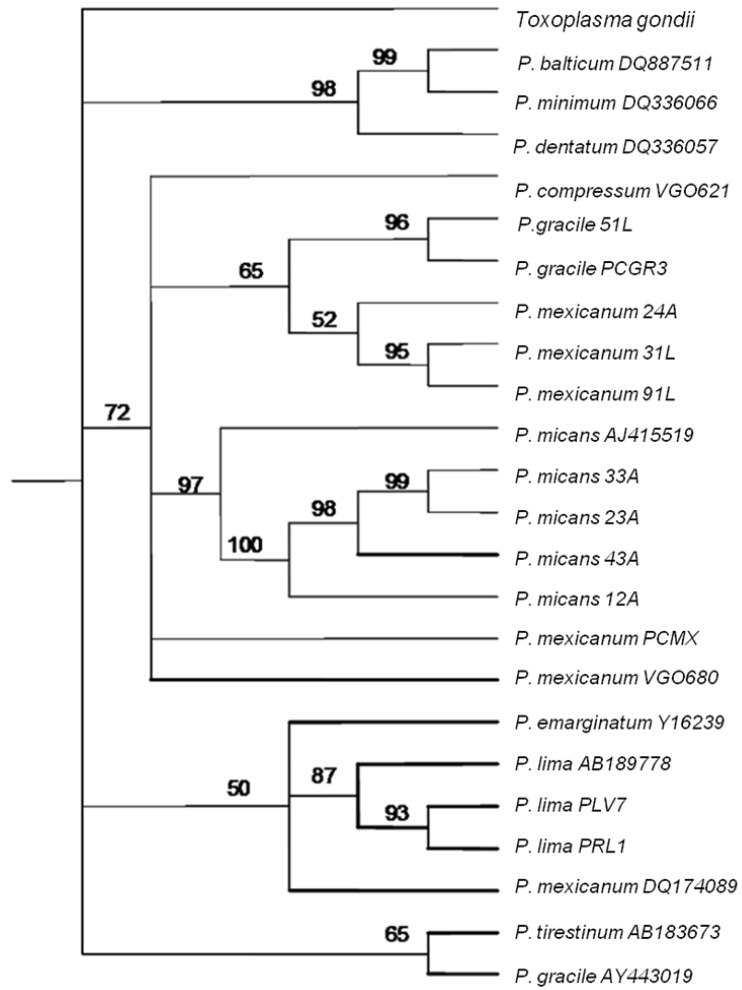
FIGURA 42. ANÁLISIS DISCRIMINANTE. POBLACIONES SILVESTRES Y CULTIVADAS. MEDIDAS CONSIDERADAS: A, LT Y LE.....	71
FIGURA 43. ANÁLISIS DISCRIMINANTE. POBLACIONES SILVESTRES Y CULTIVADAS. CARACTERES INDIRECTOS: L:A, LA:L Y LE:L.....	72
FIGURA 44. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO DE LAS MUESTRAS UTILIZANDO EL PROMEDIO DE LAS MEDIDAS DE LOS CARACTERES LT, A, LE, L:A, LA:L Y LE:L. LAS LETRAS AL FINAL DEL NOMBRE DE LAS MUESTRAS O DE LOS CULTIVOS REPRESENTA A LOS MORFOTIPOS: (M) <i>P. MICANS</i> , (G) <i>P. GRACILE</i> , (S) <i>P. SIGMOIDES</i> .....	73
FIGURA 45. ANÁLISIS DE PARSIMONIA, LSURRNA, FULL HEURISTIC, TBR, 100,000 RÉPLICAS.....	76
FIGURA 46 ANÁLISIS DE PARSIMONIA, SSURRNA, <i>BRANCH AND BOUND</i> , 100 REPLICAS. SE OBTUVO EL MISMO RESULTADO DE TRES REPETICIONES CONSECUTIVAS, CADA UNA CON 100 RÉPLICAS. ....	77
FIGURA 47. ANÁLISIS DE PARSIMONIA, SSURRNA+LSURRNA. BÚSQUEDA EXHAUSTIVA.....	78
FIGURA 48. RESUMEN ILUSTRADO LSURRNA, FULL HEURISTIC, TBR, 100,000 RÉPLICAS. ....	80
FIGURA 49. RESUMEN ILUSTRADO, SSURRNA, <i>BRANCH AND BOUND</i> , 100 REPLICAS. SE OBTUVO EL MISMO RESULTADO DE TRES REPETICIONES CONSECUTIVAS, CADA UNA CON 100 RÉPLICAS. ....	81
FIGURA 50. RESUMEN ILUSTRADO, SSURRNA+LSURRNA. BÚSQUEDA EXHAUSTIVA .....	82
FIGURA 51. EJEMPLOS DE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> PROVENIENTES DE LOS CULTIVOS 51L Y PGCV1, CUYAS CÉLULAS PRESENTARON CARACTERÍSTICAS DE LOS MORFOTIPOS <i>P. GRACILE</i> Y <i>P. SIGMOIDES</i> Y CUYAS SECUENCIAS SE AGRUPAN EN UNA POLITOMÍA. ....	83
FIGURA 52. RESUMEN ILUSTRADO DE LA RELACIÓN ENTRE <i>PROROCENTRUM GRACILE</i> Y <i>P. MICANS</i> . LSURRNA .....	84

# ANEXO

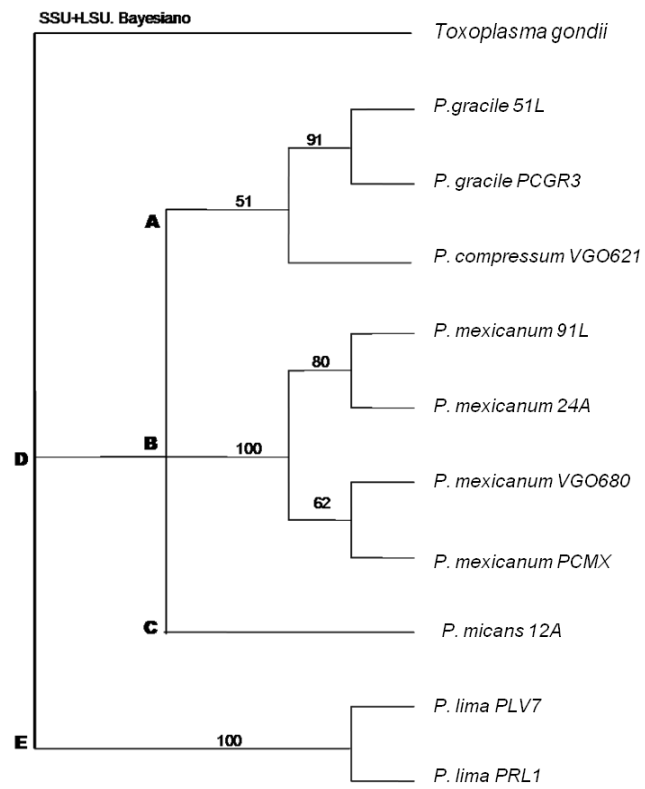


Análisis Bayesiano. LSUrRNA.

SSU. Bayesiano



Análisis Bayesiano. SSUrRNA



Análisis Bayesiano. SSUrRNA+LSUrRNA.



*Full Length Research Paper*

# Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the Pacific Coast of Mexico based on the parsimony analysis of fragments of LSUrDNA and SSUrDNA

Eréndira J. Cohen-Fernández\*, Francisco F. Pedroche, Mónica Rodríguez Palacios, Sergio Álvarez Hernández and Esther Meave del Castillo

Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, México D. F. 09340, México.

Accepted 13 May, 2010

**A phylogenetic analysis of the *Prorocentrum* species is presented, that includes the sequences of the large and small ribosomal RNA subunits from 19 cultures from 13 of the 20 species reported in the Pacific coast of Mexico; the results showed that *P. micans*, *P. gracile* and *P. mexicanum* were the closest of species, that planktonic may be more recent than epibenthonic species and it is suggested that the probable ancestor of the *Prorocentrum* genus could be a round cell without apical spine, toxic and epibenthonic.**

**Key words:** *Prorocentrum*, parsimony analysis, dinoflagellates, LSUrDNA, SSUrDNA.

## INTRODUCTION

Phylogenetic relationships between dinoflagellates based on DNA sequences of the small and large subunits of ribosomal RNA (SSUrDNA and LSUrDNA), have showed that this group of organisms consists of several paraphyletic orders, one of which is Prorocentrales. Within this order, species are taxonomically organized in the genus *Prorocentrum*, *Exuviaella*, *Mesoporus* and *Plagiodinium* belonging to Prorocentraceae family. The Prorocentrales are unicellular algae with two apical inserted flagella. The arrangement of the cortical alveoli consists of two dorso-ventrally compressed tecal plates; the rest of the tecal plates are reduced in size and fused together surrounding the apical pore where the flagella emerge. The suture of the main valves may be thick and in some species the right valve may be prolonged in one or two apical spines. Valve surface may be smooth or perforated by pores, poroids or very small spines. Some species develop blooms and produce toxins. With so few characters used to identify and taxonomically classify this group, the number of species changed constantly, with

many new descriptions appearing during the last part of the 1800s until the 1970s when many synonyms were established and only one genus *Prorocentrum* was recognized; until now, four genera are accepted (Guiry and Guiry, 2007).

Dodge (1975) was the first to explore the relationship between the *Prorocentrum* species, proposing that the direction of the change in the evolution of the characters, recognized as diagnostic, was from smooth to ornamented valves, from round to elongated cells and towards acquisition of the apical spine that tended to be larger or double. He included 21 species (all the accepted ones) in his analysis. Four species seemed to have an independent origin and do not show a clear relationship with the rest *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller, *P. balticum* (Lohmann) Loeblich, *P. maximum* (Gobret) Schiller, *P. cordatum* (Ostenfeld) Dodge. If Dodge's analysis of morphological characters revealed how difficult it was to unearth ancestor-descendant relationships between species, the analyses of DNA sequences exposed that morphological likeness between the *Prorocentrum* masked deep molecular differences.

Molecular phylogeny of the dinoflagellates shows, from the perspective of SSUrDNA, that *Prorocentrum* species

\*Corresponding author. E-mail: erendiraohen@yahoo.com.

**Table 1.** *Prorocentrum* cultures used in the present study.

Species	Culture	Locality	Coordinates	Mexican Pacific region	Date ddmmyy	Colector	Institution	LSU NCBI accession number	SSU NCBI accession number
<i>P. gracile</i>	51L	L. Cárdenas, Michoacán	17°56'17" N 102°11'6" W	3	081104	MRP/SAH	1	EF517249	EF517263
<i>P. gracile</i>	13A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	070604	MRP/CLR	1	EF517251	-
<i>P. gracile</i>	PCGR3	Baja California Sur	-	1 - 2	2004 (yy)	DG	1	EF517248	EF517264
<i>P. gracile</i>	PGCV1	Concepción, Bay BCS	26°40'732" N 111°49'75" O	2	2004 (yy)	LM	2	EF517250	-
<i>P. micans</i>	PMCV1	Concepción, Bay BCS	26°40'732" N 111°49'75" O	2	2004 (yy)	CB	2	EF517254	-
<i>P. micans</i>	23A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	070604	MRP/CLR	1		EF517267
<i>P. micans</i>	43A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	070604	MRP/CLR	1	-	EF517269
<i>P. micans</i>	33A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	070604	MRP/CLR	1		EF517268
<i>P. micans</i>	12A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	040504	MRP/CLR	1	EF517257	EF517270
<i>P. micans</i>	CCMP 684	La Joya, CA, USA	32°90'00" N 117°25'50" O	4	2004	-	3	EF517255	-
<i>P. mexicanum</i>	24A	Acapulco Bay, Guerrero	16°48'58" N 99°53'59" W	3	241104	MRP/CLR	1	EF517259	EF517271
<i>P. mexicanum</i>	31L	L. Cárdenas, Michoacán	17°56'17" N 102°11'6" W	3	081104	MRP/SAH	1	-	EF517272
<i>P. mexicanum</i>	91L	L. Cárdenas, Michoacán	17°56'17" N 102°11'6" W	3	081104	MRP/SAH	1	EF517258	EF517273
<i>P. mexicanum</i>	PCMX	BCS	-	1,2	2004	DG	1	EF517260	EF517275

Table 1. Contd.

<i>P. mexicanum</i>	VGO680	Ria de Vigo, Spain	-	5	2004	-	4	EF517260	EF517275
<i>P. lima</i>	PRL1	El Pardo, California Gulf, BCS	23°35' N 110°49.6' O	2	2004	-	2	EF517252	EF517266
<i>P. lima</i>	PL7V	Ria de Vigo, Spain	-	5	2004	-	4	EF517253	EF517266
<i>P. compressum</i>	VGO621	Ria de Vigo, Spain	-	5	2004	-	4	EF517256	EF517262
<i>P. minimum</i>	3V	Ria de Vigo, Spain	-	5	2004	-	4	EF517247	-

Mexican Pacific regions: (1) West coast of Baja California, (2) California Gulf, (3) Tropical Pacific, (4) California Current / Subtropical (5) Atlantic; Collectors: MRP-Mónica Rodríguez Palacio, SAH-Sergio Álvarez Hernández, CLR-Cruz Lozano Ramírez, DG-Diana Gongora, LM-Lourdes Morquecho, CB- Lourdes Morquecho; Institutions: (1) Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa, Mexico, (2) Northeast Center of Biological Research, Mexico, (3) Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, USA, (4) Spanish Instituto of Oceanography- Oceanographical Center of Vigo, Spain.

are interspersed between the orders Peridiniales, Suessiales, Gymnodiniales and Dinophysiales, while the LSUrDNA analysis are spread between the orders Gymnodiniales, Peridiniales and Dinophysiales (Zardoya et al., 1995; Grzebyk et al., 1998; Daugbjerg et al., 2000; Pearce and Hallegraef, 2004; Saldarriaga et al., 2001; Saldarriaga et al., 2004; Zhang et al., 2005; Murray et al., 2005). Only *P. micans* Ehrenberg, *P. minimum* (Pavillard) Schiller, *P. mexicanum* Tafall and *P. lima* (Ehrenberg) Dodge, have been included systematically in molecular studies and there are no clear conclusions regarding their phylogenetic relationship because lack of consistency in the results, for example while *P. mexicanum* is the sister species of *P. micans* in most of the ribosomal RNA subunit studies, analyses of cob protein and in one SSUrDNA analysis *P. minimum* appears as the sister taxon of *P. micans*.

In the Pacific coast of Mexico some of the most conspicuous dinoflagellates include 20 species of *Prorocentrum* (Okolodkov and Garate, 2006). By sequencing ribosomal DNA from species collected in this area as well as from cultures, donated and purchased specimens, we try to answer the following questions: Which species of *Prorocentrum* are closely related? Do planktonic species derive from an epibenthonic species? Will phylogeny give us a clue about morphological and ecological characters of a *Prorocentrum* possible ancestor?

## MATERIALS AND METHODS

### Cultivation

Six species of *Prorocentrum* from the tropical and

subtropical pacific collected along the Mexican coast were cultured and sequenced for this study. They were cultured in L2 medium prepared with filtered seawater under a 12:12 h light-dark cycle at 20°C. The same growth conditions were used with cultures donated or purchased, two from Baja California Mexico, one from the coast of California USA, also three cultures from Spain were included: *P. lima*, *P. compressum* and *P. minimum* with the idea to compare sequences, because the species are also found in Pacific Mexico (Table 1).

### DNA extraction, PCR and sequencing

DNA was extracted from 19 *Prorocentrum* strains (Table 2), using 1.5 ml of midlogarithmic phase cultures, also using the DNeasy Plant Minikit from Quiagen and following the manufactures instructions. The only variation to the protocol was the lysis of cells by freezing the harvested cells at -20°C during 10 min and then thawing them at room temperature. The D1-D2 conserved regions and

**Table 2.** *Prorocentrum* sequences from the GenBank, that were incorporated in this study.

Species	Culture	LSU NCBI accession no.	SSU NCBI code	Location
<i>P. balticum</i>	B	AF042816	-	Massachusetts, USA
<i>P. balticum</i>	D-71	-	DQ887511	South Korea
<i>P. belizeanum</i>	PBMA_01	AJ567460	-	Reunion Island, SW, Indian Ocean
<i>P. compressum</i>	PCPA_01	AY259169	-	Port Arthur, Tasmania
<i>P. concavum</i>	PCRN_01	AJ567464	-	Reunion Island, SW, Indian Ocean
<i>P. dentatum</i>	-	AY833515	-	China
<i>P. dentatum</i>	CCMP1517	-	DQ336057	South Pacific
<i>P. emarginatum</i>	PERN_05	AJ567465	-	Reunion Island, SW, Indian Ocean
<i>P. emarginatum</i>	PREU-2	-	Y16239	Reunion Island, SW, Indian Ocean
<i>P. gracile</i>	PGDW01	AY259165	-	Derwent River, Tasmania
<i>P. gracile</i>	CCCM765	-	AY443019	Canada
<i>P. lima</i>	PL7V	L38634	-	IEO, Vigo, Spain
<i>P. lima</i>	CRLMN-6	-	AB189778	Limón, Costa Rica
<i>P. mexicanum</i>	-	AF260378	-	Denmark
<i>P. mexicanum</i>	SP3	-	DQ174089	Cat Ba, Hai Phong, Viet Nam
<i>P. micans</i>	EMBL04062	DQ485144	-	China
<i>P. micans</i>	B	AF042814	-	South Korea
<i>P. micans</i>	-	-	AJ415519	Norway
<i>P. minimum</i>	B	DQ054539	-	East Sea China, Fijian Province
<i>P. minimum</i>	PMIN1	L38636	-	IEO, Lisbon
<i>P. minimum</i>	JA0001	-	DQ336066	Connecticut, USA
<i>P. rhathymum</i>	PRLS02	AY259167	-	Little Swan port, Tasmania
<i>P. triestinum</i>	MBIC11147	-	AB183673	Japan
<i>P. triestinum</i>	PT5V	L38638	-	IEO, Vigo, Spain
<i>P. triestinum</i>	B	AF042815	-	South Korea
<i>T. gondii</i>	-	X75429	X75429	New York, USA

B = Blooms

intervening variable domains of the (LSU) ribosomal gene were amplified using polymerase chain reaction (PCR) with D1R forward and D2C reverse primers (Bolch, 2001) and the SSU ribosomal gene with 16S1N forward and 16S2N reverse primers (Grzebyk et al., 1998); 20 µL PCR products were amplified in a Touchgene gradient (Techne). LSUrDNA protocol: Initial denaturalization 94°C × 2 m and 30 cycles of denaturalization 94°C × 1 m, annealing 58°C × 1.5 m, extension 72°C × 3 m and final extension 72°C × 6 m. SSUrDNA protocol: Initial denaturalization 94°C × 2 m and 30 cycles of denaturalization 94°C × 1 m, annealing 58.6°C × 2 m, extension 72°C × 3 m and final extension 72°C × 7 m. PCR reactions were checked for successful amplification by electrophoresis of products through 1% agarosa gels. PCR product was cleaned using a QIAquick PCR purification kit (Quiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers protocol. PCR product was sequenced using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems following the manufacturer's protocol. The product was purified in CentriSep columns (52 mg sephadex G-50 suspended in 800 ml distilled water) and finally sequenced at the Institute of Biology at the National Autonomous University of Mexico and at the Molecular Biology Laboratory at the Metropolitan Autonomous University.

The consensus sequences were obtained by pair wise alignment (optimal GLOBAL alignment, BioEdit 7.0.5.2 [Hall, 1999]) and then aligned with sequences obtained from GenBank (National Center for Biotechnology Information) databases, using Clustal W (full

multiple alignment with 1,000 bootstrap) (Thompson et al., 1994). Alignment included both variable and conserved regions.

### Phylogenetic analyses

Stimulation of phylogeny was carried out using Paup 3.1 (Swofford, 1993). The analyses included the original sequences as well as sequences available in the GenBank database, the ciliate *Toxoplasma gondii* was selected as the out group. This species is used in most phylogenetic analysis of dinoflagellates and its sequence included both SSU and LSU fragments (Table 2).

## RESULTS

The molecular diversity of the SSU and LSU calculated by "p" uncorrected distances shows that SSU varies more within the *Prorocentrum* genus (up to 0.71%) than between *Prorocentrum* and *Toxoplasma*. The opposite is true for the LSU region where the interspecific differences were less than the intergeneric ones (up to 0.661%) (Table 3).

The *Prorocentrum* species in this study includes 13 of

**Table 3.** Optimization model and objective functions used in the parsimony analysis.

Ribosomal subunit	Taxa	Nucleotides	Optimization model	Optimization strategies
LSU	32	639	Full heuristic	DELTRAN Gap as 5th base
			TBR 100,000 replicas three repetitions w/same result	
SSU	23	639	Branch & Bound	DELTRAN Gap as 5th base
			100 replicas three repetitions w/ same result	

the 20 species reported for the Pacific coast of Mexico. A summary of the main morphological and ecological characteristics of these twelve species is presented in Table 4. The results from the parsimony analysis appear in Table 5 and in Figure 1. LSUrDNA was the fragment with the higher number of parsimony informative characters.

#### LSUrDNA

The most parsimonious tree proposes that the species are related with each other in sets of trichotomies, the first one formed by *P. gracile* Schütt 1896, *P. micans* and *P. mexicanum*, and this group is part of the second trichotomy that includes *P. triestinum*, and a cluster formed by *P. minimum*, *P. balticum* and *P. dentatum* Stein. The third trichotomy includes along with the last group *P. emarginatum* Fukuyo and a branching dichotomy of *P. lima* and *P. belizeanum*.

#### SSUrDNA

Even though the species included in the analysis are a slightly different group than those included in the LSUrDNA analysis, it also includes *P. compressum* in a politomy with *P. gracile*, *P. micans*, and *P. mexicanum*.

#### DISCUSSION

*P. gracile* and *P. micans*, have been considered as part of a species complex because of its likeness. Its status as a species based on the analysis of their morphometry has been discussed in an earlier paper (Cohen-Fernández et al., 2006).

*P. balticum*, *P. dentatum* and *P. minimum* had almost identical sequences, and appeared together consistently. *P. minimum* and *P. balticum* look pretty much alike (Faust and Gullledge, 2002). The closeness of *P. minimum* and *P. dentatum* had been already reported elsewhere (Lin et al., 2006) and it is confirmed here.

*P. concavum* was closer to the ancestral position, either as the oldest or associated with the cluster that included *P. lima* (Pearse and Hallegareff, 2004); it seems to share molecular characters that place it between the harmless planktonic species and the toxic epibenthonic ones.

#### Phylogeny and biogeography

The Pacific coast of Mexico has been divided in five (5) regions (Meave del Castillo et al., 2003) (Table 1). The populations of *P. gracile*, *P. micans* and *P. mexicanum* belong to the west coast of Baja California, the California Gulf and the Tropical Pacific regions. All sequences of *P. micans* from Mexico grouped and were closest to those from the U. S. California coast. The SSUrDNA sequences of *P. micans* from the Acapulco Bay formed a monophyletic clade. *P. mexicanum* from the Mexican tropical Pacific formed a trichotomy with the populations from the subtropical Pacific and the Atlantic (Spain). The sequence of *P. minimum* from Lisbon was closest to the sequence from China than to that from Vigo, Spain.

#### Phylogeny and ecology

Toxic species were interspersed among non toxic species. *P. lima*, *P. belizeanum* and *P. concavum* formed one cluster, they are epibenthonic and toxic species that were formerly considered *Exuviaella*. The second cluster was formed by *P. minimum* and *P. dentatum*, they are planktonic as well as toxic species.

The LSUrDNA sequence of *P. rhatymum* Loeblich III, Sherley and Schmidt from Tasmania was clustered along with the *P. mexicanum*, while the SSUrDNA sequence of *P. mexicanum* from Vietnam went to the *P. lima* branch. Probably these sequences may have been misidentified and their names should be switched, Cortés-Altamirano and Sierra-Beltran (2003) suggested *P. mexicanum* to be planktonic and *P. rhatymum* to be toxic and epibenthonic.

**Table 4.** Characteristics of the *Prorocentrum* species<sup>§</sup>.

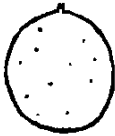
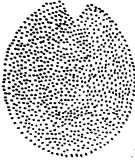
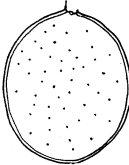

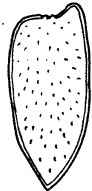
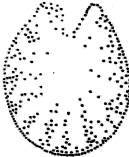
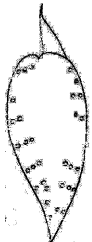
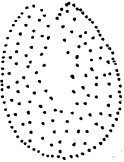


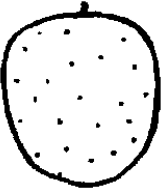


Species	Habit	Shape	Looks like	Ex <i>Exuviaella</i>	Toxicity
<i>P. balticum</i>	Planktonic		<i>P. minimum</i>	No	None
<i>P. belizeanum</i>	Epibenthonic		<i>P. compressum</i>	Yes	Okadaic Acid, DSP, DTX-1
<i>P. compressum</i>	Planktonic		<i>P. belizeanum</i>	No	None
<i>P. concavum</i>	Epibenthonic		<i>P. lima</i>	Yes	FAT, DSP Okadaic acid
<i>P. dentatum</i>	Planktonic		-	No	None
<i>P. emarginatum</i>	Epibenthonic		<i>P. rathymum</i> <i>P. mexicanum</i>	No	None
<i>P. gracile</i>	Planktonic		<i>P. sigmoides</i>	No	None

Table 4. Contd.

<i>P. lima</i>	Epibenthonic		<i>P. concavum</i>	Yes	Prorocentrolid acid, Okadaic acid, FAT DSP, DTX-1, 2 and 4
<i>P. mexicanum</i>	Planktonic		<i>P. emarginatum</i> <i>P. mexicanum</i>	No	None
<i>P. micans</i>	Planktonic		<i>P. gracile</i>	No	None
<i>P. minimum</i>	Planktonic		<i>P. balticum</i>	Yes	Venerupin (hepatothoxina)
<i>P. rhathymum</i>	Epibenthonic		<i>P. emarginatum</i> <i>P. mexicanum</i>	-	FAT <sup>§§</sup>
<i>P. triestinum</i>	Planktonic			No	None

<sup>§</sup> References: Faust et al. (1999), Hernández-Becerril et al. (2000) and Faust and Gullledge (2002).

<sup>§§</sup>IOC states that all toxicity cases are caused by *P. rhathymum* and not to *P. mexicanum*.

Table 5. Results of the Phylogenetic analysis: Parsimony.

Parsimony analysis	Number of informative characters	Best tree score	Consistency index
LSU	300	1158	0.737
SSU	147	1128	0.884





- Pacific. Hydrobiol, 418: 111-121
- Lin S, Zhang H and Jiao N (2006). Potencial utility of mitochondrial cytochrome b and ITS mRNA editing in resolving closely related dinoflagellates: A case study of *Prorocentrum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 42: 646-654.
- Meave del Castillo ME, Zamudio-Resendiz ME, Aké-Castillo J, Guerra-Martinez SL and Barbosa-Ledezma IF (2003). Biodiversidad de diatomeas (Bacillariophyta) en la columna de agua del Pacífico Mexicano *in*: Barreiro-Güemes MT, Meave del Castillo ME, Signoret-Poillon M and Figueroa-Torres ME (Eds.) *Planctología Mexicana*. Sociedad Mexicana de Planctología AC, México.
- Murray S, Jorgensen MF, Ho SYW, Patterson DJ, Jermin LS (2005). Improving the analysis of Dinoflagellate phylogeny based on rDNA. *Protist*. 156: 269-286.
- Okolodkov YB, Garate Lizarraga I (2006). An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the mexican pacific. *Acta Bot Mex.* 74: 1-154.
- Pearce I, Hallegraef GM (2004). Genetic affinities, ecophysiology and toxicity of *Prorocentrum playfairii* and *P. foveolata* (Dinophyceae) from Tasmanian freshwaters. *Phycol.* 43: 271-281.
- Saldarriaga JI, Taylor FJR, Keeling PJ, Cavalier-Smith T (2001). Dinoflagellate nuclear SSUrRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.* 53: 204-213.
- Saldarriaga JI, Taylor FJR, Cavalier-Smith T, Manden-Deuer S, Keeling PJ (2004). Molecular data and evolutionary history of dinoflagellates. *Eur. J. Protistol.* 40: 85-111.
- Swofford DL (1993). PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1 Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey. Champaign, Illinois. pp.1-302
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 4673-80.
- Zardoya R, Costas E, López-Rodas V, Garrido-Pertierra A, Bautista JM (1995). Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of long subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 44: 637-645.
- Zhang H, Battacharya D, Lin S (2005). Phylogeny of Dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 41: 411-420.



Este documento fue editado e  
impreso en los talleres de



**“EXPERTOS EN IMPRESIÓN Y  
ENCUADERNACIÓN DE DOCUMENTOS”**  
**[www.mitesis.mx](http://www.mitesis.mx)**

 **38-69-29-35**  
USACELL 5508-1404  
NEXTEL 1942-1162  
[copilco@mitesis.mx](mailto:copilco@mitesis.mx)