



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Unidad Académica Mazatlán
Universidad Nacional Autónoma de México



**Comparación morfológica y toxicológica de las poblaciones de
Pyrodinium bahamense Plate del sur del Golfo de California (México)**

T E S I S

Que para obtener el grado de académico de
Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

Presenta:

Biól. Gladys Anahí Martínez Tecuapacho

Directoras de Tesis: Dra. Rosalba Alonso Rodríguez

Dra. María de Lourdes Morquecho Escamilla

Comité Tutorial: Dra. Ma. Esther Meave del Castillo

Dra. Martha Signoret Poillon

M.C. Roberto Cortés Altamirano

Mazatlán, Sinaloa, octubre 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de *Biotoxinas Marinas*, Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM y en el Laboratorio de *Ecología de Fitoplancton* del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).

Los siguientes proyectos apoyaron la realización de esta tesis:

- Taxonomía y eco-fisiología de microalgas nocivas (PC3.3).
- Colección de Dinoflagelados Marinos (749-0).
- Taxonomía, cinética de crecimiento y ciclo de vida de dinoflagelados nocivos (SIN-1 clave 90831).
- Dinámica de los nutrientes de las lagunas costeras de Sinaloa: flujos, transporte, interacciones con sedimentos y organismos (SEMARNAT-CONACYT 2002-C010161).
- Producción de biotoxinas por microalgas (2010-2011). Proyecto Institucional Unidad Académica Mazatlán Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Identificación de Fitoplancton y Saxitoxinas en la playa La Colorada de Santiago Astata y Punta Colorada en Puerto Escondido, Oaxaca (M.P.C.A. Elsa Mendoza Amézquita, Universidad del Istmo, Campus Tehuantepec).
- Proyecto # IN210609 Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) 2010-2011

AGRADECIMIENTOS.

Al ICMYL-UNAM, Unidad Académica Mazatlán por permitirme ser parte de su posgrado. Así como a todo el personal que siempre me ha brindado un trato cálido, haciendo más ameno el trabajo.

Al CONACyT por la beca No. 41549 otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al CIBNOR y a la CODIMAR por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A mis directoras:

A la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez, antes que nada por permitirme ser nuevamente su alumna, brindarme la confianza y apoyo para realizar este trabajo, por su dirección y aportaciones al escrito, además de las facilidades otorgadas para realizar el análisis de toxinas.

A la Dra. Lourdes Morquecho Escamilla, quien me recibió en el Lab. Ecología de Fitoplancton (CIBNOR, La Paz) y tuvo la paciencia para enseñarme el uso de los microscopios para realizar el análisis morfométrico de las células vegetativas y quísticas, por la planeación del ensayo de germinación y por su gran ayuda en la preparación de las muestras para microscopía electrónica, gracias por compartir su experiencia laboral y personal.

A ambas reitero mi agradecimiento, por haber confiado en mí para realizar este proyecto, ya que durante el desarrollo del mismo siempre conté con su apoyo, comprensión y tolerancia. Su dedicación a la educación e investigación de calidad son un ejemplo que deseo seguir en mis futuras actividades.

A mi comité tutorial: Dra. Esther Meave, Dra. Martha Signoret y M.C. Roberto Cortés, por sus valiosos comentarios y sugerencias para la mejora del escrito.

A la M.C. Amada Reyes (CIBNOR, La Paz), por su apoyo técnico para la preparación de material, manejo de microscopios, preparación de muestras para microscopía electrónica y en el ensayo de germinación, además de su grata compañía.

A Ariel Cruz Villacorta (CIBNOR, La Paz), por su invaluable labor de servicio técnico durante las sesiones de microscopía electrónica de barrido y por los buenos ratos de charla.

A Cristina Osuna y Ruth Pazos, por su valiosa ayuda en la preparación de muestras para el análisis cromatográfico.

A Jeanette Delgado del V. y Vicia Bernal C. por su apoyo técnico en el proceso de análisis cromatográfico.

Al Dr. Federico Páez O., por facilitarme un espacio en el Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera y hacerme sentir parte de su laboratorio.

Al Mat. Germán Ramírez R., por su invaluable ayuda en el procesamiento y análisis estadístico de los datos, asesoría de edición y cómputo.

Al M.C. Rafael Hernández Guzmán, por la elaboración de mapas.

A Margarita Cordero R., por su amabilidad y gran disposición para realizar todo tipo de trámites.

Al L.A.S.C.A.. Carlos Suarez G. y a la Lic. Herlinda Rojas V., por su ayuda en el centro de cómputo.

A la Sra. Clara Ramírez J., por su invaluable colaboración y orientación en la búsqueda de material bibliográfico.

A mis grandes amigos: Dulce Casas, Elizabeth Frausto, José Carlos Peña, Juan Montoya (JP) y Pedro Flores quienes a pesar de la distancia estuvieron presentes en los momentos críticos y también en los felices.

A mis compañeros y amigos: Alina Núñez, Adriana Pérez, Bibiana Musso, Claudia Ángel, Cristina Osuna, Dana Arizmendi, Magdalena Bergés, Marcela Fregoso, Gabriela, García, Genoveva Cerdaneres, Marcela Zuñiga, Jorge Bustamante, Jorge Payán, Roberto Rivera, Roberto Vallarta, Segir Verdugo y Vicente Navarro, por los buenos ratos de risas y por las palabras de ánimo para terminar este proceso.

Gracias por su apoyo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	36
2. ANTECEDENTES	38
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS	43
Objetivo general	43
Objetivos particulares.....	43
6. ÁREA DE ESTUDIO.....	44
7. METODOLOGÍA.....	47
7.1 Colecta de fitoplancton y sedimento marino.....	47
7.2 Análisis morfométrico de células vegetativas y quísticas	48
7.2.1 Microscopía de luz	48
7.2.2 Microscopía electrónica de barrido.....	50
7.3 Ensayo de germinación de quistes de <i>Pyrodinium bahamense</i> del SE de la Isla San José	51
7.4 Análisis de toxinas paralizantes	52
7.5 Análisis de datos	54
8. RESULTADOS	55
8.1 Análisis morfométrico de células vegetativas.	55
8.1.1 <i>Pyrodinium bahamense</i> de la Isla San José, B.C.S.	55
8.1.2 <i>Pyrodinium bahamense</i> de la laguna de Yavaros, Son.	56
8.1.3 <i>Pyrodinium bahamense</i> de la laguna de El Colorado, Sin.....	59
8.1.4 <i>Pyrodinium bahamense</i> de la laguna de La Reforma, Sin.....	59
8.1.5 <i>Pyrodinium bahamense</i> de la playa La Colorada, Oax.	60
8.2 Análisis morfométrico de células quísticas de <i>Pyrodinium bahamense</i>	75

8.3 Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en la germinación de los quistes de <i>P. bahamense</i>	82
8.4 Análisis de toxinas paralizantes	86
9. DISCUSIÓN	88
9.1 Análisis morfológico de células vegetativas	88
9.2 Análisis morfológico de células quísticas de <i>Pyrodinium bahamense</i>	94
9.3 Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en la germinación de los quistes de <i>Pyrodinium bahamense</i>	95
9.4 Análisis de toxinas paralizantes	97
10. CONCLUSIONES.....	99
11. RECOMENDACIONES	100
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
13. GLOSARIO.....	115
14. ANEXOS	117
14.1 Estatus taxonómico de <i>Pyrodinium bahamense</i>	117
14.2 Estatus taxonómico de <i>Polysphaeridium zoharyi</i>	118
14.3 Soluciones A y B (Fase móvil) y gradiente binario para análisis de toxinas en HPLC.....	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo	46
Tabla 2. Muestras colectadas para el análisis morfométrico y el ensayo de germinación de quistes.	47
Tabla 3. Rasgos morfológicos de la forma vegetativa y quística de <i>Pyrodinium bahamense</i> considerados en el análisis morfométrico.....	49
Tabla 4. Características morfométricas de las células vegetativas de <i>Pyrodinium bahamense</i> n=100 $\bar{X} \pm$ desvest. (intervalo).....	57
Tabla 5. Resumen de la prueba de Kruskal-Wallis, aplicada a las características morfométricas de las células vegetativas ($\alpha= 0.05$) valores en negritas corresponden al valor de p donde se acepta H_a ($p < Q$).....	71
Tabla 6. Descripción del análisis morfométrico de células vegetativas a partir de la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha= 0.05$). Se resalta en color gris los rasgos morfométricos que no presentaron diferencias significativas (SJ = Isla San José, B.C.S., YA = laguna de Yavaros, Son., EC = laguna de El Colorado, Sin., LR = laguna de La Reforma, Sin., LC = playa La Colorada, Oax.)	73
Tabla 7. Tabla de comparaciones múltiples de <i>Newman-Keuls</i> . Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).....	74
Tabla 8. Resumen del análisis de varianza de dos vías (salinidad/ medio de cultivo); salinidad (temperatura/ medio de cultivo); medio de cultivo (temperatura/ salinidad). Las claves A s/e= agua de mar sin enriquecimiento; ns = valores no significativos y d = muestra diferencia ($\alpha = 0.05$) pero por el número de datos disponibles no se puede establecer con certeza dicha diferencia.....	84
Tabla 9. Resumen de la prueba <i>a posteriori</i> de Bonferroni. Letras iguales a, b, c indican similitud entre las variables. Las claves A s/e= agua de mar sin enriquecimiento; ns = valores no significativos ($\alpha < 0.05$).....	85
Tabla 10. Morfometría de <i>Pyrodinium bahamense</i> (* var. <i>compressum</i>)	92

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo (Isla San José, B.C.S.; laguna de Yavaros, Sonora; laguna El Colorado, Sinaloa; laguna de La Reforma, Sinaloa; playa La Colorada, Oaxaca). 45
- Figura 2. Dispersión y tendencia de los caracteres morfométricos de células vegetativas de las poblaciones de *Pyrodinium bahamense* (letras iguales a, b, c, y d. indican similitud en el valor de la mediana de cada población). 58
- Figura 3. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de SJ. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical. Escala=20 μ m. 61
- Figura 4. *Pyrodinium bahamense* en vista dorsal, mostrando la prominencia de la espina antapical izquierda (*Eai*). Espécimen de SJ. Escala= 20 μ m. 61
- Figura 5. *Pyrodinium bahamense* formado una cadena de cuatro células. Especímenes de SJ. Escala= 10 μ m. 61
- Figura 6. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de YA. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μ m. .. 61
- Figura 7. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de EC. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μ m. .. 61
- Figura 8. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de LC. *Ca*- cuerno apical. Escala= 20 μ m. 61
- Figura 9. *Pyrodinium bahamense* en vista lateral, mostrando la prominencia de la espina antapical izquierda (*Eai*). Espécimen de LC. Escala= 20 μ m. 61
- Figura 10. *Pyrodinium bahamense* formando una cadena de dos células. Especímenes de LC. Escala= 20 μ m. 61
- Figura 11. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de SJ. *Ca*- cuerno apical, *Ead*- espina antapical derecha, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala=20 μ m. 63
- Figura 12. *Pyrodinium bahamense* en vista lateral. Espécimen de SJ. *Ca*- cuerno apical, *pt*- poros de tricocistos, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala=20 μ m. 63
- Figura 13. *Pyrodinium bahamense* en vista apical. Espécimen de SJ. *Pv*- poro ventral en 4 \square y CPA complejo del poro apical. Escala= 5 μ m. 63

Figura 14. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista antapical. Espécimen de SJ. <i>Sp</i> - placa sulcal posterior, <i>pp</i> - poro posterior. Escala= 5 µm.	63
Figura 15. Complejo del poro apical (CPA) de <i>P. bahamense</i> . Espécimen de SJ. Escala= 5 µm.	63
Figura 16. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral, mostrando placa 1 □ □ □ postcingular. Espécimen de SJ. Escala= 5 µm.	63
Figura 17. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral. Espécimen de YA. <i>Ea</i> - espina apical, <i>Ca</i> - cuerno apical, <i>Ead</i> - espina antapical derecha, <i>Eai</i> - espina antapical izquierda. Escala= 20 µm.....	65
Figura 18. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista dorsal. Espécimen de YA. <i>Ea</i> - espina apical, <i>Ca</i> - cuerno apical. Escala= 20 µm.	65
Figura 19. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista apical. Espécimen de YA. <i>Pv</i> - poro ventral en 4' y CPA- complejo del poro apical. Escala= 10 µm.	65
Figura 20. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista antapical. Espécimen de YA. <i>Sp</i> - placa sulcal posterior. Escala= 10 µm.	65
Figura 21. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral mostrando el desplazamiento del cíngulo. Espécimen de YA. Escala= 10 µm.....	65
Figura 22. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral mostrando placa 1 □ □ □ postcingular. Espécimen de YA. Escala= 10 µm.....	65
Figura 23. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral. Espécimen de EC. <i>Ea</i> - espina apical, <i>Ca</i> - cuerno apical, poro ventral (<i>Pv</i>) en 4 □ , <i>Eai</i> - espina antapical izquierda. Escala= 20 µm.....	67
Figura 24. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista dorsal. Espécimen de EC. <i>Ea</i> - espina apical, <i>Ca</i> - cuerno apical, <i>Eai</i> - espina antapical izquierda. Escala= 20 µm. ..	67
Figura 25. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista apical. Espécimen de EC. Escala= 10 µm.	67
Figura 26. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista antapical. Espécimen de EC. <i>Sp</i> - placa sulcal posterior y <i>pp</i> - poro posterior. Escala= 20 µm.	67
Figura 27. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral. Espécimen de EC. <i>pt</i> - poros de tricocistos, <i>Ead</i> - espina antapical derecha, <i>Eai</i> - espina antapical izquierda. Escala= 20 µm.	67

Figura 28. Placa sulcal posterior (<i>Sp</i>) separada del área sulcal con la técnica de disección de la teca. Espécimen de EC. Escala= 20 µm.	67
Figura 29. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista ventral. Espécimen de LC. Poro ventral (<i>Pv</i>) en 4□, <i>Ead</i> - espina antapical derecha. Escala= 20 µm.....	69
Figura 30. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista lateral. Espécimen de LC. <i>Ca</i> - cuerno apical, <i>pt</i> - poros de tricocistos y <i>Eai</i> - espina antapical izquierda. Escala= 20 µm.....	69
Figura 31. <i>Pyrodinium. bahamense</i> en vista apical. Espécimen de LC. CPA-complejo del poro apical. Escala= 5 µm.....	69
Figura 32. <i>Pyrodinium bahamense</i> en vista antapical. Espécimen de LC. <i>Sp</i> - placa sulcal posterior y <i>pp</i> - poro posterior. Escala= 5 µm.	69
Figura 33. Detalle del complejo del poro apical (CPA) de <i>P. bahamense</i> . Espécimen de LC. <i>Po</i> - placa Po con 13 poros, <i>ap</i> - poro anterior, <i>cp</i> - dosel en forma de coma. Escala= 5 µm.	69
Figura 34. Detalle del complejo del poro apical (CPA) de <i>P. bahamense</i> . Espécimen de LC. <i>cp</i> - dosel en forma de coma. Escala= 5 µm.....	69
Figura 35. Quiste vacío con pared celular incolora, esférico y rodeado de numerosos procesos tipo capitado. Espécimen de SJ. Escala= 20 µm.	76
Figura 36. Quiste vacío en vista apical. La flecha indica el vestigio del poro apical, nótese el epiquiste subdividido en paraplacas. Espécimen de SJ. Escala= 20 µm.....	76
Figura 37. Quiste lleno, nótese el citoplasma granular y el cuerpo rojo en posición central. Escala= 20 µm.....	76
Figura 38. Quiste lleno, nótese el citoplasma granular, en este caso sólo abarca la mitad del interior del quiste. Espécimen de SJ. Escala= 20 µm.....	76
Figura 39. Detalle de los procesos tubulares con terminación tipo capitado. Espécimen de SJ. Escala= 10 µm.	76
Figura 40. Quiste germinado mostrando el arqueópilo epiquistal. Espécimen de SJ. Escala= 20 µm.	76
Figura 41. Quiste corado, mostrando las paraplacas en el epiquiste, nótese que el hipoquiste no presenta subdivisión. Espécimen de SJ. Escala= 5 µm.....	78

Figura 42. Quiste en vista apical, presencia de paraplacas en el epiquiste, la flecha indica el vestigio del poro apical. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm	78
Figura 43. Detalle del perifragma mostrando textura microgranular. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm	78
Figura 44. Detalle del endofragma mostrando aspecto liso. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm	78
Figura 45. Detalle de los procesos tubulares, nótese la bifurcación de algunos de ellos desde la base. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm	78
Figura 46. Detalle de la terminación de los procesos tubulares, mostrando terminación lobulada y asimétrica. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm	78
Figura 47. Desarrollo inicial de los procesos, nótese las paraplacas en el quiste. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm	80
Figura 48. Quiste en vista lateral, mostrando el crecimiento discontinuo de los procesos, nótese un mayor desarrollo de procesos en el epiquiste. Escala= 10 μm	80
Figura 49. Quiste en vista lateral, mostrando procesos tubulares y algunos bifurcados desde la base, completamente desarrollados pero adheridos a la pared del quiste. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm	80
Figura 50. Quiste mostrando procesos completamente desarrollados, nótese el desdoblamiento discontinuo de los procesos. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm	80
Figura 51. Quiste corado, mostrando la distribución azarosa de los procesos, nótese que los procesos se encuentran en el interior de las paraplacas y no en la sutura del epiquiste. Escala= 10 μm	80
Figura 52. Quiste corado, mostrando los procesos con terminación tipo capitada, cuya longitud es de 5 a 13 μm . Espécimen de SJ. Escala= 10 μm	80
Figura 53. Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en el proceso de germinación de quistes de <i>P. bahamense</i>	83
Figura 54. Cromatogramas de saxitoxina presente en cepa Pb7 obtenido a partir de análisis en HPLC-FD (A) detección de STX, (B) oxidación con solución de	

peróxido para observar con mayor amplitud el pico de STX, (C) estimación de STX a partir de la adición de estándar. 87

RESUMEN

Recientemente se comprobó que el rango de distribución del dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* se amplió al sur del Golfo de California y que cepas de la variedad *bahamense* aisladas de las costas de Florida, E.U.A. producen toxinas paralizantes. Estos hallazgos plantean interrogantes respecto al estatus taxonómico de la especie, actualmente dividida en dos variedades, así como de su toxicidad. Considerando lo anterior, se realizó un estudio morfométrico, fisiológico y toxicológico a 4 poblaciones de *P. bahamense* del sur del Golfo de California (San José, B.C.S., Yavaros, Son., El Colorado y La Reforma, Sin.). De cada población se midieron y fotografiaron los rasgos taxonómicos principales, tanto en células vegetativas como quísticas (n=100) utilizando microscopía de luz y electrónica de barrido.

Con fines comparativos se incluyó una muestra de células vegetativas reconocidas como variedad *compressum* de La Colorada, Oaxaca. Para medir el efecto de la temperatura (15-35°C), salinidad (15-35) y medios de cultivo (GSe, f/2 y agua de mar sin enriquecimiento) en la germinación de quistes, éstos fueron aislados (n=675) e incubados en ciclos de luz y oscuridad de 12:12 h. Se establecieron 15 cepas provenientes de San José, B.C.S y se corroboró la toxicidad con cromatografía líquida de alta resolución con derivatización pre-columna y detección de fluorescencia (HPLC-FD).

Las células vegetativas presentaron una importante variabilidad morfológica intra e interpoblacional. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ($\alpha= 0.05$). Los quistes son esféricos (43 a 56 μm) y están cubiertos de procesos tubulares tipo corado (~96), la pared celular es microgranulada e incolora, el epiquiste está dividido en paraplasas y el arqueópilo es epiquistal. Se presentó una mayor tasa de germinación a 25 y 30°C en los tres medios de cultivo, la temperatura mostró diferencias significativas en el proceso de germinación.

Con respecto a la salinidad aunque no se encontraron diferencias significativas, la mayor tasa de germinación se presentó a 25, 30 y 35. Confirmando que *P. bahamense* es una especie eurihalina.

Sólo una cepa presentó cualidades tóxicas, detectándose saxitoxina (STX) a una concentración por debajo del límite de detección. Los resultados de esta investigación sugieren que las características morfológicas y toxicológicas consideradas para separar a la especie en dos variedades no son adecuadas. Es necesario realizar estudios *in situ* e *in vitro* que definan el efecto de variables ambientales en la morfología y ciclo de vida de *P. bahamense*, así como profundizar en los estudios de la variabilidad genética y toxicológica de la especie a nivel regional y mundial.

Palabras clave: *Pyrodinium bahamense*, morfología y morfometría, germinación de quistes, saxitoxina, taxonomía

ABSTRACT

It has recently been shown that the geographical range of the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* has been extended to southern Gulf of California, and strains of the variety *bahamense* isolated from the coast of Florida produce paralytic shellfish toxins. These findings bring up new questions regarding the taxonomic status of this species, which is currently divided in two varieties, as well as its toxicity. A morphometric, physiological and toxicological study was performed with samples of four populations of *P. bahamense* from the southern Gulf of California (San José, B.C.S., Yavaros, Son. El Colorado, and La Reforma, Sin.).

The main taxonomic features of vegetative and cysts forms (n=100) were measured and photographed using light and scanning electron microscopy (SEM). For comparison, a sample of vegetative cells identified as variety *compressum* from La Colorada, Oaxaca was included. To measure the effects of temperature (15-35°), salinity (15-35) and culture media (GSe, f/2, and seawater without enrichment) on cysts germination, these were isolated (n=675) and incubated in a light-dark cycle of 12:12 h. In only 15 strains from San José, B.C.S. were established and toxicity was confirmed using High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection and pre-column derivatization (HPLC-FD).

Vegetative cells showed an important intra and interpopulation morphologic variability, but no significant differences among populations ($\alpha= 0.05$) were found. *Pyrodinium bahamense* cysts are spherical (43 a 56 μm) and covered with chorate-type tubular processes (~96), cyst wall is microgranulated and colorless, the epicyst is divided in paraplates and the archeopyle is epicystal. Highest germination rate occurred at 25 and 30°C in the three culture media. Temperature showed significant differences in the germination process.

With respect to salinity although there were no significant differences, the highest rates of germination was presented at 25 and 30. Confirming that *Pyrodinium bahamense* is an euryhaline species. Only one strain tests positive for saxitoxin (STX) but with a concentration below detection limit.

These results suggest that strains from this region have the potential to produce paralytic shellfish toxins. Morphologic and toxicological characteristics that are used to separate the species in two varieties are not suitable. It is necessary to carry out *in situ* and *in vitro* studies in order to define the effect of environmental variables in the morphology and life cycle of *P. bahamense*, and to intensify research on genetic and toxicological variability of the species at regional and global scales.

Key words: *Pyrodinium bahamense*, morphology and morphometry, germination of cysts, saxitoxin, taxonomy

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los florecimientos algales nocivos (FAN's), son provocadas por dinoflagelados tóxicos, de los géneros *Alexandrium*, *Amphidinium*, *Azadinium*, *Coolia*, *Cochlodinium*, *Dinophysis*, *Gambierdiscus*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa*, *Karenia*, *Karlodinium*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Protoceratium*, *Protoperidinium*, *Pyrodinium* y *Takayama* (Moestrup *et al.* 2009). Representantes de los géneros mencionados, pueden ocasionar daños severos a los ecosistemas y a la salud humana, debido a la capacidad de producir toxinas las cuales se transfieren en la cadena alimenticia, afectando los diferentes niveles tróficos (crustáceos, moluscos, peces y mamíferos, incluyendo el hombre) y en consecuencia provocan envenenamientos y muertes (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna 2003, Lefebvre *et al.* 2004, Kwong *et al.* 2006). Las causas de los FAN's pueden ser naturales y antropógenicas, de estas últimas destaca su relación con la eutrofización de las zonas costeras, el transporte de quistes y/o células vegetativas de una región a otra en el agua de lastre de embarcaciones, entre otras (Hallegraeff 2003).

El género *Pyrodinium* fue descrito por Plate (1906). Este dinoflagelado tecado actualmente está representado por dos variedades *P. bahamense* var. *bahamense* Plate y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester et Taylor (Steidinger *et al.* 1980). A la variedad *compressum* se le atribuyen problemas de salud y económicos a nivel mundial por ser la principal causante de muertes humanas por envenenamiento paralizante por consumo de mariscos, ya que produce los análogos de saxitoxina de mayor potencia tóxica (Azaña y Taylor 2001). Es por esto que la mayor parte de la información existente sobre taxonomía y toxicidad, se ha enfocado a esta variedad.

Se han establecido criterios morfológicos, morfométricos y toxicológicos para discriminar entre variedades (Steidinger *et al.* 1980, Azanza 1997, Badylak *et al.* 2004); sin embargo, existen inconsistencias ya que se han considerado como características conservativas la forma celular, la talla, así como la formación de cadenas, sin examinar las diferencias morfométricas que presentan las células en una misma población.

Es importante señalar que el rango de distribución de *P. bahamense* se ha extendido a zonas subtropicales del Golfo de California y que recientemente se comprobó toxicidad en cepas de la variedad *bahamense* (Landsberg *et al.* 2006). Por lo anterior, el propósito de este trabajo consistió en realizar un análisis taxonómico comparativo tanto del estadio vegetativo como quístico de poblaciones de *P. bahamense* del sur del Golfo de California, conocer el efecto de la temperatura, salinidad y diferentes medios de cultivo en el proceso de germinación de sus quistes, así como corroborar su toxicidad. Cabe mencionar que con fines comparativos se integró al análisis morfométrico una muestra de *Pyrodinium bahamense* reconocida como variedad *compressum* colectada en Oaxaca.

2. Antecedentes

Pyrodinium bahamense es considerada una especie marina tropical nerítica, con presencia en zona de manglares y se distribuye tanto en aguas tropicales, como subtropicales. La variedad *bahamense*, se distribuye comúnmente en el Océano Atlántico (Osorio-Tafall 1942, Steidinger *et al.* 1980, Balech 1985, Badylak *et al.* 2004, Faust *et al.* 2005). En México se ha registrado en costas del Golfo de México, desde Tamaulipas hasta Quintana Roo (Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992, Gómez-Aguirre 1998), en el Mar Caribe (Gómez-Aguirre y Licea 1998) y en las lagunas costeras del Golfo de California (Martínez-López *et al.* 2007, Alonso-Rodríguez *et al.* 2008, Morquecho 2008); mientras que la variedad *compressum* se distribuye principalmente en el Océano Indo-Pacífico (Steidinger *et al.* 1980), con registros en las costas del SE del Océano Pacífico de México y Centroamérica (Cortés Altamirano *et al.* 1993, Sotomayor-Navarro y Domínguez-Cuellar 1993, Ramírez-Camarena *et al.* 1996, Orellana-Cepeda *et al.* 1998, Fierro *et al.* 2002, Meave del Castillo *et al.* 2008).

En los estudios morfológicos realizados a *P. bahamense* (Steidinger *et al.* 1980, Balech 1985, Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992, Badylak *et al.* 2004, Morquecho 2008) generalmente se consideran como valores conservativos la longitud y el ancho de la célula; sin embargo, no han sido bien establecidas las características morfológicas para discriminar entre variedades. Otro criterio utilizado es la capacidad de producir toxinas, siendo la variedad *compressum*, la que produce los análogos más tóxicos que en orden de mayor a menor potencia son: STX NeoSTX, GTX-4, GTX-3, GTX-2, dcSTX, B1, B2 (Hallegraeff y Maclean 1989, Harada *et al.* 1982, Oshima *et al.* 1984, Gacutan *et al.* 1985, Tollervey 1989, Mata *et al.* 1990, Usup *et al.* 1994, Hummert *et al.* 1997, Orellana-Cepeda *et al.* 1998, Azanza y Taylor 2001, Landsberg *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007, Azanza *et al.* 2010, Wiese *et al.* 2010).

En México a *P. bahamense* var. *compressum* se le ha relacionado con 560 intoxicaciones y 38 defunciones por consumo de moluscos contaminados por toxinas paralizantes (Sierra-Beltrán *et al.* 1998, INP-SAGARPA 2004). Los brotes de intoxicación sucedieron en Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, presentándose el 95% de estos casos en la región del Golfo de Tehuantepec (Cortés-Altamirano *et al.* 1993, Orellana-Cepeda *et al.* 1998, Fierro *et al.* 2002, Hernández-Becerril *et al.* 2007, Meave del Castillo *et al.* 2008). En Oaxaca, los florecimientos han alcanzado máximos de hasta 1.7 millones de céls. L⁻¹ y una toxicidad de hasta 7,309 µg STX eq 100 g⁻¹ (Cortés Altamirano *et al.* 1993).

A la variedad *bahamense* por más de 20 años se le consideró inocua, sin embargo Landsberg *et al.* (2006), confirmaron la producción de toxinas paralizantes en cepas aisladas de Florida, cuyo perfil se caracterizó por la presencia de STX, dcSTX y toxina B1. Estos resultados proponen reconsiderar las ideas de Balech (1985), quien al realizar un estudio morfológico detallado con células colectadas de diferentes localidades del mundo, argumentó que las diferencias morfológicas encontradas no justifican la separación del taxón en dos variedades y que estas se deben a factores ambientales. No obstante, la consistencia de estas diferencias en células analizadas del Atlántico e Indo-Pacífico, durante estos años ha mantenido el estatus taxonómico de separación en dos variedades (Steidinger *et al.* 1980, Badylak *et al.* 2004).

Pyrodinium bahamense es una especie meroplanctónica, es decir, parte de su ciclo de vida se encuentra como forma vegetativa en el plancton y al realizarse la reproducción sexual, se producen quistes de resistencia que son depositados en el sedimento. El nombre palinológico del quiste actual del dinoflagelado *P. bahamense* es *Polysphaeridium zoharyi* el cual fue descrito a partir de quistes fósiles (Rossignol 1962, Wall y Dale 1969).

El quiste es esférico (43 a 70 μm) y está cubierto de numerosos procesos tubulares (~ 60), algunos bifurcados o fusionados desde la base, el perifragma es de tipo granular y el endofragma es liso (Wall y Dale 1969, Fukuyo *et al.* 2004). El arqueópilo tiene una fórmula paratabular 2A + 6P (Wall y Dale 1969) y es de tipo epiquistal (McLean 1976, Bujak *et al.* 1980, Fukuyo *et al.* 2004). El citoplasma es microgranular y suele presentarse un cuerpo rojo con un diámetro de 10 a 15 μm .

Los quistes de *P. bahamense* se han encontrado en el SE asiático, el Caribe y el SO de Europa y datan del Eoceno (McMinn 1989, Amorim y Dale 1997). Wall y Dale (1969) concluyeron que este taxón presenta un patrón ecológico restringido, principalmente en ambientes con circulación limitada y condiciones de temperatura y salinidad elevadas. Sin embargo, Rossignol (1962) considera que los quistes de *P. bahamense* pueden ser utilizados como indicadores de ambientes de baja salinidad.

En México, los quistes de *P. bahamense* se distribuyen en la costa occidental y al sur del Golfo de California (Martínez-Hernández y Hernández-Campos 1991) y recientemente se han encontrado en Bahía de Todos Santos, B.C. (Peña-Manjarréz *et al.* 2005), al norte de Bahía de La Paz, B.C.S. (Morquecho-Escamilla 2007) y en sedimentos pre-industriales (desde 1900) del Golfo de Tehuantepec (Limoges *et al.* 2008, Vásquez-Bedoya *et al.* 2008).

Wall y Dale (1969) establecieron que a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y salinidad de 35.7 el intervalo de desenquistamiento de *P. bahamense* es de 2 a 15 días. Corrales *et al.* (1995) proponen un periodo de dormancia de 2.5 a 3 meses. Mientras que Sakamoto *et al.* (2006) observaron que el proceso de enquistamiento, se produce aproximadamente en 35 días a una temperatura de 30°C ; mientras que el desenquistamiento se presenta entre los 2.5 y 5 meses, en las mismas condiciones de temperatura.

3. Justificación

Actualmente el taxón *Pyrodinium bahamense* está dividido en dos variedades: *P. bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester et Taylor, y *P. bahamense* var. *bahamense* Plate. La variedad *compressum* es productora de toxinas paralizantes y ha ocasionado serios problemas de salud en México. La variedad *bahamense* es considerada inocua, sin embargo recientemente se comprobó la producción de toxinas paralizantes en cepas aisladas de las costas de Florida (Landsberg *et al.* 2006). Asimismo, la variedad *bahamense* ha extendido su rango de distribución a zonas subtropicales del sur del Golfo de California (Martínez-López *et al.* 2007, Alonso-Rodríguez *et al.* 2008, Morquecho 2008, Gárate-Lizárraga y González-Armas 2011). Por esto, la presente investigación tiene como objetivos: a) realizar un estudio taxonómico comparando especímenes tanto del estadio vegetativo como quístico de diferentes localidades del sur del Golfo de California, b) aportar información sobre el efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en el proceso de germinación de sus quistes, y c) corroborar su toxicidad. Los resultados de esta investigación brindarán información taxonómica, biológica y toxicológica que podrá servir de base para definir impactos potenciales y optimizar los planes de manejo de esta zona.

4. Hipótesis

- Las características morfológicas de las poblaciones de *Pyrodinium bahamense* del sur del Golfo de California y la del Golfo de Tehuantepec, son diferentes.
- Las poblaciones de *Pyrodinium bahamense* del sur del Golfo de California producen toxinas paralizantes.
- La tasa de germinación de quistes de *Pyrodinium bahamense*, muestra diferencias significativas cuando se cultivan en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y medios de cultivo.

5. Objetivos

Objetivo general

Analizar la situación taxonómica de *P. bahamense* del sur del Golfo de California, a partir de la caracterización morfométrica, biológica y toxicológica de las poblaciones, para evaluar si existen elementos suficientes que sustenten la presencia de las dos variedades.

Objetivos particulares

- Comparar las poblaciones de *P. bahamense* del sur del Golfo de California mediante un análisis morfométrico del estadio vegetativo.
- Comparar las características morfológicas y taxonómicas de las poblaciones de *P. bahamense* del sur del Golfo de California con organismos de una localidad del Golfo de Tehuantepec, reconocidos como variedad *compressum*.
- Describir la morfología y las características taxonómicas de los quistes de *P. bahamense* del SE de Isla San José, B.C.S.
- Definir el efecto de la temperatura, salinidad y de los medios de cultivo f/2 y GSe, en la tasa de germinación de quistes de *P. bahamense* aislados de Isla San José, B.C.S.
- Corroborar la producción de toxinas paralizantes en una población de *P. bahamense* del sur del Golfo de California.

6. ÁREA DE ESTUDIO.

El Golfo de California es una cuenca marina alargada con una superficie aproximada de 150,000 km². Se localiza en el noroeste de México, entre 22° y 32°N y 105° y 117°O. El clima es árido con grandes cambios de temperatura diurnos y estacionales, alta evaporación e intensa radiación. La topografía es compleja, con valles y cañones submarinos de más de 2,000 m de profundidad, ventilas hidrotermales y zonas de surgencia (en la costa occidental se desarrollan en el verano y en la oriental durante el invierno). El Golfo de California es considerado un área de transición entre las regiones biogeográficas tropical y templada, característica que ha favorecido una gran biodiversidad con un importante número de casos de endemismos (INE-SEMARNAP 2000).

El Golfo de Tehuantepec constituye una intrusión del mar de gran extensión en sureste del Pacífico Mexicano. Su ubicación geográfica es delimitada por las coordenadas 14° y 16°N y 92° y 95°O. Esta región se encuentra dentro de la zona tropical, con un clima húmedo y abundantes lluvias (Tamayo 1991). En el verano está afectado por alteraciones atmosféricas tropicales que ocasionan lluvias abundantes a lo largo de la costa y en el invierno fuertes vientos, los cuales son originados por masas de aire continental polar. Las arenas son los sedimentos más abundantes y la profundidad del Golfo oscila entre los 30 y 100 m (Morales de la Garza y Carranza-Edwards 1995).

Los sitios de muestreo corresponden a zonas con antecedentes de la presencia del dinoflagelado sujeto a estudio (**Figura 1**) (Martínez-López *et al.* 2007, Alonso-Rodríguez *et al.* 2008, Morquecho 2008). Las características de dichas zonas se encuentran en la **Tabla 1** y de las cuales ya se contaba con muestras de fitoplancton y sedimento marino.

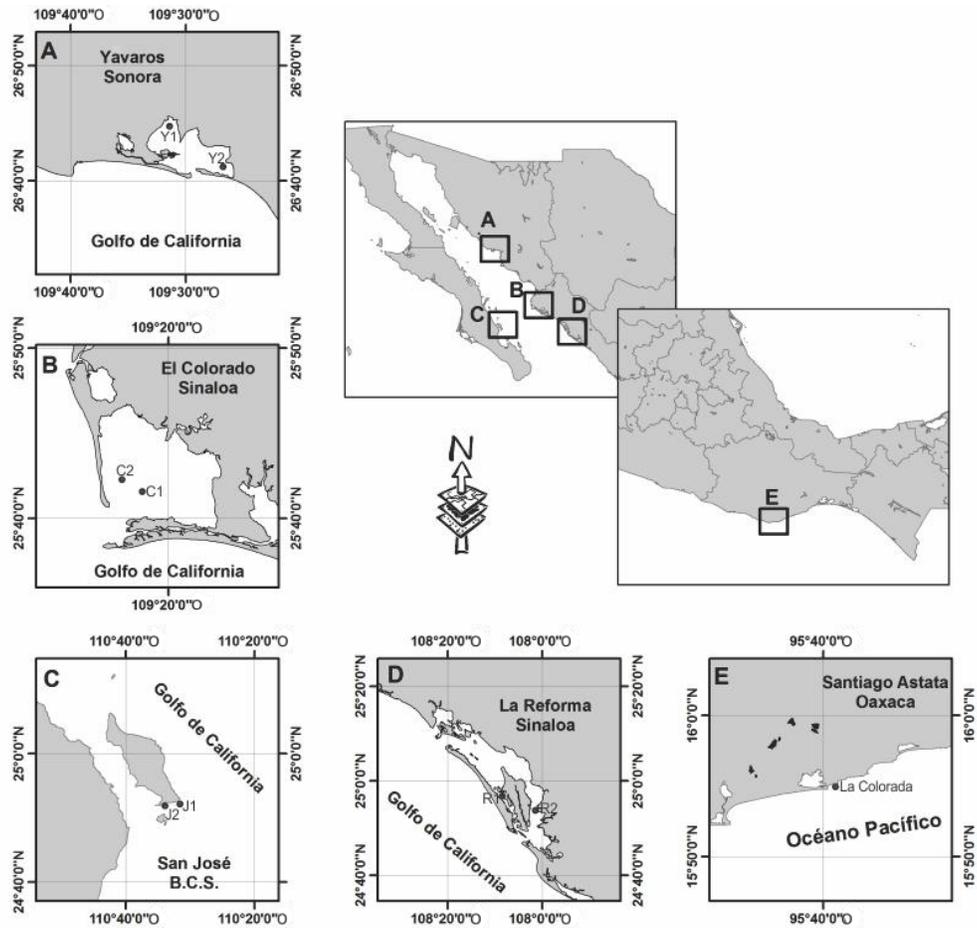


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo (Isla San José, B.C.S.; laguna de Yavaros, Sonora; laguna El Colorado, Sinaloa; laguna de La Reforma, Sinaloa; playa La Colorada, Oaxaca).

Tabla 1. Características de los sitios de muestreo

LOCALIDAD	TIPO DE ZONA	PROFUNDIDAD MEDIA	TIPO DE SEDIMENTO	RASGO	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD	NUTRIENTES	ACTIVIDADES HUMANAS	REFERENCIAS
SAN JOSÉ, B.C.S.	Isla	18 m	Arenas finas a medias	Zona de manglar	22 - 26	36		Ecoturismo	UNAM-Secretaría de Gobernación 1998; Carmona-Piña 2007; Morquecho 2008
YAVAROS, SONORA	Laguna costera tipo II-A	2 m	Arenas muy finas a medias	Zona de manglar	16.7 – 31.3	7.5 – 36.4	N y P (80 ton año ⁻¹)	Agricultura camaronicultura	Martínez 1970; Ayala <i>et al.</i> 1980
EL COLORADO, SINALOA	Laguna costera tipo II-A	1.5 m	Arenas finas a medias	Zona de descarga del río Fuerte	25 - 39	29 – 35	N 1.56 µM (verano) y 0.81 µM (otoño)	Agricultura camaronicultura	Lankford 1977; Escobedo-Urias 2004; Páez <i>et al.</i> 2007; Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> 2008
LA REFORMA, SINALOA	Laguna costera tipo III-A	7 m	Arenas medias y finas	Manglares, marismas, vegetación halófila	24-41	20 – 80	N (76 ton año ⁻¹) P (26 ton año ⁻¹)	Pesca, agricultura, camaronicultura y actividades cinegéticas	Lankford 1977; Páez <i>et al.</i> 2007; Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> 2008
LA COLORADA, OAXACA	Playa rocosa	1 m	Arenas medias	Zona de manglar	12-42	125 – 360	Zona oligotrófica	Deposito evaporador de salmueras	Secretaría de Pesca 1990

7. METODOLOGÍA

7.1 Colecta de fitoplancton y sedimento marino

Las muestras para el desarrollo de este trabajo fueron colectadas con anterioridad a este estudio (**Tabla 2**). Con fines comparativos se incluyó una muestra colectada en playa La Colorada, Oaxaca de células vegetativas identificadas como *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. Las muestras de fitoplancton se obtuvieron con red (20 µm de poro) y fueron fijadas con una solución de lugol (Thronsdén 1978). Las muestras de sedimento marino superficial se colectaron mediante buceo autónomo, se sellaron herméticamente, se protegieron de la luz, y se almacenaron en un cuarto de cultivo ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta su análisis.

Tabla 2. Muestras colectadas para el análisis morfométrico y el ensayo de germinación de quistes.

Localidad	Fecha de colecta	Muestras de fitoplancton	Sedimento marino superficial
Isla San José, B.C.S.	septiembre, 2008	4	4
Yavaros, Son.	septiembre, 2008	13	1
El Colorado, Sin.	junio, 2009	3	1
Reforma, Sin.	septiembre, 2008	3	--
La Colorada, Oax.	diciembre, 2009	3	--

7.2 Análisis morfométrico de células vegetativas y quísticas

7.2.1 Microscopía de luz

Las formas vegetativas y quísticas de *P. bahamense* se observaron, midieron y fotografiaron usando un microscopio compuesto (Olympus BX41), un microscopio invertido (Carl Zeiss, Axiovert 100) y el sistema de análisis de imágenes Media Cybernetics (software Image-Pro Plus 4.1, EUA). De cada una de las localidades se seleccionaron las muestras que contenían las mayores abundancias del dinoflagelado sujeto a estudio y se midieron 100 especímenes de cada muestra, considerando todos los rasgos morfométricos enlistados en la **Tabla 3**. Para definir la fórmula tabular de las células vegetativas, se aplicó el método de disección de la teca, las células se aislaron con una micropipeta y se trataron con solución de 1:1 de hipoclorito de sodio y agua destilada (Lebour 1925).

En el caso de las células quísticas, se utilizó una alícuota de 1 g de sedimento marino superficial para concentrar los quistes con el método propuesto por Matsuoka *et al.* (1989) y Matsuoka y Fukuyo (2000). Este método consiste en periodos de ultrasonicación (5 min.) y lavados sucesivos de la fracción $\geq 20 \mu\text{m}$, con agua de mar filtrada. Las muestras de quistes limpios, se almacenaron en viales de 10 mL y mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su análisis y registro fotográfico con microscopía de luz.

Para la descripción de la morfología de las células quísticas de *P. bahamense*, se consideraron los trabajos de Wall y Dale (1969), McLean (1976), Bujak *et al.* (1980) y Fukuyo *et al.* (2004).

Se realizó un registro fotográfico de quistes vacíos y con contenido citoplasmático; para la definición del número de procesos, se utilizaron imágenes de quistes vacíos fragmentados por la mitad (n=50) que se obtuvieron con microscopía de luz y electrónica, asumiendo que los quistes presentan el mismo número de procesos en ambos lados, se contaron los procesos visibles, fueron multiplicados por dos y los valores fueron promediados.

Tabla 3. Rasgos morfológicos de la forma vegetativa y quística de *Pyrodinium bahamense* considerados en el análisis morfométrico.

Forma vegetativa	Forma quística
Longitud con cuerno apical y espinas antapicales	Diámetro
Longitud con cuerno apical sin espinas antapicales	Tipo y longitud de los procesos
Longitud sin cuerno apical	Color (intensidad) y posición del cuerpo rojo
Diámetro de la célula (incluyendo velos cingulares)	Tipo de arqueópilo
Transdiámetro	Color y número de capas de la pared celular
Longitud del cuerno apical	Color y aspecto del citoplasma
Longitud de la espina apical	
Longitud de la espina antapical izquierda	
Desplazamiento del cíngulo	
Relación o proporción entre la longitud-ancho	
Presencia de denticulación en las tecas	
Diámetro del poro ventral y de los poros de tricocistos	
Células individuales o formación de cadenas	

7.2.2 Microscopía electrónica de barrido

Se realizó un análisis con microscopía electrónica de barrido, para examinar y obtener fotografías a detalle de los rasgos morfológicos de las formas vegetativas y quísticas de las poblaciones de *P. bahamense*. Las células vegetativas y de quistes de cada una de las localidades se concentraron en membranas de policarbonato (13 mm de diámetro y 8 μm de tamaño de poro) y se montaron en un portafiltros. Para remover el fijador, las células fueron sometidas a un lavado utilizando solución de Tritón (0.1%) y un gradiente salino decreciente (35, 25, 15, 5 y 0). El lavado se realizó por gravedad montando los portafiltros en jeringas de 10 mL. Una vez removido el fijador, los filtros se sometieron a un proceso de deshidratación gradual, utilizando etanol a diferentes concentraciones (30, 50, 70, 90 y 100%) (Fritz y Triemer 1985, Boltovskoy 1995, Mason *et al.* 2003).

Posteriormente la membrana se secó a punto crítico con un equipo Samdri (modelo PVT3B) y se recubrieron con paladio en un evaporador de metales Denton Vacuum Desk II. Finalmente los filtros se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi (modelo S-3000N) y las imágenes digitales se obtuvieron con el software Cuarzo PCI 5.0.

Como guía de identificación y para realizar el análisis taxonómico comparativo se utilizaron los siguientes trabajos: Osorio-Tafall (1942), Rosignol (1962), Wall y Dale (1969), McLean (1976), Steidinger *et al.* (1980), Balech (1985), Taylor y Fukuyo (1989), Martínez-Hernández y Hernández-Campos (1991), Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril (1992), Peña-Manjarréz *et al.* (2005), Badylak *et al.* (2004), Martínez-López *et al.* (2007), Limoges *et al.* (2008), y Morquecho (2008).

7.3 Ensayo de germinación de quistes de *Pyrodinium bahamense* del SE de la Isla San José

Para el ensayo de germinación se aislaron 675 quistes llenos de *P. bahamense*. Los quistes con contenido citoplasmático fueron aislados con micropipeta y se inocularon individualmente en placas multipozo estériles de 48 pocillos, previamente llenadas con medio f/2 (Guillard y Ryther 1962), GSe (Doblin *et al.* 1999) y agua de mar sin enriquecimiento. Los medios de cultivo se prepararon con agua de mar filtrada variando la salinidad (15, 20, 25, 30 y 35). Las placas se mantuvieron en una incubadora con gradiente de temperatura (modelo RIT-450, REXMED Industries Co., Ltd., Taiwan) a 15°, 20°, 25°, 30° y 35°C, ciclos de luz-obscuridad de 12:12 h, e intensidad lumínica promedio de 3,894 luxes. Las placas se examinaron diariamente con un microscopio invertido (Axiovert 100, Carl Zeiss), para observar el tiempo y condiciones de germinación. Los pocillos que presentaron multiplicación de células vegetativas se transfirieron a tubos estériles de 10 mL y se escalaron gradualmente agregando el medio de cultivo correspondiente con la finalidad de obtener la biomasa suficiente para las pruebas de toxicidad, posteriormente los cultivos se concentraron en filtros Whatman GF/F y se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta su análisis.

7.4 Análisis de toxinas paralizantes

Se realizó el análisis de toxinas a 6 cepas de *P. bahamense*, establecidas a partir de células vegetativas (PBJV-1, 2, 3, 4, 5, 6) y a 9 cepas obtenidas mediante germinación de quistes (Pb-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

La determinación de toxinas paralizantes se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con oxidación pre-columna y detección de fluorescencia (HPLC-FD), utilizando soluciones de periodato y peróxido de hidrógeno y considerando el método oficial AOAC 2005.06 (2005) y Lawrence *et al.* (2005). Los análisis se realizaron en un equipo HPLC marca Varian integrado con los siguientes módulos: a) bomba cuaternaria (Prostar 220); b) automuestreador (Prostar 410); c) columna (Gemini C18 de 150 x 4.6 mm, 5µm); y d) detector de fluorescencia (Prostar 363). Los resultados obtenidos se procesaron con el software Galaxie 1.9 multi-instrumentos. Los estándares de referencia certificados fueron adquiridos en National Research Council (NRC) de Canadá y utilizados para la detección y cuantificación de las siguientes toxinas: GTX 2-3, GTX 5-b, C1-2, dcGTX 2-3b, dcNEO-b, dcSTX, GTX 1-4c, NEO-c, STX-e.

Para el análisis, se procesaron los filtros en los cuales previamente se concentraron los cultivos, a partir de un volumen de cultivo de 14.8 a 100 mL. Se realizó una doble extracción adicionando a cada filtro 3 mL de ácido acético al 1% e incubó a 100°C durante 5 min. Posteriormente se aplicó un baño frío, agitación en vortex y dos ciclos de centrifugación a 4500 rpm durante 10 min. (Mod. 708 Biologics Inc.). El sobrenadante se recuperó y aforó a 10 mL con agua Milli-Q. Se realizó la limpieza del extracto de las muestras, utilizando un cartucho SPE-C18 (intercambiador iónico fuerte), previamente acondicionado con metanol-agua, al que se le agregó 1 mL de extracto y 2 mL de agua para lavar el cartucho.

El extracto limpio se colectó en un tubo de centrifuga; se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 1M y se aforó a 4 mL con agua Milli-Q. Finalmente se realizó la oxidación pre-columna de la muestra utilizando 100 µL del extracto limpio y 500 µL de solución de periodato, para llevar a cabo el análisis cualitativo de las toxinas presentes en cada uno de los extractos.

En caso que en el análisis cualitativo se presenten toxinas no hidroxiladas (STX, dcSTX, GTX-2, GTX-2, GTX-4, B1, C1, C2), se realiza una oxidación pre-columna con solución de peróxido para su cuantificación. La detección de fluorescencia se determinó a 340 nm de excitación y 395 nm de emisión. El volumen inyectado al cromatógrafo fue de 30 µL de extracto. Se aplicó un gradiente de dos soluciones (Sol. A y B ver anexo) con un flujo de 2 mL min.⁻¹ y el tiempo total de análisis fue de 12 min por muestra.

Debido a que en la muestra Pb-7 se identificó saxitoxina (STX), se realizó nuevamente la oxidación con solución de peróxido. Debido a su baja concentración se adicionó estándar de STX a una concentración de 0.05 µg mL⁻¹. Se corroboró la identificación de dicho análogo considerando el tiempo de retención y el área bajo la curva que presentó el extracto con respecto al estándar. La concentración del análogo identificado se cuantificó utilizando la fórmula propuesta por Lawrence *et al.* (2005):

$$\text{Concentración de toxinas PSP } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{Kg}} \right) = \frac{A_x * C_s * V_x * D * 1000}{A_s * M}$$

Donde:

A_x = Área del pico de la toxina en el extracto analizado

C_s = Concentración del estándar (µg/mL)

V_x = Volumen final del extracto analizado (mL)

A_s = Área del pico del estándar más cercano

D = Factor de dilución

M = Cantidad de muestra (g) utilizada en el procedimiento de limpieza

1000 = Factor de conversión (µg/Kg)

7.5 Análisis de datos

Para conocer la dispersión de los datos obtenidos del análisis morfométrico de las células vegetativas, se utilizó estadística descriptiva y se realizó una representación gráfica considerando el valor de la mediana de cada una de las características de las localidades de estudio; donde la caja central indica el intervalo en el cual se encuentra el 50% de los datos y los extremos de dicha caja delimitan el 95% de los datos de cada una de las poblaciones. A partir de los resultados de la estadística descriptiva, se consideró aplicar una prueba de excentricidad de la elipse, la cual consiste en obtener la relación entre el diámetro menor y mayor utilizando los valores conservativos de la célula, es decir, la longitud sin cuerno y el transdiámetro de la misma.

A los datos se les aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y no presentaron una distribución normal, por lo que se utilizó estadística no paramétrica, aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía mediante la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar si existen diferencias significativas entre las poblaciones del sur del Golfo de California con respecto a la población del Golfo de Tehuantepec. Debido a que se identificaron diferencias significativas entre las poblaciones, se realizó la prueba *a posteriori* de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (Zar 1999).

Para conocer el efecto de la temperatura, la salinidad y los medios de cultivo en la tasa de germinación de los quistes, se empleó una prueba de análisis de varianza de dos vías-Para evaluar las diferencias significativas encontradas en el análisis, se realizó una *prueba a posteriori* de Bonferroni (Zar 1999).

Los análisis se realizaron con el programa EXCEL (v. 2010, Microsoft Office) y con el software Graph Pad Prism 5.0, San Diego, California, EUA.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis morfométrico de células vegetativas.

Los datos obtenidos del análisis morfométrico de células vegetativas de *P. bahamense* se resumen en la **Tabla 4** y la **Figura 2** donde se muestra de forma gráfica la dispersión y tendencia que presentó cada una de las características consideradas, mostrando las diferencias morfométricas inter e intrapoblacionales, exponiendo la disimilitud que existe en las poblaciones de estudio.

Las células de las poblaciones analizadas presentaron diferencias en características como son: la altura de la espina antapical (*Ea*) y del cuerno apical (*Ca*), la prominencia de la espina antapical izquierda (*Ea_l*), así como la formación de cadenas de 4 y 2 células (**Lámina 1, Figuras 3-10**). La descripción morfológica de las poblaciones analizadas es la siguiente:

8.1.1 *Pyrodinium bahamense* de la Isla San José, B.C.S.

Las células de *P. bahamense* de Isla San José, B.C.S. (**Lámina 2 SJ, Figuras 11-16**) se encontraron principalmente en forma solitaria y en menor proporción formando cadenas de 2 o 4 células (**Figura 5**). Las células son redondeadas con la epiteca e hipoteca de tamaño similar, con arreglo tabular: Po, cp, 4□, 6□ □, 6c, ?s, 6□ □ □, 2□ □ □ □. En algunas células se observó una ligera curvatura en la espina apical (**Figura 3**), el cuerno apical de forma alargada (**Figura 11**) y la espina antapical izquierda prominente en la mayoría de las células analizadas (**Figuras 11-12**). Las crestas formadas por la unión de las placas son prominentes y los poros tricocistos presentan una distribución uniforme en la teca (**Figura 12**). El complejo del poro apical tiene forma pentagonal, presenta 13 poros en la placa *Po*, la placa *cp* tiene forma de coma, el poro ventral localizado en la placa 4□ sólo fue observado en algunos organismos.

La placa 1□ es alargada hacia la zona apical. El arreglo y número de las placas sulcales no se determinó; sin embargo, se logró diseccionar y separar la placa sulcal posterior, el poro posterior no fue consistente en los ejemplares analizados (**Figura 14**).

8.1.2 *Pyrodinium bahamense* de la laguna de Yavaros, Son.

Las células de *P. bahamense* de la laguna de Yavaros, Son. (**Lámina 3 YA, Figuras 17-22**), se encontraron básicamente en forma solitaria y escasas cadenas de 2 células. Las células son redondeadas, con epiteca e hipoteca de tamaño similar, el arreglo tabular es: Po, cp, 4□, 6□□, 6c, ?s, 6□□□, 2□□. Los poros tricocistos presentan una distribución uniforme en la teca, el cuerno apical de forma alargada y redondeada en la parte superior. La espina apical presenta una ligera curvatura en algunos ejemplares, mientras que la curvatura de la espina antapical izquierda es consistente en todos los ejemplares. Las espinas apical y antapical prominentes en la mayoría de las células analizadas (**Figuras 6, 17, 18**). El complejo del poro apical con forma triangular, la placa en forma de coma, la mayoría de los especímenes presenta un poro ventral en la placa 4□. La placa 1□ es de forma rectangular. No fue posible diseccionar el área sulcal, sólo se logró observar la placa sulcal posterior, la presencia del poro posterior no fue consistente en la mayoría de los ejemplares analizados (**Figura 20**).

Tabla 4. Características morfométricas de las células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* n=100 X ± desvest. (intervalo)

Característica (µm)	SAN JOSE, B.C.S.	YAVAROS, SONORA	EL COLORADO, SINALOA	LA REFORMA, SINALOA	LA COLORADA, OAXACA
Longitud con cuerno apical y espinas apical y antapicales	63.74±5.95 (48.73-84.64)	80.02±11.3 (51.30-107.73)	68.25±6.91 (53.43-89.77)	59.38±11.64 (41.04-110.29)	68.84±9.12 (48.73-100.03)
Longitud con cuerno apical sin espinas apical y antapicales	43.14±5.04 (30.78-56.43)	53.48±6.01 (41.04-74.38)	48.38±4.52 (38.47-58.99)	44.58±8.20 (30.78-79.51)	49.84±6.26 (38.47-66.69)
Longitud sin cuerno apical	39.27±5.28 (25.65-51.30)	43.12±6.16 (30.78-64.12)	41.66±4.88 (30.78-53.87)	39.22±7.49 (25.65-71.82)	44.10±6.07 (33.35-59)
Diámetro (incluyendo velos cingulares)	53.84±5.77 (38.47-74.38)	69.41±7.59 (41.04-84.64)	59.76±6.04 (46.17-76.95)	48.92±9.07 (33.34-82.08)	62.38±7.24 (48.73-84.64)
Transdiámetro	46.76±5.02 (33.34-61.56)	52.81±6.72 (35.91-71.82-)	50.94±4.91 (38.47-64.12)	42.30±7.99 (28.21-69.25)	56.21±7.85 (26.33-76.95)
Longitud del cuerno apical	3.87±1.53 (2.56-7.69)	10.36±3.77 (2.56-17.95)	6.72±2.30 (2.56-12.82)	5.36±1.97 (2.56-12.82)	5.74±1.21 (2.56-7.69)
Longitud de la espina apical	7.71±2.16 (4.05-12.82)	16.05±4.35 (7.69-25.65)	10.87±2.80 (5.13-17.95)	10.28±2.95 (2.56-17.95)	4.90±0.89 (2.56-7.69)
Longitud de la espina antapical izquierda	20±3.66 (15.39-28.21)	20.11±4.68 (5.13-30.78)	17.38±1.12 (5.13-10.26)	10.75±3.90 (2.56-25.62)	15.44±3.79 (7.69-28.21)
Desplazamiento del cíngulo	7.66±0.26 (5.13-7.69)	7.69±1.84 (5.13-12.82)	7.95±1.12 (5.13-10.26)	8.30±1.42 (5.13-12.82)	7.64±0.36 (5.13-7.69)
Relación longitud sin cuerno apical - transdiámetro	0.73±0.09 (0.55-1.00)	0.62±0.09 (0.47-0.90)	0.70±0.09 (0.52-0.95)	0.81±0.10 (0.58-1.15)	0.71±0.08 (0.56-0.95)

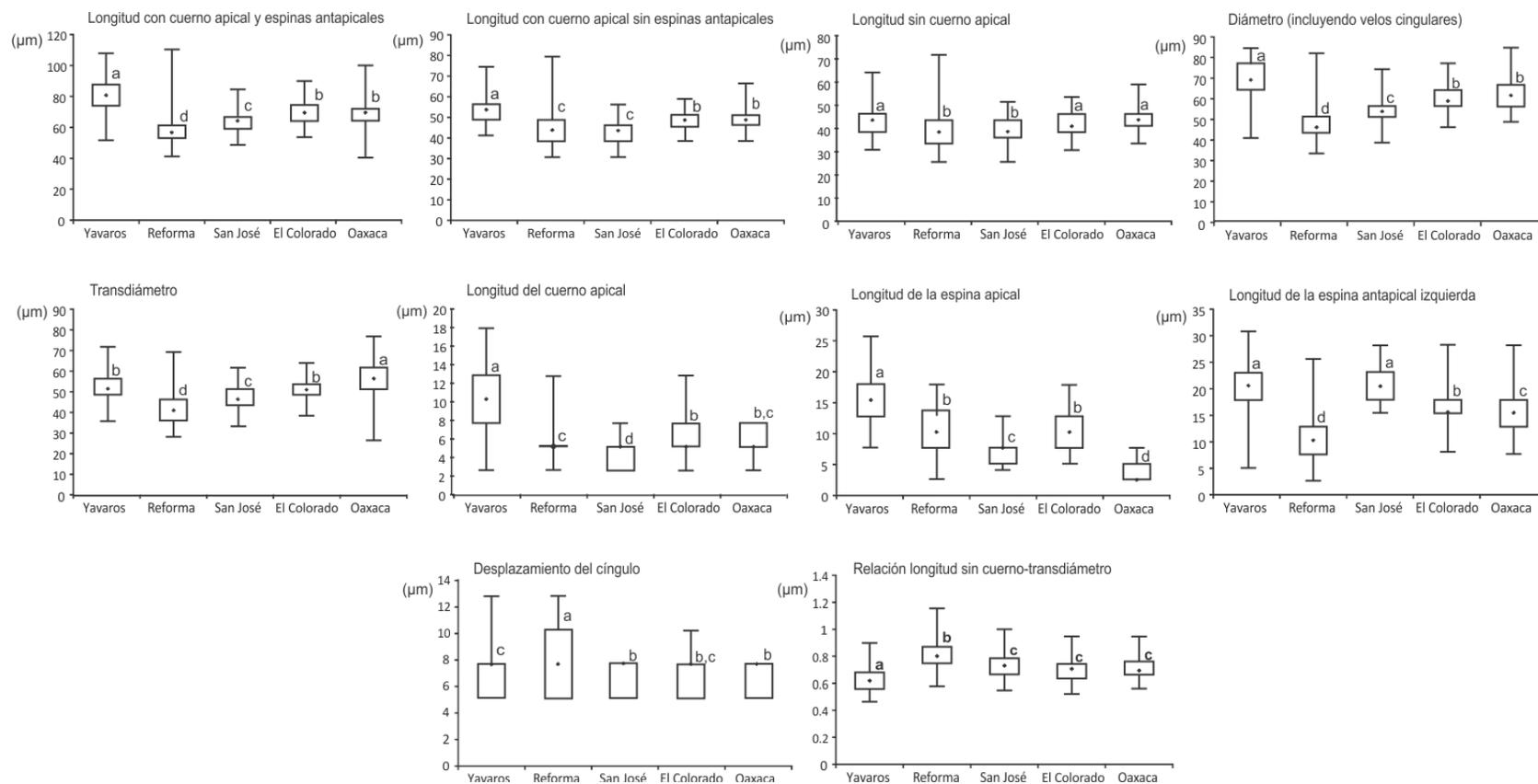


Figura 2. Dispersión y tendencia de los caracteres morfométricos de células vegetativas de las poblaciones de *Pyrodinium bahamense* (letras iguales a, b, c, y d. indican similitud en el valor de la mediana de cada población).

8.1.3 *Pyrodinium bahamense* de la laguna El Colorado, Sin.

Las células de *P. bahamense* de la laguna El Colorado, Sin. (**Lámina 4 EC, Figuras 23-28**) se encontraron principalmente de forma solitaria y en menor proporción en cadenas de 2 células. Las células son redondeadas, con la epiteca e hipoteca de tamaño similar, el arreglo tabular es: Po, cp, 4□, 6□□, 6c, ?s, 6□□□, 2□□□. Los poros tricocistos están homogéneamente distribuidos en la teca, el cuerno apical es alargado y redondeado en la parte superior (**Figuras 23, 24, 27**). La espina apical presenta una ligera curvatura en la mayoría de los ejemplares analizados, mientras que las espinas apical y antapical son prominentes. Los especímenes presentan un poro ventral en la placa 4□, la placa 1□ es reducida en la parte superior. El número y arreglo de las placas sulcales no fue determinado, el poro posterior se observó solo en algunos ejemplares analizados (**Figura 26**). Se logró separar la placa sulcal posterior con la técnica de disección de la teca (**Figura 28**).

8.1.4 *Pyrodinium bahamense* de la laguna de La Reforma, Sin.

Las células de la laguna de La Reforma, Sin., se encontraron de forma solitaria. Las células son redondeadas, la epiteca e hipoteca presentan un tamaño similar, el arreglo tabular es: Po, cp, 4□, 6□□, 6c, ?s, 6□□□, 2□□, los poros tricocistos mostraron una distribución uniforme en la teca. El cuerno apical alargado, la espina apical es reducida en la mayoría de las células analizadas, la espina antapical es prominente.

8.1.5 *Pyrodinium bahamense* de la playa La Colorada, Oax.

Las células de *P. bahamense* de la playa La Colorada, Oax. (**Lámina 5 LC, Figuras. 29-34**), se encontraron en su mayoría de forma solitaria y formando cadenas de 2 células (**Fig. 8-10**). Las células son de forma ovalada, la epiteca e hipoteca presentan un tamaño similar con arreglo tabular: Po, cp, 4□, 6□ □, 6c, ?s, 6□ □ □, 2□ □ □ la placa 1□ es reducida en la parte superior y los poros tricocistos son uniformemente distribuidos en la teca (**Figura 30**). El cuerno apical es alargado y redondeado en la parte superior y la espina antapical izquierda es prominente. El complejo del poro apical tiene una forma ovalada con 13 poros alrededor de la placa Po, la placa cp tiene forma de coma y el poro apical presenta una abertura prominente. Los ejemplares muestran un poro ventral en la placa 4□. No fue posible diseccionar el área sulcal, las células analizadas presentan el poro posterior (**Figura 32**).

LÁMINA 1. Células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* de la Isla San José, B.C.S. (SJ, Figuras 3-5), laguna de Yavaros, Son. (YA, Figura 6), laguna El Colorado, Sin. (EC, Figura 7), y playa La Colorada, Oax. (LC, Figuras 8-10). Fotografías tomadas con microscopio de luz.

Figura 3. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de SJ. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical. Escala=20 μ m.

Figura 4. *Pyrodinium bahamense* en vista dorsal, mostrando la prominencia de la espina antapical izquierda (*Eai*). Espécimen de SJ. Escala= 20 μ m.

Figura 5. *Pyrodinium bahamense* formado una cadena de cuatro células. Especímenes de SJ. Escala= 10 μ m.

Figura 6. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de YA. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μ m.

Figura 7. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de EC. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μ m.

Figura 8. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de LC. *Ca*- cuerno apical. Escala= 20 μ m.

Figura 9. *Pyrodinium bahamense* en vista lateral, mostrando la prominencia de la espina antapical izquierda (*Eai*). Espécimen de LC. Escala= 20 μ m.

Figura 10. *Pyrodinium bahamense* formando una cadena de dos células. Especímenes de LC. Escala= 20 μ m.

LÁMINA 1

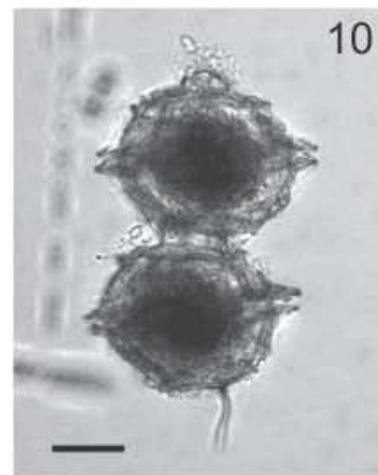
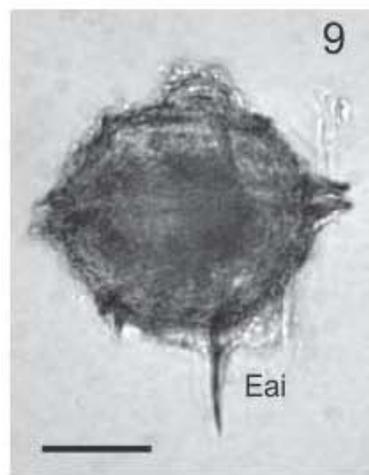
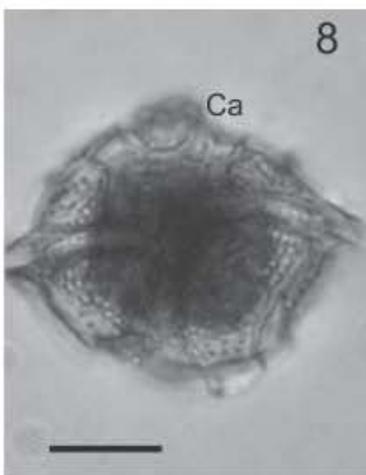
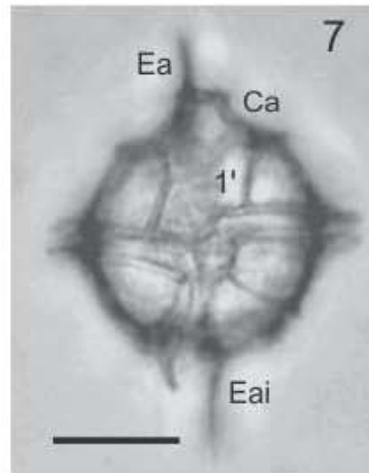
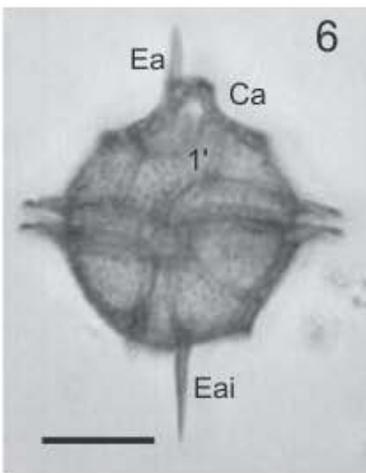
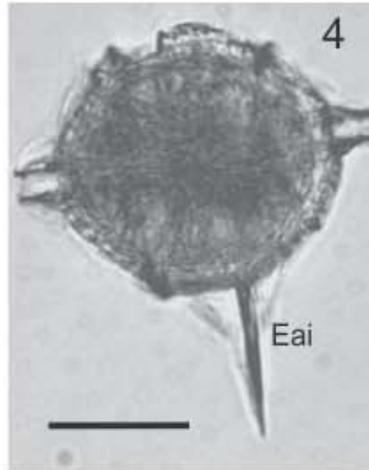
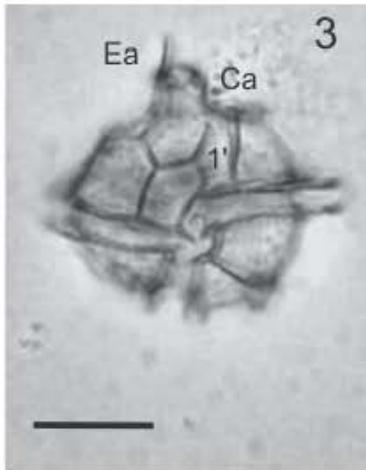


LÁMINA 2. Células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* de la Isla San José, B.C.S. (SJ, Figuras 11-16). Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido.

Figura 11. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de SJ. *Ca*- cuerno apical, *Ead*- espina antapical derecha, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala=20 µm.

Figura 12. *Pyrodinium bahamense* en vista lateral. Espécimen de SJ. *Ca*- cuerno apical, *pt*- poros de tricocistos, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala=20 µm.

Figura 13. *Pyrodinium bahamense* en vista apical. Espécimen de SJ. *Pv*- poro ventral en 4□ y CPA- complejo del poro apical. Escala= 5 µm.

Figura 14. *Pyrodinium bahamense* en vista antapical. Espécimen de SJ. *Sp*- placa sulcal posterior, *pp*- poro posterior. Escala= 5 µm.

Figura 15. Complejo del poro apical (CPA) de *P. bahamense*. Espécimen de SJ. Escala= 5 µm.

Figura 16. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral, mostrando placa 1□ □ □ postcingular. Espécimen de SJ. Escala= 5 µm.

LÁMINA 2

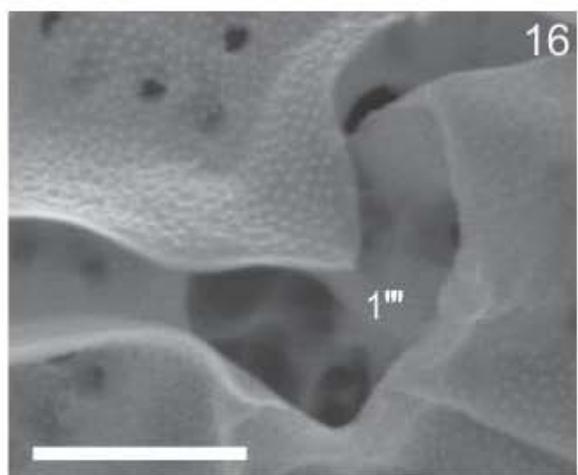
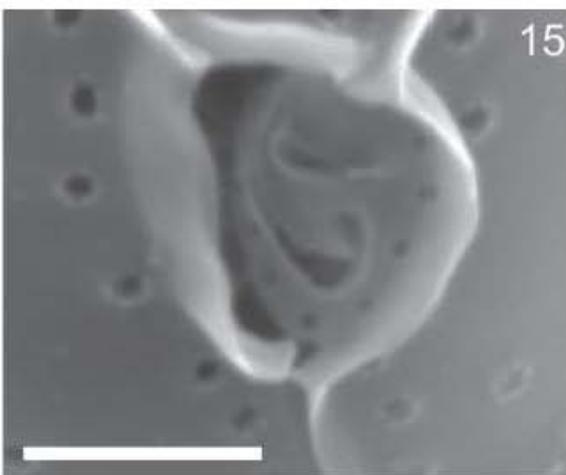
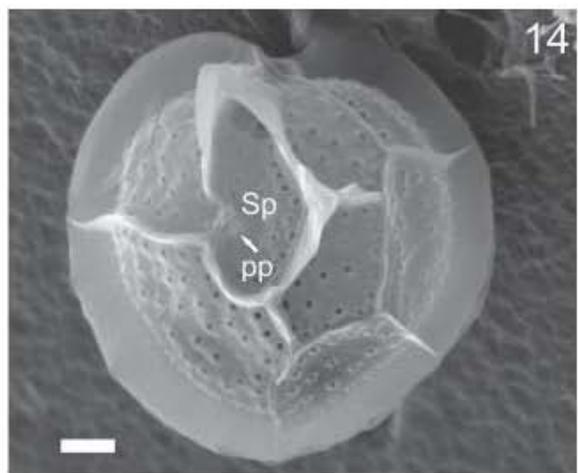
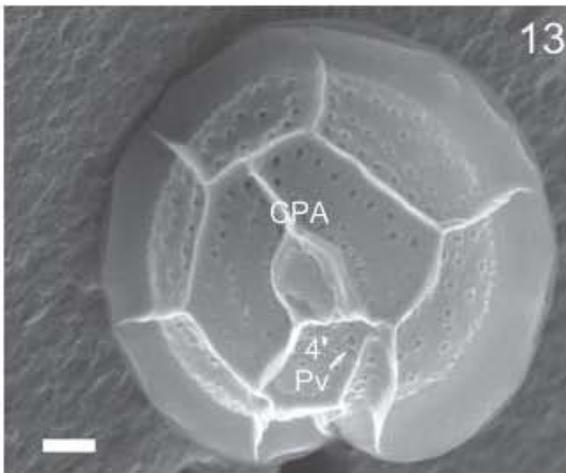
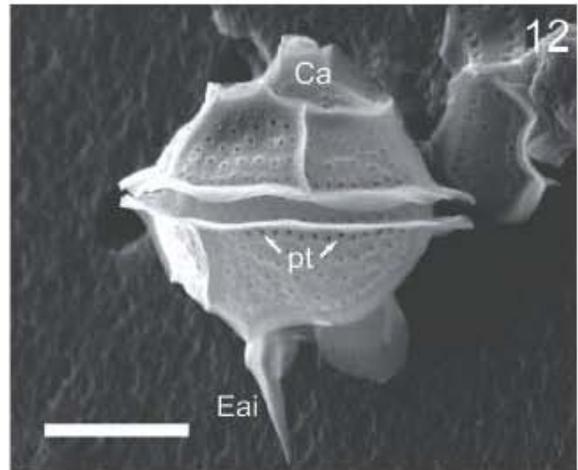
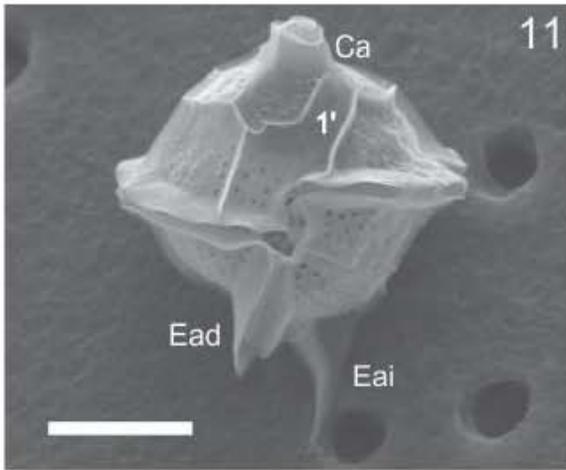


LÁMINA 3. Células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* de la laguna de Yavaros, Son. (YA, Figuras 17-22). Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido.

Figura 17. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de YA. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Ead*- espina antapical derecha, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μ m.

Figura 18. *Pyrodinium bahamense* en vista dorsal. Espécimen de YA. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical. Escala= 20 μ m.

Figura 19. *Pyrodinium bahamense* en vista apical. Espécimen de YA. *Pv*- poro ventral en 4' y *CPA*- complejo del poro apical. Escala= 10 μ m.

Figura 20. *Pyrodinium bahamense* en vista antapical. Espécimen de YA. *Sp*- placa sulcal posterior. Escala= 10 μ m.

Figura 21. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral mostrando el desplazamiento del cíngulo. Espécimen de YA. Escala= 10 μ m.

Figura 22. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral mostrando placa 1 □ □ □ postcingular. Espécimen de YA. Escala= 10 μ m.

LÁMINA 3

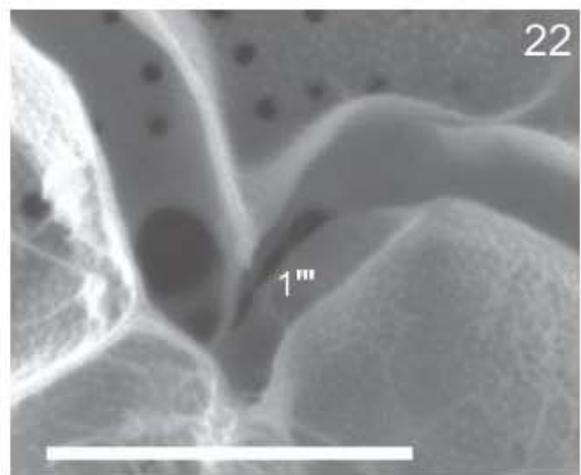
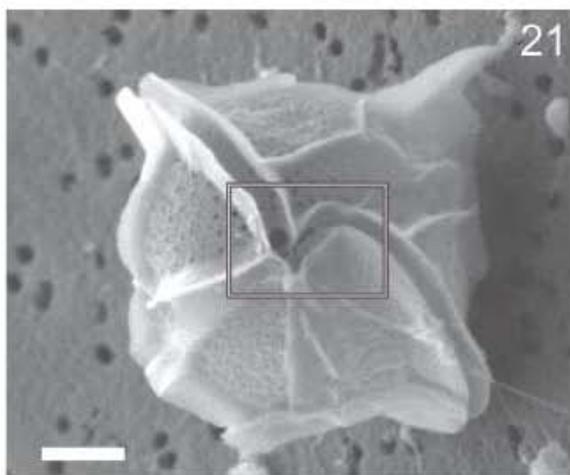
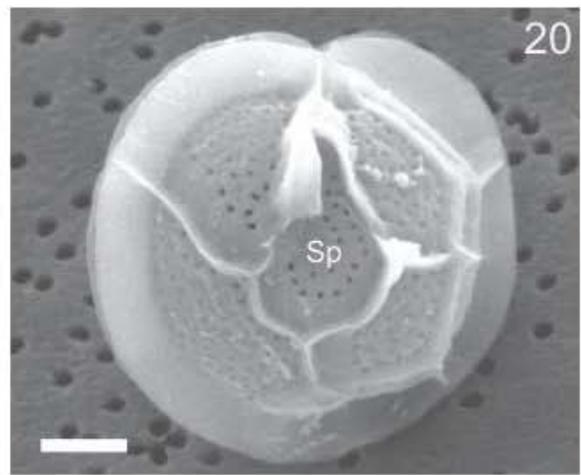
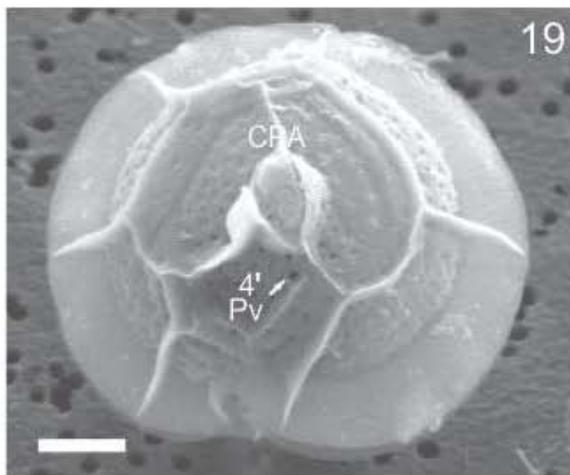
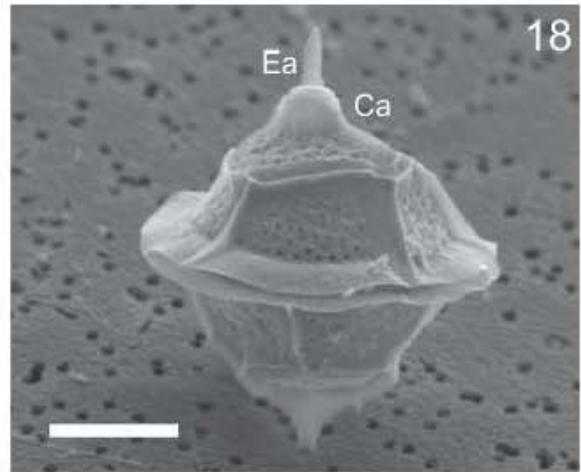
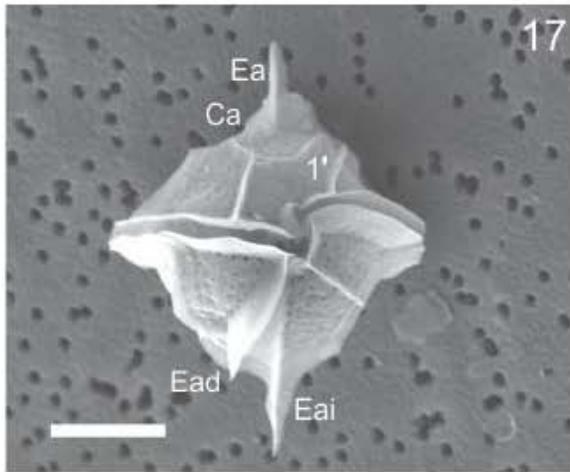


LÁMINA 4. Células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* de la laguna El Colorado, Sin. (EC, Figuras 23-28). Fotografías tomadas con microscopio de luz.

Figura 23. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de EC. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, poro ventral (*Pv*) en 4□, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μm.

Figura 24. *Pyrodinium bahamense* en vista dorsal. Espécimen de EC. *Ea*- espina apical, *Ca*- cuerno apical, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μm.

Figura 25. *Pyrodinium bahamense* en vista apical. Espécimen de EC. Escala= 10 μm.

Figura 26. *Pyrodinium bahamense* en vista antapical. Espécimen de EC. *Sp*- placa sulcal posterior y *pp*- poro posterior. Escala= 20 μm.

Figura 27. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de EC. *pt*- poros de tricocistos, *Ead*- espina antapical derecha, *Eai*- espina antapical izquierda. Escala= 20 μm.

Figura 28. Placa sulcal posterior (*Sp*) separada del área sulcal con la técnica de disección de la teca. Espécimen de EC. Escala= 20 μm.

LÁMINA 4

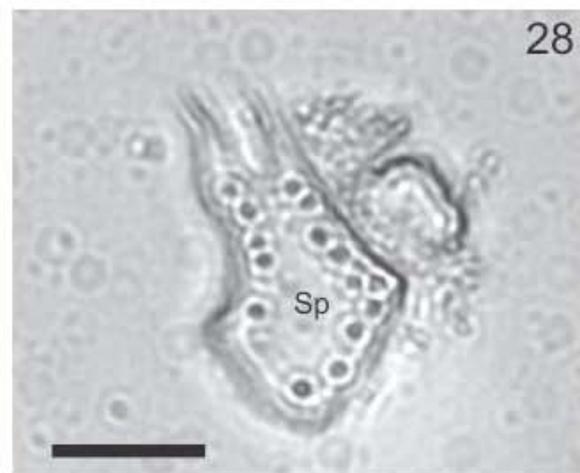
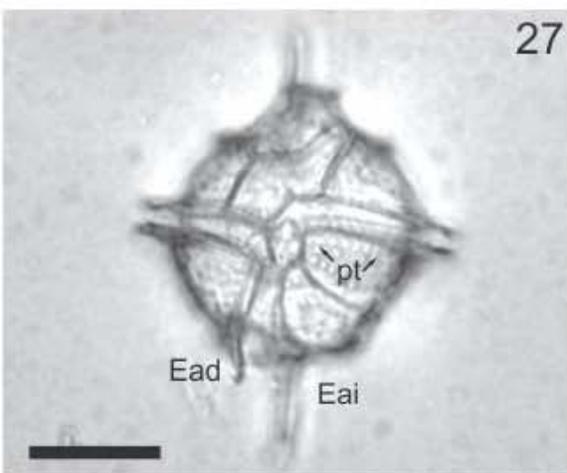
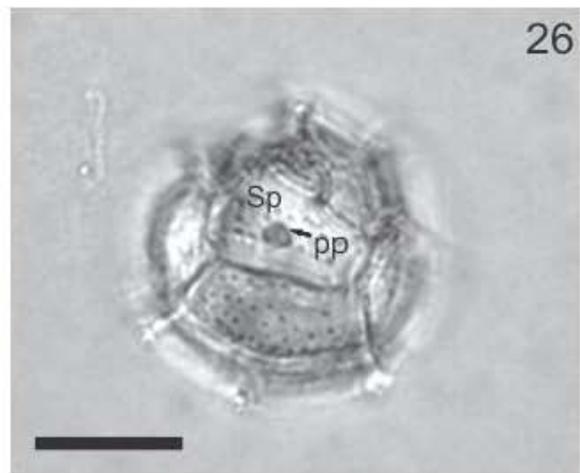
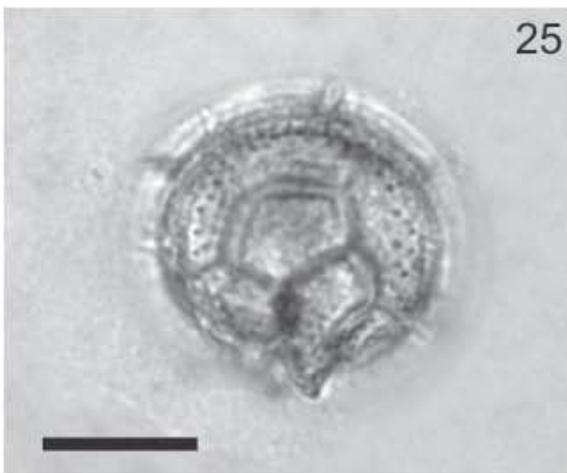
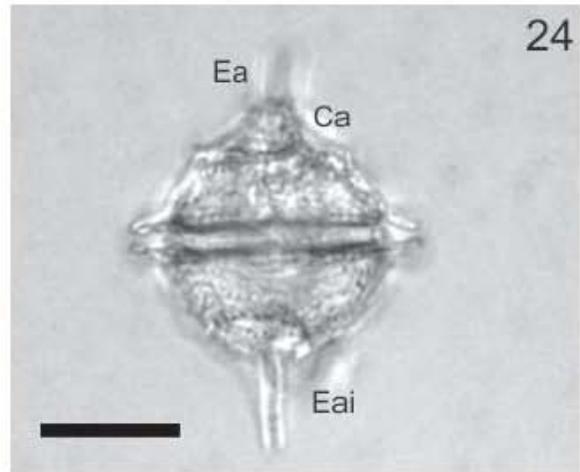
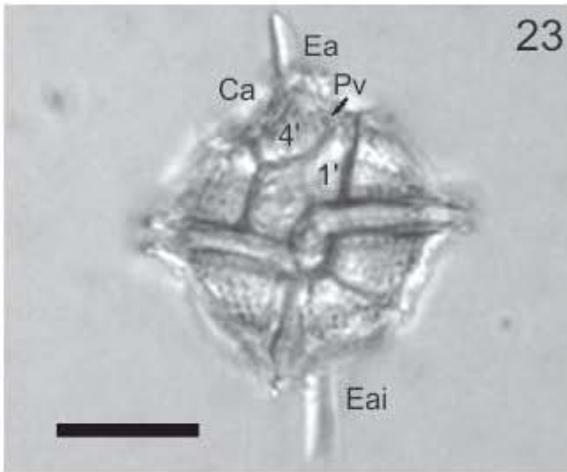


LÁMINA 5. Células vegetativas de *Pyrodinium bahamense* de la playa La Colorada, Oax. (LC, Figuras 29-34). Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido.

Figura 29. *Pyrodinium bahamense* en vista ventral. Espécimen de LC. Poro ventral (Pv) en 4□, Ead- espina antapical derecha. Escala= 20 μm.

Figura 30. *Pyrodinium bahamense* en vista lateral. Espécimen de LC. Ca- cuerno apical, pt- poros de tricocistos y Eai- espina antapical izquierda. Escala= 20 μm.

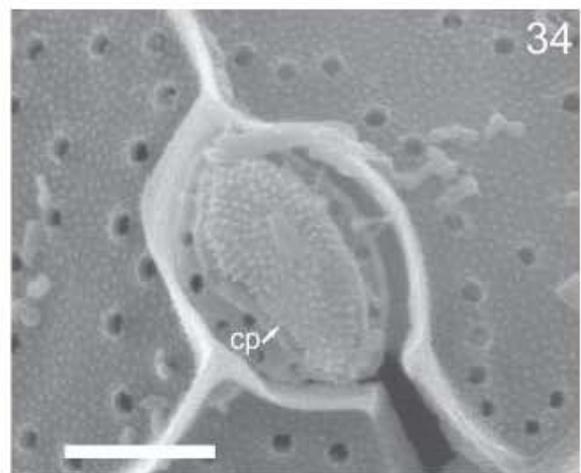
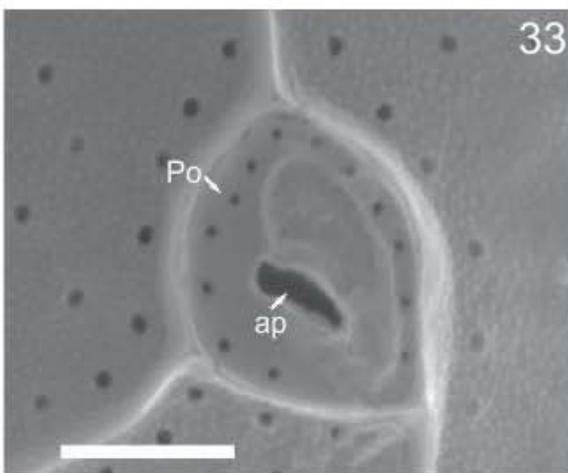
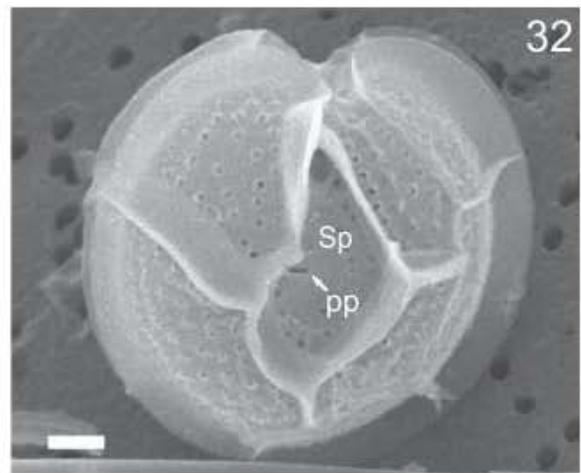
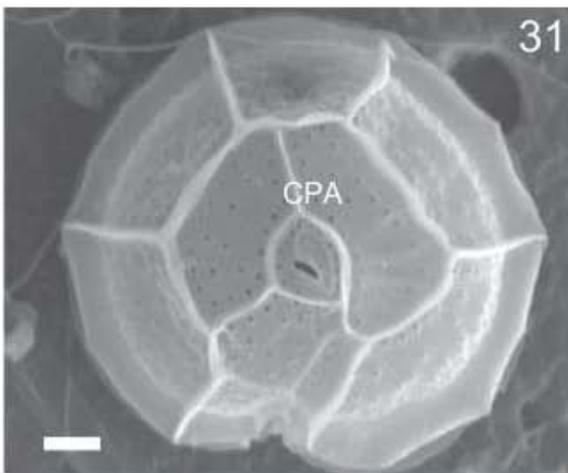
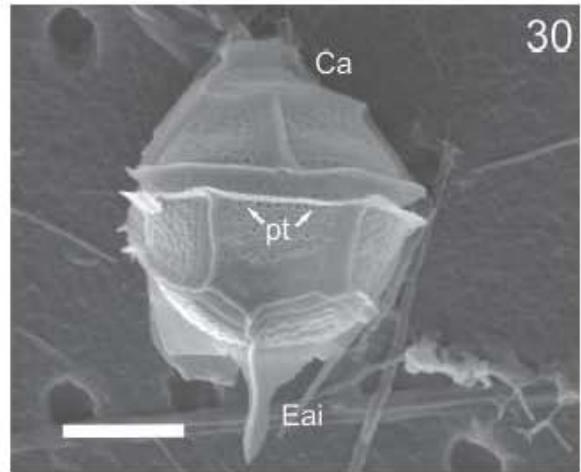
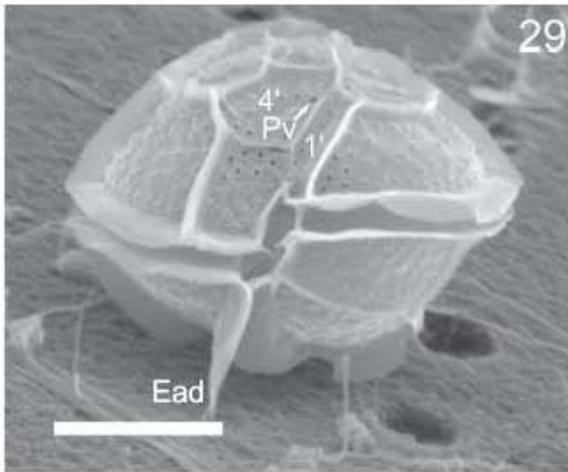
Figura 31. *Pyrodinium bahamense* en vista apical. Espécimen de LC. CPA- complejo del poro apical. Escala= 5 μm.

Figura 32. *Pyrodinium bahamense* en vista antapical. Espécimen de LC. Sp- placa sulcal posterior y pp- poro posterior. Escala= 5 μm.

Figura 33. Detalle del complejo del poro apical (CPA) de *P. bahamense*. Espécimen de LC. Po- placa Po con 13 poros, ap- poro anterior, cp- dosel en forma de coma. Escala= 5 μm.

Figura 34. Detalle del complejo del poro apical (CPA) de *P. bahamense*. Espécimen de LC. cp- dosel en forma de coma. Escala= 5 μm.

LÁMINA 5



Al comparar los valores obtenidos del análisis morfométrico de las células vegetativas de cada una de las poblaciones de estudio, se demostró mediante una prueba de Kruskal-Wallis (**Tabla 5**), que existen diferencias significativas en la mayoría de las características analizadas, excepto en la longitud sin cuerno apical, el desplazamiento del cingulo y la relación longitud sin cuerno-transdiámetro (**Tabla 6**).

Tabla 5. Resumen de la prueba de Kruskal-Wallis, aplicada a las características morfométricas de las células vegetativas ($\alpha= 0.05$) valores en negritas corresponden al valor de p donde se acepta H_a ($p < Q$).

Longitud con cuerno apical y espinas antapicales

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	12.95	3.34	6.73	6.91
YAVAROS		9.60	6.21	6.03
SAN JOSÉ			3.39	3.56
COLORADO				0.17
OAXACA				

Longitud con cuerno apical sin espinas antapicales

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	9.38	1.29	4.56	5.44
YAVAROS		10.68	4.82	3.93
SAN JOSÉ			5.85	6.74
COLORADO				0.88
OAXACA				

Longitud sin cuerno apical

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	4.76	0.56	3.37	5.40
YAVAROS		4.19	1.39	0.63
SAN JOSÉ			2.80	4.83
COLORADO				2.03
OAXACA				

Diámetro (incluyendo velos cingulares)

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	14.09	2.82	7.66	9.49
YAVAROS		11.26	6.42	4.60
SAN JOSÉ			4.83	6.66
COLORADO				1.82
OAXACA				

Transdiámetro

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	9.08	3.38	7.85	11.86
YAVAROS		5.70	1.23	2.77
SAN JOSÉ			4.46	8.47
COLORADO				4.00
OAXACA				

Longitud del cuerno apical

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	9.31	4.20	3.81	1.36
YAVAROS		13.52	5.50	7.94
SAN JOSÉ			8.02	5.57
COLORADO				2.44
OAXACA				

Longitud de la espina apical

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	6.57	4.63	1.04	10.33
YAVAROS		11.21	5.53	16.91
SAN JOSÉ			5.67	5.70
COLORADO				11.37
OAXACA				

Longitud de la espina antapical izquierda

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	12.31	12.36	8.57	5.65
YAVAROS		0.05	3.74	6.66
SAN JOSÉ			3.79	6.71
COLORADO				2.91
OAXACA				

Desplazamiento del cingulo

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	2.40	2.58	1.33	2.69
YAVAROS		0.14	1.09	0.25
SAN JOSÉ			1.26	0.10
COLORADO				1.37
OAXACA				

Relación longitud sin cuerno-transdiámetro

	YAVAROS	SAN JOSÉ	COLORADO	OAXACA
REFORMA	7.43	11.92	5.13	5.69
YAVAROS		4.49	2.29	1.73
SAN JOSÉ			6.79	6.23
COLORADO				0.55
OAXACA				

Tabla 6. Descripción del análisis morfométrico de células vegetativas a partir de la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha= 0.05$). Se resalta en color gris los rasgos morfométricos que no presentaron diferencias significativas (SJ = Isla San José, B.C.S., YA = laguna de Yavaros, Son., EC = laguna El Colorado, Sin., LR = laguna de La Reforma, Sin., LC = playa La Colorada, Oax.)

CARACTERÍSTICA	LOCALIDADES				
	SJ	YA	EC	LR	LC
Longitud con cuerno apical y espinas antapicales					
Longitud con cuerno apical sin espinas antapicales					
Longitud sin cuerno apical					
Diámetro (incluyendo velos cingulares)					
Transdiámetro					
Longitud del cuerno apical					
Longitud de la espina apical					
Longitud de la espina antapical izquierda					
Desplazamiento del cingulo					
Relación longitud sin cuerno-transdiámetro					

Al aplicar la prueba *a posteriori* de Newman-Keuls (**Tabla 7**), se observó nuevamente que existen diferencias significativas en todas las características consideradas, excepto en la longitud sin cuerno apical, en la cual las poblaciones resultaron estadísticamente similares.

Tabla 7. Tabla de comparaciones múltiples de *Newman-Keuls*. Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

CARACTERÍSTICA	LOCALIDADES				
	SAN JOSÉ, B.C.S.	YAVAROS, SONORA	EI COLORADO, SINALOA	LA REFORMA, SINALOA	LA COLORADA, OAXACA
Longitud con cuerno apical y espinas antapicales	196.60 ^c	392.45 ^a	265.78 ^b	128.32 ^d	269.34 ^b
Longitud con cuerno apical sin espinas antapicales	150.12 ^c	368.19 ^a	269.75 ^b	176.59 ^c	287.84 ^b
Longitud sin cuerno apical	204.48 ^{a,b}	290.21 ^a	261.70 ^a	192.87 ^b	303.23 ^a
Diámetro (incluyendo velos cingulares)	169.11 ^c	392.45 ^a	265.78 ^b	128.32 ^d	269.34 ^b
Transdiámetro	169.11 ^c	304.58 ^b	279.41 ^b	119.06 ^d	361.26 ^a
Longitud del cuerno apical	122.54 ^d	398.76 ^a	286.37 ^b	208.43 ^c	236.39 ^{b,c}
Longitud de la espina apical	185.82 ^c	414.94 ^a	301.81 ^b	280.54 ^b	69.38 ^d
Longitud de la espina antapical izquierda	344.15 ^a	343.12 ^a	266.63 ^b	91.56 ^d	207.03 ^c
Desplazamiento del cingulo	229.83 ^b	232.86 ^c	255.20 ^{b,c}	282.06 ^a	227.72 ^b
Relación longitud sin cuerno-transdiámetro	279.46 ^b	127.64 ^c	232.59 ^b	371.34 ^a	243.93 ^b

8.2 Análisis morfométrico de células quísticas de *Pyrodinium bahamense*

Los quistes de *P. bahamense* son esféricos (**Figura 35**), con un diámetro que varía entre 43 a 56 μm y un área de 2,050 μm^2 . La pared celular está cubierta con aproximadamente 96 procesos tubulares tipo corado, cuya terminación puede ser lobulada y/o asimétrica (**Figura 46**). Los procesos pueden estar fusionados o bifurcados desde la base (**Figura 39**). La longitud de los procesos oscila entre 5 a 13 μm . El quiste con contenido citoplasmático presenta una coloración de amarillo a verde y un cuerpo rojo que puede variar hasta un tono marrón y generalmente se encuentra en posición central o lateral (**Figuras 37, 38**), el citoplasma es granular y cuando el quiste está vacío la pared celular es incolora.

La pared del quiste (perifragma) es microgranular (**Figura 43**), mientras que la pared interna (endofragma) es lisa (**Figura 44**). En el epiquiste se observan suturas y paraplasas las cuales corresponden al arreglo tabular de las cuatro placas apicales que se fusionan en dos placas y seis placas pre-cingulares que presenta la forma vegetativa, en algunos especímenes se observaron vestigios del complejo del poro apical (**Figuras 41, 42**). El arqueópilo es de tipo epiquistal (**Figura 40**) y su fórmula tabular es 2A + 6P.

Los quistes de *P. bahamense* presentan variabilidad morfométrica y morfológica en los procesos que rodean al quiste. En la **Figura 47** se aprecian las paraplasas y los procesos en el epiquiste, los cuales pueden estar adheridos o separados en la pared (**Figura 48, 50**). Algunos procesos pueden mostrar bifurcación desde la base (**Figura 49**).

LÁMINA 6. Quiste de *Pyrodinium bahamense* (= *Polysphaeridium zoharyi*) del SE de Isla San José, B.C.S. (SJ, Figuras 35-40). Fotografías tomadas con microscopio de luz.

Figura 35. Quiste vacío con pared celular incolora, esférico y rodeado de numerosos procesos tipo capitado. Espécimen de SJ. Escala= 20 μm .

Figura 36. Quiste vacío en vista apical. La flecha indica el vestigio del poro apical, nótese el epiquiste subdividido en paraplacas. Espécimen de SJ. Escala= 20 μm .

Figura 37. Quiste lleno, nótese el citoplasma granular y el cuerpo rojo en posición central. Escala= 20 μm .

Figura 38. Quiste lleno, nótese el citoplasma granular, en este caso sólo abarca la mitad del interior del quiste. Espécimen de SJ. Escala= 20 μm .

Figura 39. Detalle de los procesos tubulares con terminación tipo capitado. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm .

Figura 40. Quiste germinado mostrando el arqueópilo epiquistal. Espécimen de SJ. Escala= 20 μm .

LÁMINA 6

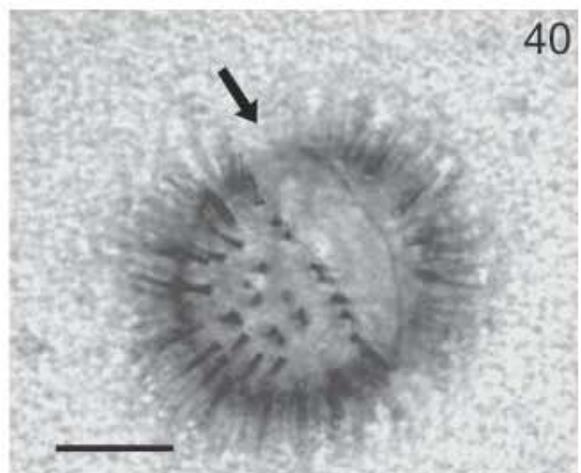
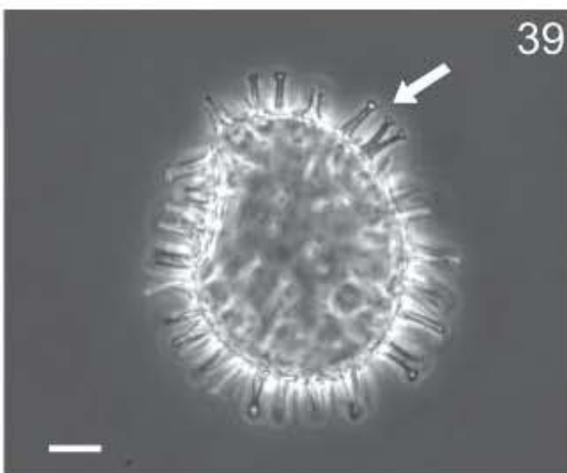
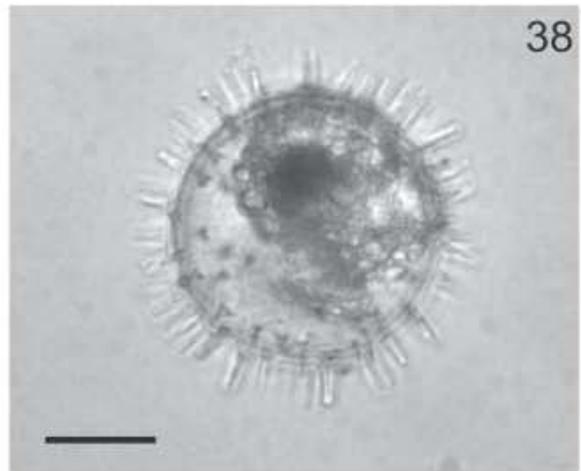
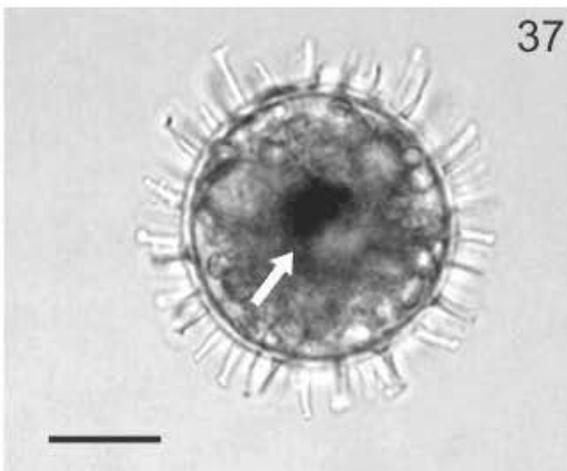
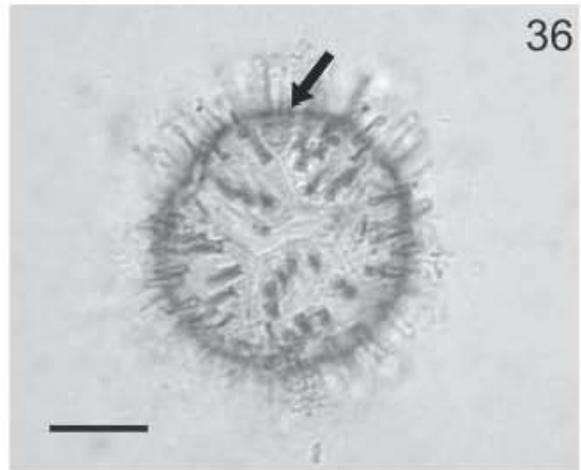


LÁMINA 7. Quiste de *Pyrodinium bahamense* (= *Polysphaeridium zoharyi*) del SE de Isla San José, B.C.S. (SJ, Figuras 41-46). Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido.

Figura 41. Quiste corado, mostrando las paraplacas en el epiquiste, nótese que el hipoquiste no presenta subdivisión. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

Figura 42. Quiste en vista apical, presencia de paraplacas en el epiquiste, la flecha indica el vestigio del poro apical. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

Figura 43. Detalle del perifragma mostrando textura microgranular. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

Figura 44. Detalle del endofragma mostrando aspecto liso. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

Figura 45. Detalle de los procesos tubulares, nótese la bifurcación de algunos de ellos desde la base. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

Figura 46. Detalle de la terminación de los procesos tubulares, mostrando terminación lobulada y asimétrica. Espécimen de SJ. Escala= 5 μm .

LÁMINA 7

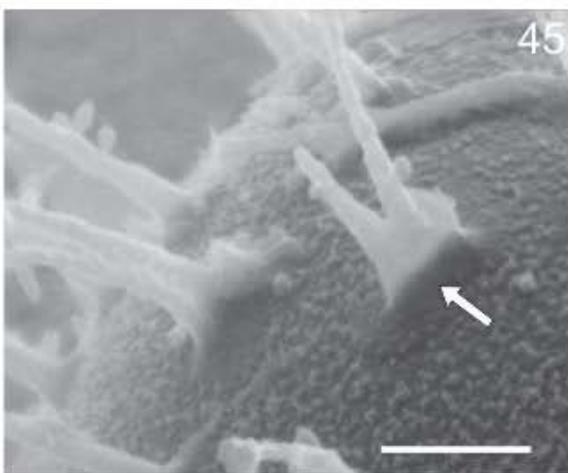
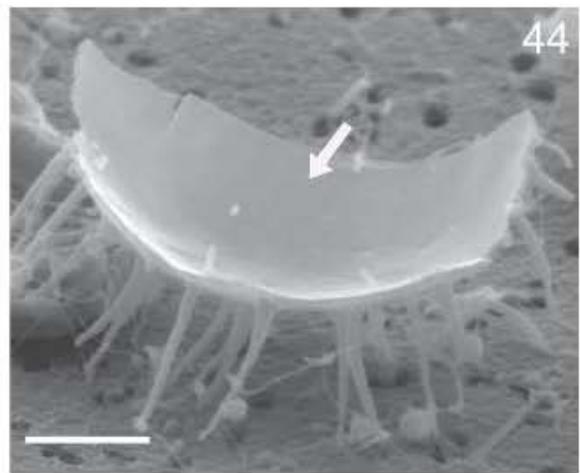
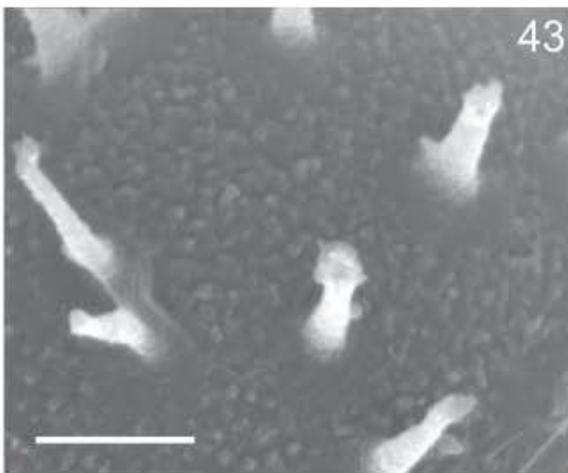
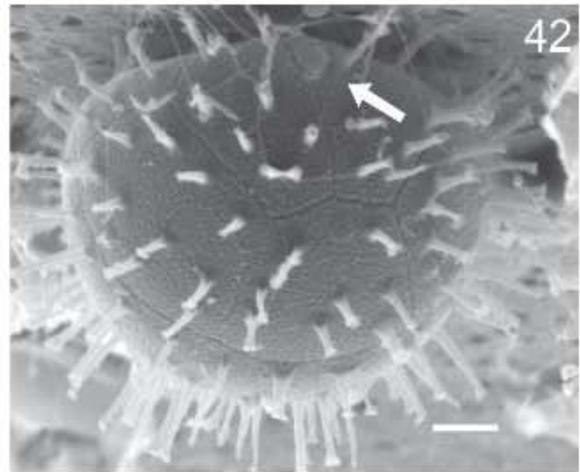
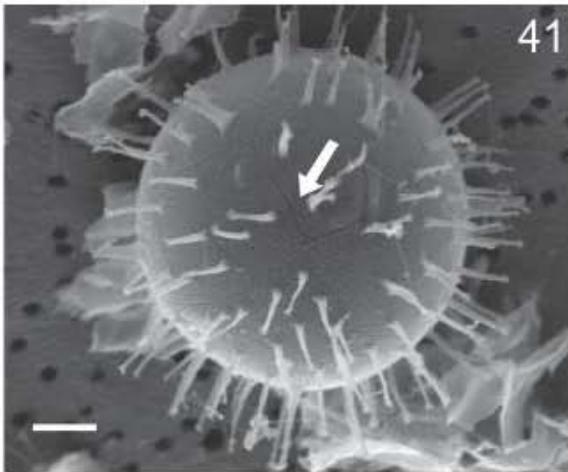


LÁMINA 8. Secuencia fotografía del desarrollo del quiste de *Pyrodinium bahamense* del SE de Isla San José, B.C.S. (SJ, Figuras 47-52). Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido.

Figura 47. Desarrollo inicial de los procesos, nótese las paraplasas en el quiste. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm .

Figura 48. Quiste en vista lateral, mostrando el crecimiento discontinuo de los procesos, nótese un mayor desarrollo de procesos en el epiquiste. Escala= 10 μm .

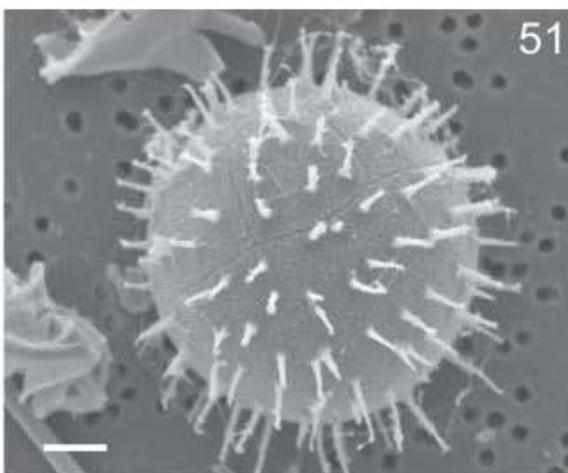
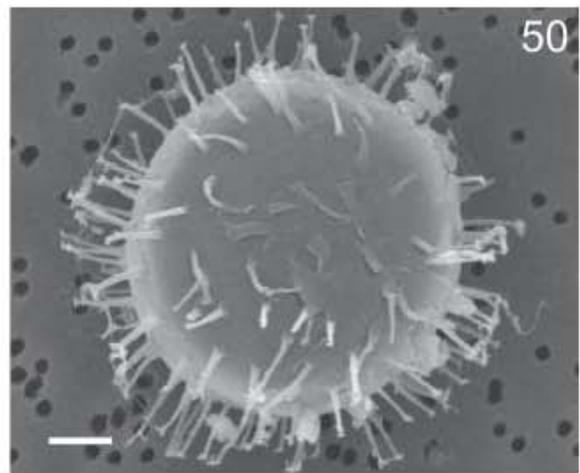
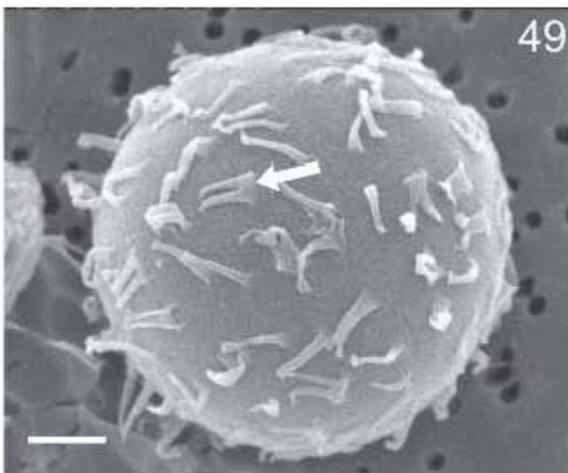
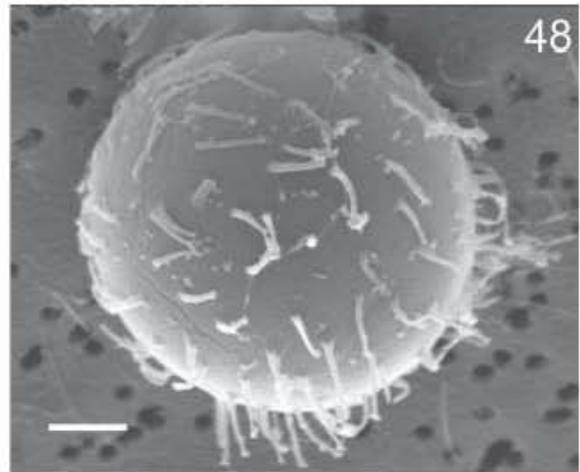
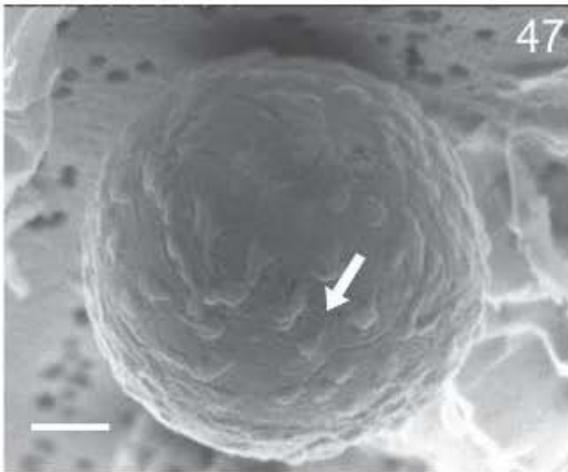
Figura 49. Quiste en vista lateral, mostrando procesos tubulares y algunos bifurcados desde la base, completamente desarrollados pero adheridos a la pared del quiste. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm .

Figura 50. Quiste mostrando procesos completamente desarrollados, nótese el desdoblamiento discontinuo de los procesos. Espécimen de SJ. Escala= 10 μm .

Figura 51. Quiste corado, mostrando la distribución azarosa de los procesos, nótese que los procesos se encuentran en el interior de las paraplasas y no en la sutura del epiquiste. Escala= 10 μm .

Figura 52. Quiste corado, mostrando los procesos con terminación tipo capitada, cuya longitud es de 5 a 13 μm . Espécimen de SJ. Escala= 10 μm .

LÁMINA 8



8.3 Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en la germinación de los quistes de *P. bahamense*

Los quistes obtenidos del SE de Isla San José, B.C.S., germinaron en los medios GSe y f/2, así como en el agua de mar sin enriquecimiento (**Figura 53**). De un total de 675 quistes que fueron inoculados, únicamente germinaron 196: 82 en el medio GSe, 60 en agua de mar sin enriquecimiento y 54 en el medio f/2. La mayor tasa de germinación se presentó a los 25° y 30°C; sin embargo, también se registró germinación de los 15° a los 35°C, en un gradiente salino que oscila entre 20 y 35. Los quistes inoculados en medio GSe fueron los primeros en germinar y dicho proceso inició de los 5 a 23 días posteriores a su inoculación

Para analizar las diferencias de cada una de las variables (temperatura, salinidad y medio de cultivo), se realizó un ANOVA de dos vías manteniendo fija una de dichas variables. En la **Tabla 8** se muestran los resultados, donde se pueden apreciar las condiciones en las cuales resultaron distintos los tratamientos. Igualmente se observa que es la temperatura la variable en la que hay mayor respuesta y diferencia en la germinación.

Al aplicar la prueba *a posteriori* de Bonferroni, ésta corroboró las diferencias significativas entre las variables consideradas, mostrando nuevamente que la temperatura óptima de germinación es de 25 y 30°C en los tres medios de cultivo GSe, f/2 y agua de mar sin enriquecimiento (**Tabla 9**).

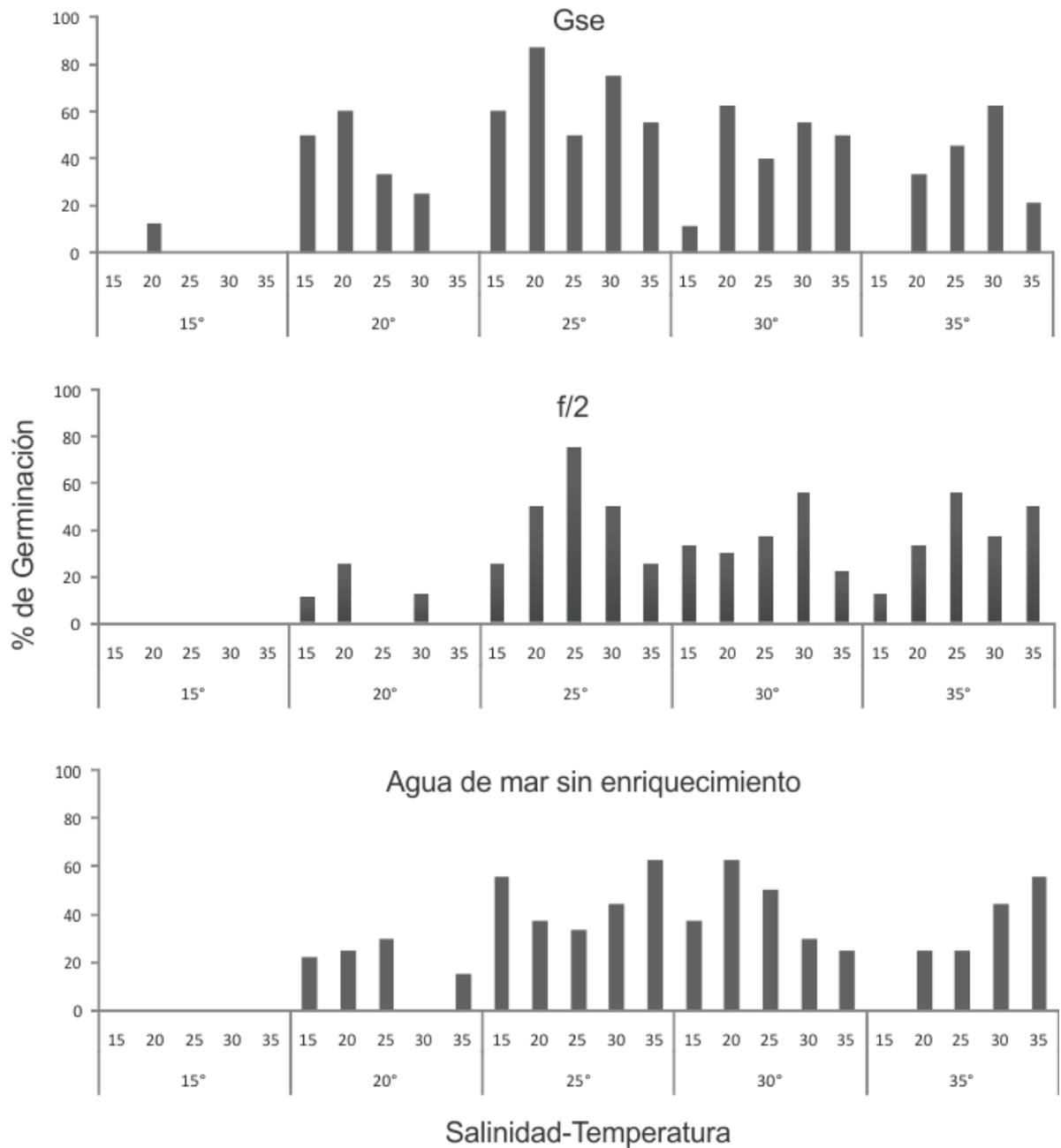


Figura 53. Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en la tasa de germinación de quistes de *P. bahamense*.

Tabla 8. Resumen del análisis de varianza de dos vías (salinidad/ medio de cultivo); salinidad (temperatura/ medio de cultivo); medio de cultivo (temperatura/ salinidad). Las claves **A s/e**= agua de mar sin enriquecimiento; **ns** = valores no significativos y **d** = muestra diferencia ($\alpha = 0.05$) pero por el número de datos disponibles no se puede establecer con certeza dicha diferencia.

TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (ups)	MEDIO DE CULTIVO
15	ns	ns
20	ns	GSe=A s/e; A s/e=f/2; GSe > f/2
25	ns	ns
30	ns	ns
35	15	ns

SALINIDAD (ups)	TEMPERATURA (°C)	MEDIO DE CULTIVO
15	15, 35	ns
20	15	d
25	15 =20; 15<35; 20=35=30; 20<25; 25=30=35	ns
30	15 =20<25=30=35	d
35	25=30=35; 15=20	ns

MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (ups)
GSe	25 > 30 > 20 = 25 > 15	ns
f/2	25 = 30 = 35 > 20 > 15	ns
A s/e	25=30; 25>35;30=35; 30>20; 35=20	ns

Tabla 9. Resumen de la prueba *a posteriori* de Bonferroni. Letras iguales a, b, c indican similitud entre las variables. Las claves **A s/e**= agua de mar sin enriquecimiento; **ns** = valores no significativos ($\alpha < 0.05$).

MEDIO CULTIVO	DE	TEMPERATURA (°C)				
		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
GSe		d	c	a	b	c
f/2		c	b	a	a	a
A s/e		d	c	a	a, b	b, c

SALINIDAD (ups)	TEMPERATURA (°C)				
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
15	b	a	a	a	b
20	b	a	a	a	a
25	c	b, c	a	a, b	a, b
30	b	b	a	a	a
35	b	b	a	a	a

TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (ups)				
	15	20	25	30	35
15	ns	ns	ns	ns	ns
20	ns	ns	ns	ns	ns
25	ns	ns	ns	ns	ns
30	ns	ns	ns	ns	ns
35	b	a	a	a	a

TEMPERATURA (°C)	MEDIO DE CULTIVO		
	GSe	f/2	A s/e
15	ns	ns	ns
20	a	b	a,b
25	ns	ns	ns
30	ns	ns	ns
35	ns	ns	ns

8.4 Análisis de toxinas paralizantes

Solamente se detectó la presencia de toxina paralizante en la cepa Pb7 aislada de sedimentos superficiales de la Isla San José. El análogo encontrado fue saxitoxina, con un tiempo de retención de $10.82 \text{ mL min}^{-1}$, fluorescencia de $2,026.8 \text{ } \mu\text{v min.}^{-1}$ y un área de $158.2 \text{ } \mu\text{v min}^{-1}$ (**Figura 54**). Para corroborar la presencia y concentración de dicho análogo, se realizó nuevamente la oxidación pre-columna con solución de peróxido para el análisis cualitativo. Se utilizó el método de adición de estándar y la concentración resultante de toxina fue de $3 \times 10^{-8} \text{ pg STX eq. cél}^{-1}$.

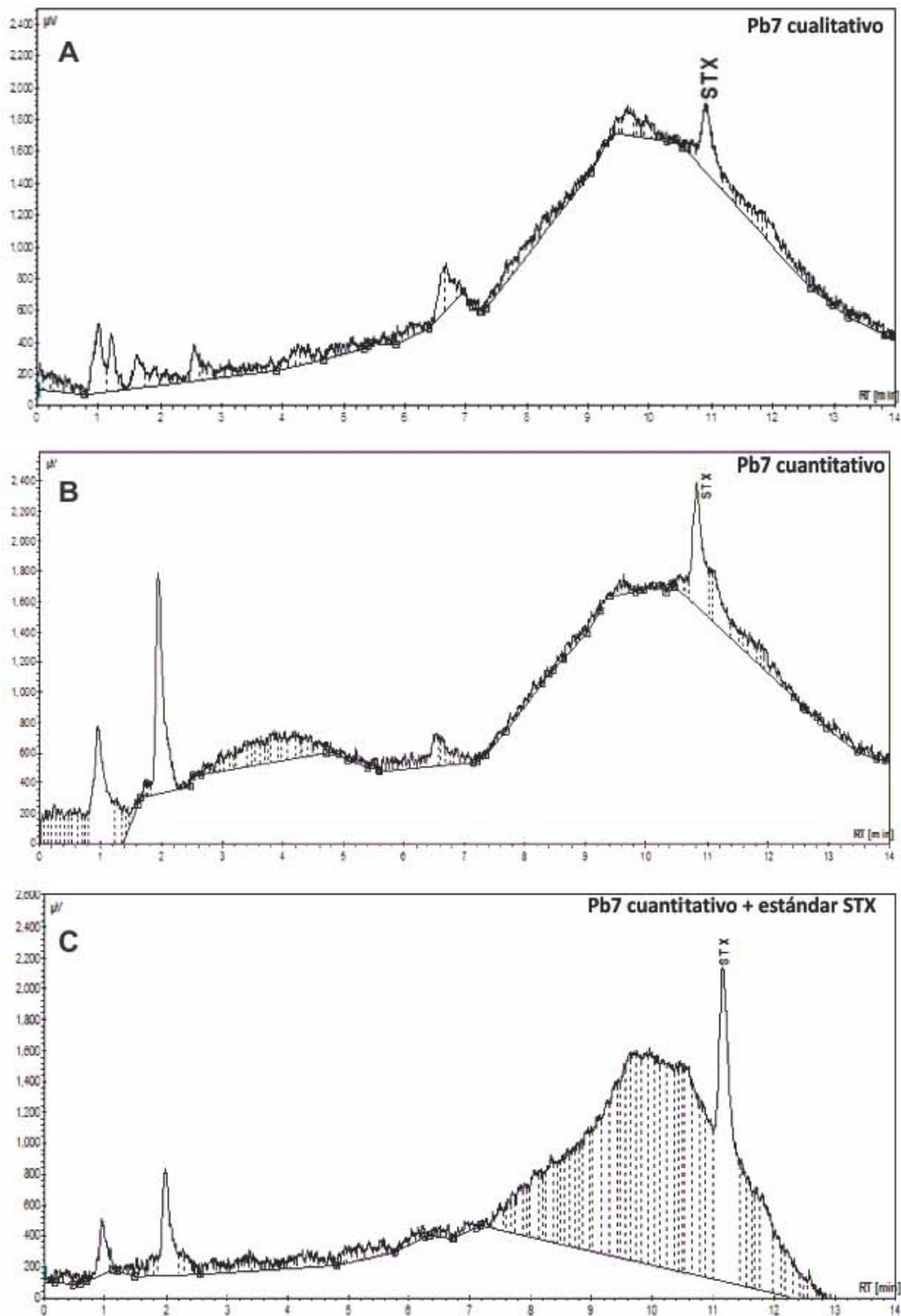


Figura 54. Cromatogramas de saxitoxina presente en cepa Pb7 obtenido a partir de análisis en HPLC-FD (A) detección de STX, (B) oxidación con solución de peróxido para observar con mayor amplitud el pico de STX, (C) estimación de STX a partir de la adición de estándar.

9. DISCUSIÓN

9.1 Análisis morfométrico de células vegetativas

Las características morfológicas se han considerado como una herramienta útil y práctica para el reconocimiento de las especies, en el caso de los dinoflagelados tecados. Particularmente en *P. bahamense*, la tabulación, la morfología y la talla tanto de las placas en particular como de las células en general han resultado las herramientas básicas para su identificación; no obstante, en este estudio se analizaron 9 características en cada una de las poblaciones. Sin embargo, en la literatura sólo consideran algunas como son: la forma de la célula (Steidinger *et al.* 1980, Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992, Cortés-Altamirano *et al.* 1993, Vargas-Montero y Freer 2003, Morquecho 2008), la formación de cadenas (Steidinger *et al.* 1980, Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992, Cortés-Altamirano *et al.* 1993), la longitud de la espina antapical izquierda (Balech 1985, Steidinger *et al.* 1980, Badylak *et al.* 2004, Martínez-López *et al.* 2007, Morquecho 2008), además de la longitud del cuerno apical (Steidinger *et al.* 1980).

Como se ha mencionado, la forma de la célula de *P. bahamense*, particularmente su compresión, ha sido considerada como un criterio de clasificación e identificación de las dos variedades, sin embargo, en la literatura no se ha asignado ningún valor numérico a dicha característica. Únicamente se menciona el grado de compresión de las células analizadas, en el caso de la variedad *bahamense* se señala que es menor al que presenta la variedad *compressum* (Martínez-López *et al.* 2007). La compresión considerada en este estudio como la proporción longitud sin cuerno-transdiámetro observada para poblaciones identificadas como variedad *bahamense* oscila entre los 0.62 a 0.8 μm y para la variedad *compressum* es de 0.7 μm . Encontrando que las poblaciones analizadas no presentan diferencias significativas de acuerdo a su forma, particularmente a la compresión.

Los intervalos y la fórmula tabular de los especímenes analizados en este trabajo, son comparables con lo previamente reportado (**Tabla 10**).

Si bien al diseccionar los ejemplares de las poblaciones de estudio, no fue posible separar las placas sulcales para determinar su arreglo y número. Se observó en la placa *Sp* que la presencia del poro posterior no fue consistente en todos los especímenes de las poblaciones de Isla San José, laguna de Yavaros, laguna El Colorado y playa La Colorada (**Figura 14, 20, 26, 28, 32**). Plate (1906) y Osorio-Tafall (1942), están en desacuerdo con el número de placas sulcales que presenta *P. bahamense*, además de diferir en la forma de la placa *Sp*, sin embargo, Steidinger *et al.* (1980) y Balech (1985), establecen que está compuesta por 6 placas sulcales. Con respecto a la presencia del poro posterior, en estas poblaciones, la mayoría de las células se encontraron en forma solitaria o en cadenas de dos células; por lo que se puede inferir que la ausencia de este poro en algunos especímenes puede deberse a la carencia de cadenas lo que sugiere que podría cumplir la función de unión entre las células para brindar mayor estabilidad y favorecer la capacidad natatoria.

Los intervalos de talla que han utilizado para discriminar entre variedades son: para variedad *bahamense* de 34 a 77 μm de longitud y de 34 a 68 μm de ancho (Stedinger *et al.* 1980, Badylak *et al.* 2004, Faust *et al.* 2005, Martínez-López *et al.* 2007). Mientras que para la variedad *compressum* es de 33 a 60 μm de longitud y de 34 a 64 μm de ancho (Osorio-Tafall 1942, Steidinger *et al.* 1980, Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992, Cortés-Altamirano *et al.* 1993). Es importante destacar estos intervalos que corresponden a la variedad *compressum* quedan dentro de los señalados para la variedad *bahamense*, por lo que no se justifica la división de *P. bahamense* en dos variedades.

En el presente estudio, la morfometría de las poblaciones analizadas no coincide con trabajos publicados por otros autores, ya que los intervalos registrados son de 26 a 72 μm de longitud (longitud sin cuerno) y de 26 a 77 μm de ancho (transdiámetro), es decir, estos intervalos incluyen todas las medidas indicadas por la literatura para ambas variedades.

Al realizar el análisis estadístico, se observó que las poblaciones de estudio no muestran una morfología uniforme pero si una amplia variación inter e intrapoblacional, por lo que se acepta que las características morfológicas que presenta *P. bahamense* del sur del Golfo de California y del Golfo de Tehuantepec no son diferentes, ya que las poblaciones de estas dos áreas geográficas no muestran diferencias significativas.

La variabilidad morfológica que se encontró en las poblaciones de estudio se puede explicar con los mecanismos de defensa celular descritos por Smayda (2010), quien menciona que el polimorfismo celular es una importante estrategia de adaptación que permite a los dinoflagelados tener una mejor capacidad natatoria, así como la formación de cadenas, que les permite desplazarse en un medio turbulento, obteniendo mayor estabilidad. En el caso de la formación de cadenas de *P. bahamense* se ha observado que forma cadenas de 2 a 8 células en el medio natural y en cultivo (Steidinger *et al.* 1980), en este trabajo se encontraron hasta 8 células en cultivo, por lo que *P. bahamense* tiende a formar cadenas cortas. . Otra explicación de la variabilidad encontrada podría ser la posición de las células en esas cadenas como sucede en el caso de otros dinoflagelados formadores de cadenas (Blackburn *et al.* 1989).

La distribución del dinoflagelado *P. bahamense* es tropical y subtropical, se encuentra en ambientes de aguas cálidas y de surgencias costeras, en golfos y lagunas costeras, En México, los registros de esta especie se generan principalmente de golfos, (Golfo de México, Golfo de Tehuantepec y Golfo de California), distinguiendo básicamente dos ambientes, uno marino y el otro lagunar. De lo anterior se sugiere que esta especie tiene la capacidad de desarrollarse en ambientes estenotérmicos, eurihalinos, marinos y lagunares por lo que el ambiente no debe ser útil como elemento para discriminar entre las poblaciones y variedades

De acuerdo a la forma, talla y ambiente en el que se desarrolla, se propone reconsiderar la situación taxonómica de esta especie, retomando la conclusión de Balech (1985), quien sugiere que no se justifica la división de la especie en dos variedades afirmando que las características de las células son inducidas por factores ambientales.

Tabla 10. Morfometría de *Pyrodinium bahamense* (* var. *compressum*)

Autor/Característica	Localidad	Longitud sin cuerno y espinas (μm)		Ancho (μm)		Longitud del cuerno apical (μm)	Longitud espina antapical izquierda (μm)
		Promedio	Intervalo	Promedio	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Plate 1906	Bahamas		50-52	48			
*Osorio-Tafal 1942	SE México	50		48			
Osorio-Tafal 1942	SE México, América central	66		54			
*Steidinger <i>et al.</i> 1980	Brunei	38	34-45	43	38-47	4-6	11-19
*Steidinger <i>et al.</i> 1980	Sabah	41	34-47	45	40-53	2-8	15-21
*Steidinger <i>et al.</i> 1980	Papua	38		44			
Steidinger <i>et al.</i> 1980	Florida-Jamaica	43	34-47	40	34-68		
Balech 1985	Nueva Guinea		35-47		34-64	3-6	3-20
Balech 1985	Puerto Rico		37-71		38-62		
Balech 1985	Jamaica		44-58		40-54		
Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992	Caribe mexicano	74	62-85	53	48-59		
*Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril 1992	SE México	48	37-60	44	42-51		
*Cortés-Altamirano <i>et al.</i> 1993	SE México	48	37-60	44	42-51		

Gómez-Aguirre 1998	Caribe mexicano	77.5		65			
Vargas-Montero y Freer 2003	Puerto Rico		33-47	47-53			
Vargas-Montero y Freer 2003	Puerto Rico		54-72	49-65			
Badilak et al. 2004	Florida	41		43		5-9	12-20
Faust et al. 2005	Belice		33-47		47-52		
Martínez López et al. 2007	NE México	44		43		6	20
Alonso-Rodríguez et al. 2008	NE México	50		40			
Morquecho 2008	SE México	42	33-45	44	37-56	4-16	12-26
	San José B.C.S	39	26-51	47	33-62	3-8	15-28
	Yavaros, Son.	43	31-56	53	36-73	3-18	5-31
Este estudio	El Colorado, Sin.	42	31-54	51	38-64	3-13	5-10
	La Reforma, Sin.	39	26-72	42	28-69	3-13	3-26
	La Colorada, Oax.	44	33-59	56	26-77	3-8	8-28

9.2 Análisis morfométrico de células quísticas de *Pyrodinium bahamense*

El quiste de *P. bahamense*, ha recibido dos nombres palinológicos: *Hemicystodinium zoharyi* (Rossignol 1962, Wall y Dale 1969), posteriormente *Polysphaeridium zoharyi* (Rossignol 1962 y Bujak *et al.* 1980). Con respecto a la descripción de los quistes mencionada en la literatura con respecto a la obtenida en este estudio, se considera que las características encontradas que concuerda con Rossignol (1962), Wall y Dale (1969), Mc. Lean (1976), Martínez-Hernández y Hernández-Campos (1991), Fukuyo *et al.* (2004) y Limoges *et al.* (2008) son: su forma esférica, que están cubiertos con procesos tubulares tipo corado cuya terminación puede ser lobulada y asimétrica, su coloración del citoplasma que es de amarillo a verde, el cual puede ser granular y cuando el quiste está vacío, la pared celular es incolora con la presencia de un arqueópilo epiquistal. Sin embargo el diámetro de los quistes de Isla San José de 43 a 56 μm es menor al que señala Fukuyo *et al.* (2004) de 55 a 70 μm . Además del número de procesos ya que en la literatura indican ~60 procesos (Wall y Dale 1969, Mc. Lean 1976, Fukuyo *et al.* 2004) y en este trabajo se encontraron ~90 procesos.

Es importante destacar que en la descripción realizada por Wall y Dale (1969) se mencionan algunas características de importancia para el estatus taxonómico del quiste de *P. bahamense* sobre las condiciones de desenquistamiento y movimiento del protoplasma al ser expulsado, como resultado de las características evolutivas presentes en la transformación de las células vegetativas a quísticas. En este trabajo se observó que la expulsión del protoplasma no presentó movimiento alguno, sin embargo es importante mencionar que la expulsión del material citoplasmático se realizó en dos porciones, las cuales posteriormente formaron a la célula vegetativa.

De acuerdo a la tabulación que presenta *Polysphaeridium zoharyi*, se encontró un quiste llamado *Eocladopyxis peniculatum* Morgenroth, con características similares con respecto a la morfología y condiciones ecológicas. Este espécimen fue fechado del periodo terciario temprano. Dichos rasgos sugieren que pudiera ser considerado como antecesor del dinoflagelado moderno *P. bahamense*. Algunos rasgos evolutivos son el detalle de las suturas, la fórmula (4A+6P) además de presentar un arqueópilo tipo epittractal (Mc. Lean 1976).

La contribución de este trabajo en la descripción del quiste de *P. bahamense* es la determinación de: el valor del área superficial ($2,050 \mu\text{m}^2$); el número de procesos (~ 90), el arreglo de las paraplacas en el epiquiste que coinciden con la fórmula tabular (2A+6P) y mostrar el vestigio del poro apical y los procesos cuya forma puede ser capitada (según Fukuyo *et al.* 2004) o de tipo oblada (Matsuoka y Fukuyo, 2000).

9.3 Efecto de la temperatura, salinidad y medios de cultivo en la germinación de los quistes de *Pyrodinium bahamense*

De acuerdo a las variables analizadas en el ensayo de germinación de quistes de *P. bahamense* de la Isla San José, B.C.S, se observó germinación desde los 15° hasta los 35°C, en los tres medios de cultivo (GSe, f/2 y agua de mar sin enriquecimiento) y en un gradiente salino de 20 a 35. Sin embargo al realizar el análisis estadístico, se encontró que la única variable que mostró diferencias significativas fue la temperatura a 25° y a 30°C a las cuales se presentaron las mayores tasas de germinación. El intervalo de temperatura en el cual se presentó la germinación de quistes en este trabajo abarca el intervalo registrado por Ilaya-Gedaria *et al.* (2007) el cual es de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Este intervalo es el mismo al cual se mantuvieron las cepas y concuerda con la temperatura mínima a la cual se desarrolla esta especie en condiciones naturales indicada por Philips *et al.* (2006) quien señala es a 20° en las costas de Florida.

En condiciones controladas se ha registrado crecimiento del dinoflagelado a temperatura de 28°C para células aisladas de Bahía Mazinloc y Zambales (Montejo *et al.* 2006), mientras que en Bahía Bombon y Zambales creció a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Azanza *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007).

Con respecto a la salinidad, Ilaya-Gedaria *et al.* (2007) indica que *P. bahamense* germina de 24 a 36, en condiciones naturales la forma vegetativa se encuentra en un intervalo de salinidad de 10 a 45 en las costas de Florida (Phlips *et al.* 2006), mientras que en condiciones controladas se desarrolla a un gradiente salino de 24 a 36 (Azanza *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007), estos registros confirman que *P. bahamense* presenta características eurihalinas.

Por último, el medio que ha sido utilizado para cultivar a *P. bahamense* es el f/2 (Azanza *et al.* 2006, Montejo *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007), sin embargo, en este trabajo el medio de cultivo en el que se presentó una mayor tasa de germinación fue el medio GSe además se observó el desenquistamiento desde los primeros 5 días después de iniciado el experimento, esto se puede deber a a la formulación que contiene dicho medio de cultivo (extracto de suelo y selenio).

El periodo de dormancia o reposo sugerido por Wale y Dale (1969) para *P. bahamense* es de 2.5 a 3 meses. Para este estudio, los especímenes se mantuvieron en almacenamiento a 20°C durante 19 meses hasta ser utilizados en el ensayo, por lo que dicho periodo de reposo obligado ya había sido completado y sólo requerían de las condiciones necesarias para su germinación, las cuales fueron 25° a 30°C, salinidad de 20 a 35 y medio de cultivo GSe. Por ello se señala en este estudio que los quistes pueden mantenerse en el sedimento por prolongados periodos de tiempo, mientras los factores externos permitan su germinación.

9.4 Análisis de toxinas paralizantes

Otro criterio utilizado para discriminar entre variedades (Harada *et al.* 1982, Oshima *et al.* 1984, Gacutan *et al.* 1985, Mata *et al.* 1990, Usup *et al.* 1994, Hummert *et al.* 1997, Orellana-Cepeda *et al.* 1998, Landsberg *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007, Azanza *et al.* 2010), ha sido la producción de toxinas paralizantes. Característica que hasta hace algunos años fue uno de los criterios determinantes en la separación de la *var. bahamense* y *var. compressum*.

Se utilizó la biomasa obtenida del ensayo de la germinación de quistes para realizar el análisis de toxinas. La toxina identificada fue STX a una concentración de 3×10^{-8} pg STX eq cél⁻¹, la cual no es comparable con la toxicidad encontrada en las costas de Florida, donde la concentración de toxinas paralizantes fue de 3.28 pg STX eq cél⁻¹ en muestras de fitoplancton y de 2.02 a 12.72 pg STX eq cél⁻¹ en cepas establecidas a partir del florecimiento, por lo que las poblaciones del sur del Golfo de California podrían ser potencialmente tóxicas.

El análogo encontrado fue la STX, no en la misma proporción que la señalada en Florida ya que en este evento los análogos que se presentaron, de acuerdo a su proporción fueron B1, STX y dcSTX, Lansberg *et al.* (2006). Sin embargo el análogo coincide con el perfil característico del dinoflagelado (Harada *et al.* 1982, Oshima 1989, Usup *et al.* 1994, Orellana *et al.* 1998, Landsberg *et al.* 2006, Ilaya-Gedaria *et al.* 2007). Los límites de detección de los análogos B1 (552 µg mL⁻¹) y dcGTX (109 µg mL⁻¹) son mayores que el de la STX, razón por la cual los mencionados análogos pudieron estar presentes y no haber sido detectados.

Es importante mencionar que deben realizarse más estudios, ya que la concentración de saxitoxina obtenida en este trabajo, solamente se encontró en una cepa, a una concentración por debajo del límite de detección y se recurrió a la adición de estándar para la cuantificación, por lo que es necesario realizar más análisis para corroborar la producción de toxinas en *P. bahamense* en las poblaciones del sur del Golfo de California.

10. CONCLUSIONES

Las características morfológicas de *P. bahamense* no son un criterio válido para discriminar entre variedades, ya que en las poblaciones del sur del Golfo de California y la del Golfo de Tehuantepec se observan diferencias inter e intrapoblacionales y al aplicar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones analizadas.

Los quistes de *P. bahamense* de Isla San José, B.C.S. son esféricos, con un diámetro que varió entre 43 a 56 μm , área de 2,050 μm^2 , aproximadamente 96 procesos tubulares tipo corado, cuya longitud osciló entre 5 a 13 μm . La pared del quiste (perifragma) es microgranular y la interna (endofragma) es lisa.

La temperatura mostró diferencias significativas en el proceso de germinación de quistes de *P. bahamense*, siendo 25 y 30°C las que corresponden a las mayores tasas de germinación, sin embargo, el proceso ocurrió de 15° a 35°C en un gradiente salino de 20 a 35, en los tres medios de cultivo (GSe, f/2 y agua de mar sin enriquecimiento).

Las poblaciones de *P. bahamense* del sur del Golfo de California pueden ser potencialmente tóxicas.

La situación taxonómica de *P. bahamense* debe reconsiderarse ya que a partir de las características morfológicas, morfométricas y toxicológicas consideradas en este estudio, no hay diferencias entre las formas reconocidas de las dos variedades establecidas en la literatura actualmente.

11. RECOMENDACIONES

- Complementar el análisis taxonómico utilizando herramientas como: la morfometría geométrica y las técnicas moleculares.
- Analizar poblaciones naturales y establecer cultivos de especímenes de otros sitios de estudio, para verificar el potencial tóxico de las células.
- Considerar un método alternativo para el análisis de toxinas como la prueba de inmunoensayo ELISA la cual tiene una alta sensibilidad. Se realiza de forma rápida y sencilla y con un menor límite de detección, particularmente de la saxitoxina, en comparación con la cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 219 (1-4), 311-339.
- Alonso-Rodríguez, R., Hernández-Becerril, D.U., Gárate-Lizárraga, I., 2008. Catálogo de microalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. En: Páez-Osuna, F. (Ed.), Serie: Lagunas Costeras de Sinaloa. UNAM, ICMYL, CODESIN, CESASIN-SEMARNAT-CONACYT, Sinaloa, México. pp. 7-13.
- Amorim, A., Dale B. 1997. Distribution of cysts from toxic or potentially toxic dinoflagellates along the Portuguese Coast. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae. Proc. VIII Internl. Conf. on Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, España, pp. 64.
- AOAC. 2005. Official method 2005.06. Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins, in Shellfish using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. En: Horwitz, W. (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg, USA, pp. 59-61.
- Ayala, C.A., Malpica-Cruz, V.M., Gutiérrez, E.M., 1980. Geología Marina de la región de Yavaros, Sonora, México. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. México* 7(2), 275-289.
- Azanza, R., 1997. Contributions to the understanding of the bloom dynamics of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*: a toxic red tide causative organism. *Sci. Diliman* 9, 1-6.

- Azanza, R.V., Taylor, M., 2001. Are *Pyrodinium* blooms in the Southeast Asian region recurring and spreading? A view at the end of the millennium. *Ambio* 30 (6), 356-364.
- Azanza, V.M.P., Azanza, R., Vargas, D.V.M., Hedreyda, T.C., 2006. Bacterial endosymbionts of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. *Microb. Ecol.* 52, 756-764.
- Azanza, V.R., Cruz, J.L., Cariño, A. F., Blanco, G.A., Butardo Jr., M.V., 2010. Paralytic shellfish toxin concentration and cell density changes in *Pyrodinium bahamense*-*Noctiluca scintillans* feeding experiments. *Toxicon* 55, 1017-1023.
- Badylak, S., Kelley, K., Philips, E.J., 2004. A description of *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) from the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Phycologia* 43, 653-657.
- Balech, E., 1985. A revision of *Pyrodinium bahamense* Plate (Dinoflagellata). *Rev. Paleobot. Palynol.* 45, 17-34.
- Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M., Bolch, C.J. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.* 25 (3), 577-590.
- Boltovskoy, A., 1995. Taxonomía y morfología de los Dinoflagelados: métodos de trabajo. En: Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., Sar, E., Pinto, S. A. (Eds.), *Manual de métodos ficológicos*. Chile, pp. 55-81.

- Bujak, J.P., Downie, C., Eaton, G.L., Williams, L., 1980. Taxonomy of some Eocene dinoflagellate cyst species from southern England. En: Bujak, J.P., Downie, C., Eaton, G.L., Williams, G.L. (Eds.), *Dinoflagellate Cysts and Acritarchs from the Eocene of Southern England*. Special Papers in Palaeontology 24, 26-36.
- Carmona-Piña, L.R., 2007. Riqueza específica, distribución y abundancia de aves terrestres y marinas en Isla San José, Golfo de California, Baja California Sur, México. UABC Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BK023. México, D.F., pp. 45.
- Cortés-Altamirano, R., Hernández-Becerril, D.U., 1992. Plancton: *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. *Ciencias del Mar* 12, 24-26.
- Cortés-Altamirano, R., Muñoz-Cabrera, L., Sotomayor-Navarro, O., 1993. Envenenamiento paralítico por mariscos (PSP), causado por el dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en la costa suroeste de México. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. México* 20 (1), 43–54.
- Doblin, M.A., Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M., 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* (Bacillariophyta). *J. Plankton Res.* 21 (6), 1153-1169.
- Escobedo-Urias, D.C., 2004. Efecto de los aportes de aguas residuales sobre el nivel de eutrofización de la Laguna El Colorado, Ahome, Sinaloa. Informe Proyecto de Investigación. IPN-CIDIR-U. Sinaloa, pp. 43.

Faust, M.A., Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Tester, P.A., 2005. Dinoflagellate diversity and abundance in two Belizean coral-reef mangrove lagoons: a test of Margalef's mandala. *Atoll Res. Bull.* 534, 103-131.

Fensome, R.A., Taylor, F.J.R., Norris, G., Sarjeant, W.A.S., Wharton, D.I., Williams, G.I., 1993. *Micropaleontol.* 7, pp. 351.

Fensome, R.A., Williams, G.L., 2004. The Lentin and Willams Index of Fossil Dinoflagellates. *Micropaleontology Press. Canada*, pp. 351.

Fierro, F., Lluch-Cota, S.E., Lluch-Cota, D.B., Cortés-Altamirano, R., Sierra-Beltrán, A.P. 2002. *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* bloom in Chiapas, Mexico, during 2001. Onset and effects. En: X International Conference on Harmful Algae. Florida, USA, pp. 93.

Fritz, L., Triemer, E.R., 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21, 662-664.

Fukuyo, Y., Sako, Y., Matsuoka, K., Imai, I., Takahashi, M., Watanabe, M., 2004. En: Okaichi, T., (Ed.),. Red tides. *Ocean Sciences Research (OSR)*. Vol. 4. Japón. pp. 239.

Gacutan, R.Q., Tabbu, M.Y., Aujero, E.J. Icartlo Jr., F., 1985. Paralytic shellfish poisoning due to *Pyrodinium bahamense* var *compressa* in Mati, Davao Oriental Philippines. *Mar. Biol.* 87, 223-227.

Garate-Lizárraga, I., González-Armas, R., 2011. Occurrence of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* along the southern coast of the Baja California Peninsula. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (3), 626-30.

Gómez-Aguirre, S., 1998. Red tide occurrences recorded in Mexico from 1980 to 1992. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México* 69 (1), 13–22.

Gómez-Aguirre, S., Licea, S., 1998. Blooms of *Pyrodinium bahamense* (Dinoflagellata) in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae. Proc. VIII Internl. Conf. on Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, España, pp. 61.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.

Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing. París, pp. 1-22.

Hallegraeff, G.M., Maclean, J.L., 1989. Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium* red tides. *International Center for Living Aquatic Resources Management*. Manila, Filipinas, pp. 286.

Harada, T., Oshima, Y., Kamiya, H., Yasumoto, T., 1982. Confirmation of paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* and bivalves in Palau. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 48, 821- 825.

- Hernández-Becerril, D.U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora, C., Barón-Campis, S.A., Ceballos-Corona, G., Herrera-Silveira, J., Meave del Castillo, M.E., Juárez-Ruíz, N., Merino-Virgilio, F., Morales-Blake, A., Ochoa, J.L., Orellana-Cepeda, E., Ramírez-Camarena, C., Rodríguez-Salvador, R., 2007. Toxic and Harmful Marine Phytoplankton and Microalgae (HABs) in Mexican Coasts. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 42 (10), 1349-1363.
- Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K., Luckas, B., 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia* 45, 312-316.
- Ilaya-Gedaria, A., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, V., 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50, 518-529.
- INP-SAGARPA, 2004. Registro de mareas rojas en el Pacífico Sur de 1985 a 2004. Juárez R.N., Ramírez C.C., Barón C.S. (Eds.), Dirección General de Investigaciones Pesqueras Pacífico Sur. Inst. Nac. Pesca, SAGARPA. <http://fans.cicese.mx/publicaciones/noticias/Cuadro%20Mareas%20Rojas%20Pacífico%20Sur-SEMARNAT.xls>, 2010-04-24.
- INE-SEMARNAP, 2000. La calidad del agua en los ecosistemas costeros de México. INE/SEMARNAP, pp. 407.
- Kwong, R.W.M., Wang, W.X., Lam, P.K.S., Yu, P.K.N., 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquat. Toxicol.* 80, 82-91.

Landsberg, J.H., Sherwood, H., Johannessen, J.N., White, K.D., Conrad, S.M., Abbott, J.P., Flewelling, L.J., Richardson, R.W., Dickey, R.W., Jester, E.L.E., Etheridge, S.M., Deeds, J.R., Van-Dolah, F.M., Leighfiel, T.A., Zou, Y., Beaudry, C. G., Benner, R.A., Rogers, P.L., Scott, P.S., Kawabata, K., Wonly, J.L., Steidinger, K.A., 2006. Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source. *Environ. Health Persp.* 114, 1502-1507.

Lankford, R.R., 1977. Coastal lagoons of Mexico. Their origin and classification. En: Wiley, M. (Ed.), *Estuarine Process. Vol.II: Circulation, sediments and transfer of material in the estuary.* Academic Press. New York, USA, pp. 182-215.

Lawrence, J.F., Niedzwiadek, B., Menard, C., 2005. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1714-1732.

Lebour, M.V., 1925. The dinoflagellates of northern seas. *Mar. Biol. Assoc. U.K.* Plymouth, England, pp. 250.

Lefebvre, K.A., Trainer, V.L., Scholz, N.L., 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquat. Toxicol.* 66 (2), 159-170.

Lentin, J.K., Williams, G.L., 1993. Fossil dinoflagellates: index to genera and species. *Am. Assoc. Stratigr. Palynol. Contrib. Ser.* 28, pp. 856.

- Limoges, A., Kiehl, J.F., Radi, T., de Vernal, A., Ruiz-Fernández, C., 2008. Palynological investigation of the western Mexican coast. Dino8 Eighth International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates. Montréal, Canada. pp. 29.
- Maclean, J.L., 1989. Indo-Pacific red tides, 1985-1988. Mar. Pollut. Bull. 20, 304-310.
- Martínez G.A., 1970. Estudios hidrobiológicos en un sistema de salinas de Yavaros, Sonora, México. Tesis Licenciatura. Fac. Cienc. UNAM. México, pp. 48.
- Martínez-López, A., Ulloa-Pérez, E., Escobedo-Urias, D., 2007. First record of vegetative cells of *Pyrodinium bahamense* (Gonyalucleales: Goniomataceae) in the Gulf of California. Pacific Sci. 61 (2), 289–293.
- Martínez-Hernández, E., Hernández-Campos, H.E., 1991. Distribución de quistes de dinoflagelados y Acritarcas en sedimentos holocénicos del Golfo de California. Paleontol. Mex. 57, 1–133.
- Mata, L., Abarca, G., Marranghello, L., Viquez, R., 1990. Paralytic shellfish poisoning (PSP) due *Spondylus calcifer* contaminated with *Pyrodinium bahamense*, Costa Rica, 1989-1990. Rev. Biol. Trop. 38, 129-136.
- Mason, L.P., Vogelbein, K.W., Hass, W.L., Shields, D.J., 2003. An improved stripping technique for lightly armored dinoflagellates. *J. Phycol.* 39, 253-258.

- Matsuoka, K., Fukuyo, Y., Anderson, D., 1989. Methods for modern dinoflagellate cyst studies. En: Head M.J., Wrenn J.H. (Eds.), Red tides: Biology Environmental Science and Toxicology. Elsevier. New York, USA, pp. 461-480.
- Matsuoka, K., Fukuyo, Y., 2000. Guía técnica para el estudio de quistes de dinoflagelados actuales. WESTPAC-HAB. Japón, pp.30.
- Mc. Lean, D.M., 1976. *Eocladopxis peniculatum* Morgenroth, 1966, Early tertiary ancestor of the modern dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Plate, 1906. Micropaleontol. 22 (3), 347-351.
- McMinn, A., 1989. Late pleistocene dinoflagellate cysts from Botaby Bay, New South Wales, Australia. Micropaleontol. 35,1-9.
- Meave del Castillo, M. E., Rodríguez-Salvador, R.S., Vargas-Montero, M., 2008. Blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in Central American coast South of Mexico. En: Moestrup, O. (Ed.). Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae. Copenhagen, Denmark, pp. 212.
- Montojo, M. U., Sakamoto, S., Cayme, F.M., Gatdula, C. N., Furio, F. E., Relox Jr., R.J., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M., 2006. Remarkable difference in accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins among bivalve species exposed to *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* bloom in Masinloc bay, Philippines. Toxicon 48, 85-92.

- Morales de la Garza, E.A., Carranza-Edwards, A., 1995. Sedimentos fosfatados en el Golfo de Tehuantepec. *Hidrobiológica* 5, 25-36.
- Morquecho-Escamilla, L., 2007. Presencia de estadios vegetativo y quístico de *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) en Isla San José, Golfo de California. II Taller sobre Florecimientos Algales Nocivos. Ensenada B.C., México. pp. 21.
- Morquecho, L., 2008. Morphology of *Pyrodinium bahamense* Plate (Dinoflagellata) near Isla San José, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae* 7, 664–670.
- Morquecho, L., Alonso-Rodríguez, R., Arreola-Lizárraga, J. A., Reyes-Salinas, A., 2010. Related factors during moderate blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* in two coastal lagoons from the southern Gulf of California. En: Population dynamic of Harmful Algae Blooms. 14. International Conference on Harmful Algae. Hersonissos-Crete, Greece, pp.43.
- Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim Y., Hansen, G., Hoppenrath, M., Larsen, J., Lundholm N., Nguyen, L.N., Zingone, A., (Eds.) 2009. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. <http://www.marinespecies.org/HAB.2010-06-04>.
- Orellana-Cepeda, E., Martínez-Romero, E., Muñoz-Cabrera, L., López-Ramírez, P., Cabrera-Mancilla, E., Ramírez-Camarena, C., 1998. Toxicity associated with blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in southwestern Mexico. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Proc. VIII Internl. Conf. on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, España, p. 60.

- Oshima, Y., Kotaki, Y., Harada, T., Yasumoto, T., 1984. Paralytic shellfish toxins in tropical waters. En: Ragelis, E.P., (Ed.), Seafood Toxins. American Chemical Society. Washington, USA, pp. 161–170.
- Oshima, Y., 1989. Toxins in *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* and infested marine organism. En: Hallegraeff, G.M., Maclean, J.L., (Eds.), Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium bahamense* red tides: ICLARM Conference Proceedings 21. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam and International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, pp. 207–217.
- Osorio-Tafall, B.F., 1942. Notas sobre algunos dinoflagelados planctónicos marinos de México, con descripción de nuevas especies. An. Esc. Nac. Cienc. Biol. I.P.N. 2, 435-450.
- Páez-Osuna, F., Ramírez-Reséndiz, G., Ruiz-Fernández, A.C., Soto-Jiménez, M.F., 2007. La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: flujos, fuentes, efectos y opciones de manejo. En: Páez-Osuna, F. (Ed.), Serie Lagunas Costeras de Sinaloa. UNAM, ICML, CODESIN, CESASIN SEMARNAT CONACYT. Sinaloa, México. pp. 304.
- Phlips, J.E., Badylak, S., Bledsoe, E., Cichra, M., 2006. Factors affecting the distribution of *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* in coastal waters of Florida. Mar. Ecol. Prog. Ser. 322, 99-115.
- Plate, L., 1906. *Pyrodinium bahamense* n. gen. n. sp. Die Leuchtperidineen de von Nasau, Bahamas Inseln. Arch. Protistenkd 7, 411-429.

- Peña-Manjarrez, J.L., Helenes-Escamilla, J., Gaxiola-Castro, G., Orellana-Cepeda, E., 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay, Baja California, México, 1999–2000. *Continental Shelf Res.* 25 (11), 1375–1393.
- Ramírez-Camarena, C., Muñoz-Cabrera, L., Cabrera-Mancilla, E., Castro-Ramos, A.R., López-Ramírez, P., Orellana-Cepeda, E., 1996. Identificación de la marea roja frente a la costa suroeste de México en oct-dic. 1995. En: 1ª Reunión Int. Planctología VIII Reunión Nac. SOMPAC. Pátzcuaro, Mich., p. 47.
- Rosignol, M., 1962. Analyse pollinique de sédiments marins quaternaires en Israel, II. Sédiments Pléistocènes. *Pollen Spores* 4, 121-148.
- Sakamoto, S., Yamaguchi, M., Furio, E.F., 2006. The life cycle of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Dinophyceae) in culture. En: 12th Internl. Conf. on Harmful Algae. Copenhagen, Denmark, pp. 58.
- Secretaría de Pesca 1990. Bases para el ordenamiento costero-pesquero de Oaxaca y Chiapas. Aspectos Generales. 1ra ed. México, pp. 129.
- Sierra-Beltrán, A., Cruz-Villacorta, A., Núñez-Vázquez, E., del Villar, L.M., Cerecero, J., Ochoa, J.L., 1998. An overview of the marine food poisoning in México. *Toxicon* 35, 447-453.
- Smayda, T.J., 2010. Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellate species in upwelling systems 1. Morphology and adaptive polymorphism. *Progress In Oceanography* 55:53-70.

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

Sotomayor-Navarro, O., Domínguez-Cuellar, E., 1993. Toxic red tide of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, in the Tehuantepec Gulf of Mexico and the Central American Pacific system. En: VI Internl. Conf. Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, France, p. 185.

Steidinger, K.A., Tester, L.S., Taylor, F.J.R., 1980. A redescription of *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* (Böhm) stat. nov. from Pacific red tides. *Phycologia* 19, 329–334.

Tamayo, J.L., 1991. Geografía Moderna de México. Ed. Trillas. México, pp. 400.

Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y., 1989. Morphological features of the motile cell of *Pyrodinium bahamense*. En: Hallegraeff, G.M., Maclean, J.L. (Eds.), Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium bahamense* red tides: ICLARM Conference Proceedings 21. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam, and International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, pp. 207–217.

Thronsen, J., 1978. Preservation and storage. En: Sournia, A. (Ed.) Phytoplankton Manual. UNESCO, Paris, pp.69-74.

Tollervey, A.G., 1989. *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* blooms in a tropical lagoon. En: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), Red tides: biology, environmental science and toxicology. Proceedings of International Symposium on Red Tides Biology, Environmental Science and Toxicology. Takamatsu, Japan. New York, Elsevier Science Publishing, pp. 129.

UNAM-Secretaría de Gobernación, 1988. Islas del Golfo de California, México. Inst. Biol. UNAM, pp. 292.

Usup, G., Kulis, D.M., Anderson, D.M., 1994. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Natural Toxins* 2, 254–26.

Vargas-Montero, M., Freer, E., 2003. Co-occurrence of different morphotypes of *Pyrodinium bahamense* during and extensive bloom in the gulf of Nicoya-Costa Rica. En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J., Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety*. Xunta Galicia, España IOC-UNESCO, pp. 211-217.

Vásquez-Bedoya, L.F., Radi, T., Ruiz-Fernández, A.C., de Vernal, A., Machain-Castillo, M.L., Kieft, J.F., Hillaire-Marcel, C., 2008. Organic-walled dinoflagellate cysts and benthic foraminifera in coastal sediments of the last century from the Gulf of Tehuantepec, South Pacific Coast of Mexico. *Mar. Micropaleontol.* 68, 49-65.

Wall, D., Dale, B., 1969. The “hystrichosphaerid” resting spore of the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Plate 1906. *J. Phycol.* 5, 140-149.

Wiese, M., D’Agostino, M.P., Mihali, K.T., Moffitt, C.M., Neilan, A.B., 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8, 2185-2211.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall. New Jersey, USA, pp. 663.

13. GLOSARIO

Antapical. Porción posterior de un organismo, opuesto al extremo anterior o apical.

Apical. Porción anterior de la célula, en el caso de los dinoflagelados generalmente asociada al complejo del poro apical.

Arqueópilo. Abertura del quiste que permite la salida del material citoplasmático mismo que origina a la célula vegetativa.

Cíngulo. Es un canal transversal, que rodea a la célula y alberga al flagelo transversal, la parte terminal del cíngulo puede ser ascendente o descendente y la separación de ambos extremos indica el grado de desplazamiento con respecto al lado de la célula.

Corado. Término utilizado para referirse a las estructuras de proyección o procesos que rodean al quiste y que pueden tener una longitud igual o mayor al 50% del diámetro del quiste.

Criterio. Consiste en una condición subjetiva que permite concretar una elección.

Cuerno apical. Prolongación de la epiteca, generalmente larga y angosta, ubicada en el ápice de la célula formada por placas apicales.

Cuerpo rojo. Es un orgánulo compuesto por pigmentos cuya función es ayudar al organismo a que se oriente hacia zonas donde hay mayor cantidad de luz cuando hay fototaxia positiva.

Dormancia. Estado de reposo metabólico relativo o fisiología disminuida.

Endofragma. Pared interna del quiste.

Epitractal. Término utilizado para hacer referencia al hemisferio superior del epiquiste

Fórmula tabular. Arreglo de las placas que presentan los dinoflagelados tecados de acuerdo a un patrón determinado.

Límite de detección. Cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada por un método analítico determinado.

Meroplancton. Organismos que pasan sólo alguna de las etapas de su ciclo de vida como parte del plancton, es decir presentan un estadio móvil en la columna de agua y uno no móvil este último en los sedimentos.

Nerítico. Que vive en zonas próximas al litoral.

Paraplaca. Término utilizado para la descripción de las placas en un quiste.

Perifragma. Pared externa del quiste.

Poró apical. Orificio relacionado con los poros y poroides, ubicado en la porción apical del organismo.

Poró posterior. Orificio que se localiza en la placa sulcal posterior del dinoflagelado.

Quiste de resistencia. Forma de resistencia dentro del ciclo vital de los dinoflagelados, resultado de una fusión de gametos.

Quiste temporal. Es una célula no-móvil que ha perdido los flagelos debido a un estado fisiológico y con capacidad de recuperación rápida.

Transdiámetro. Es la distancia medida en vista ventral a nivel del cíngulo, incluye las dos partes externas del cíngulo. También considerada como el ancho del organismo.

Poró tricocisto. Organelo intracelular utilizados para la captura de alimento y defensa.

Variedad. Organismos que comparten caracteres con la especie y que presentan rasgos morfológicos semejantes entre sí y que permite distinguirlos de otros organismos.

14. ANEXOS

14.1 Estatus taxonómico de *Pyrodinium bahamense*

La clasificación taxonómica propuesta por Fensome Taylor, Norris, Sarjeant, Wharton y Williams (1993) es la siguiente:

División Dinoflagelata

Subdivisión Dinokaryota

Clase Dinophyceae

Subclase Peridiniphycidae

Orden Gonyaulacales

Suborden Goniodomineae

Familia Goniodomaceae

Subfamilia Pyrodinoidea

Genero *Pyrodinium*

Especie *Pyrodinium bahamense*

Variedad *bahamense* Plate

compressum Böhm Steidinger, Tester et Taylor

14.2 Estatus taxonómico de *Polysphaeridium zoharyi*

La clasificación taxonómica es de acuerdo a Rossignol 1962, Lentin y Williams 1993, Fensome y Williams 2004.

División Pyrrophyta Pascher

Clase Dinophyceae Fritsch

Orden Peridiniales Haeckel

Familia Gonyaulacaceae Lindemann

Genero Hystrichosphaera O.Wetzel

Hemicystodinium Rossignol

Polysphaeridium Rossignol

Especie *Hemicystodinium zoharyi* (Rossignol)

Polysphaeridium zoharyi (Rossignol 1962, Bujak *et al.* 1980)

14.3 Soluciones A y B (Fase móvil) y gradiente binario para análisis de toxinas en HPLC.

Solución A.

- Formiato de amonio 0.1M
- Ácido acético 0.1M

Solución B

- Formato de amonio 0.1M
- Acetonitrilo 5%
- Ácido acético 0.1M

Gradiente binario.

TIEMPO (min)	% Sol. A	% Sol. B	Flujo (ml/min)
0	100	0	2.0
5	95	5	2.0
9	30	70	2.0
10	30	70	2.0
14	100	0	2.0