

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Evaluación de sxtA (Saxitoxina) para determinar el potencial
toxicológico de *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp. en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

Andrea Alejandra Vega Dávila

para optar por el grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Evaluación de sxtA (Saxitoxina) para determinar el potencial
toxicológico de *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp. en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

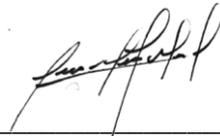
Andrea Alejandra Vega Dávila

para optar por el grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2022

Vo. Bo.

(f)  _____

MSc. José Miguel Morales Santiago (Asesor principal)

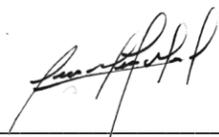
Tribunal examinador

(f)  _____

MSc. Gabriela Alfaro Marroquín

(f)  _____

PhD. Ana Hacoheh Domené

(f)  _____

MSc. José Miguel Morales Santiago

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala 13 de junio del 2022

PREFACIO

Cuando me cambié al departamento de Biología supe que me gustaba todo lo que fuera microscópico; desde entonces realicé proyectos enfocados a bacterias, microorganismos y finalmente plancton. Fue para el curso de Invertebrados I en el que me empecé a interesar por el plancton y en especial los dinoflagelados y posteriormente en el curso de Ecología Aplicada en el que realizamos un proyecto de diversidad de plancton en el Pacífico guatemalteco.

En otros cursos escuché algunas charlas de estudios moleculares en plancton y esto inmediatamente captó mi atención. Lo platicué con mi asesor principal MSc. José Miguel Morales y muy realista me dijo que lo pensara bien porque era algo bastante difícil de hacer. También gracias a que estaba haciendo horas de extensión con un proyecto realizado por el European Regional Centre for Ecohydrology of the Polish Academy of Sciences, Tylina; contacté con Arnoldo Font quien fue clave para llegar a desarrollar la idea de mi trabajo de tesis

Las limitaciones principales de este estudio radican en las muestras en los medios de fijación, dado que de estas muestras no se logró realizar la extracción con ADN íntegro para amplificar todos los marcadores contemplados, además el número de muestras frescas también fue limitado al igual que el número de células de dinoflagelados, especialmente de *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* sp.

Este trabajo de tesis ha sido más difícil de lo que imaginé, pero agradezco a cada una de las personas que me han acompañado durante el proceso. Primeramente, agradezco a mis amados padres Andrea y Juan Carlos quienes me han apoyado desde siempre a seguir mis sueños y cumplir mis metas y son la base de quien soy yo. A mis hermanos Cuco y Lizy quienes son las personas más nobles que conozco y que siempre tienen una broma o un abrazo disponible para todos. A mi tía Sary que ha sido un apoyo y una amiga desde que tengo memoria y a mi prima Adrianita que me enseña su perspectiva del mundo. Agradezco a mis abuelos Susana y Fidencio que me dan su cariño y se preocupan por mí. A mi mamá Sara que siempre me consiente, me apoya y me anima. Agradezco también a El Flaquito que, aunque ya no pueda verlo, siempre me acompañaba en las noches de tareas y de escribir el protocolo de esta tesis. A La Rosalía que, aunque no quería que me diera cuenta me acompañó muchas noches a un costado del sillón.

Agradezco de corazón a Arnoldo Font Nájera, que aún sin conocerme se emocionó con la idea de tesis y me ayudó a aterrizarla, compartiendo su conocimiento conmigo y reuniéndose por zoom para orientarme y aconsejarme. También agradezco a Josué García Pérez quien me proporcionó las muestras del CEMA-USAC y depositó su confianza en mí y en la UVG para llevar a cabo el presente trabajo de tesis.

Agradezco por supuesto a mi querido mentor, amigo y cuñado, el asesor principal de este trabajo de graduación José Miguel, que desde que entré a la U me ha acompañado y guiado desde que lo conozco. Agradezco a mi novio Rodrigo Morales que desde que me conoció me ha apoyado, me ayuda a calmarme y de quien he aprendido muchísimo en este último año y que además se desveló conmigo hasta que ya no pudo para asegurarse que terminara a tiempo. Agradezco al resto de mis amigos y familiares. Agradezco a Kristen Wever y Roberto Wever que a pesar de no conocerme mucho pusieron su confianza en mí y me apoyaron para seguir con mis estudios en la UVG. También agradezco a Luis Ríos quien se interesó por el plancton al igual que yo. Agradezco a la UVG y al Departamento de Biología, especialmente a Gaby, que como directora nos apoya en las ideas y proyectos que tengamos. Finalmente agradezco a PhD. Ana Hacoheh Domené por aceptar ser parte de la terna evaluadora, aunque fuera en el último momento y por sus enseñanzas durante la carrera.

ÍNDICE

Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción	1
ii. Marco teórico	2
A. Zonas marino-costeras de guatemala.....	2
B. Plancton.....	5
C. Dinoflagelados	5
D. Pyrodinium bahamense	8
E. Alexandrium spp.	10
F. Fan en guatemala.....	11
G. Monitoreo y manejo de fan en el mundo.....	12
iii. Justificación.....	15
Iv. Objetivos	16
A. General	16
B. Específicos	16
V. Metodología	17
A. Muestras	17
B. Visualización de las muestras.....	19
C. Procesamiento de muestras antes de la extracción	20
D. Pruebas de diferentes protocolos de extracción de adn	20
E. Cuantificación e integridad del adn	23
F. Selección del protocolo de extracción y extracción de adn	24
G. Amplificación y visualización del adn	24
H. Optimización de reacciones de pcr.....	25
Vi. Resultados	28
A. Identificación de p. Bahamense y alexandrium sp.y amplificación de adn de dinoflagelados.....	28
B. Selección del protocolo de extracción y extracción de adn	33
C. Amplificación del gen precursor de saxitoxina sxta.....	42
Vii. Discusión.....	46
A. Detección de alexandrium y pyrodinium bahamense con marcadores moleculares y microscopía óptica.....	46
I. Protocolo de extracción.....	47
J. Amplificación del gen precursor de saxitoxina sxt.....	49
Viii. Conclusiones.....	53
Ix. Recomendaciones.....	54
X. Literatura citada.....	56
Xi. Anexos.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Listado de actores relevantes en el pgimc.....	3
Figura 2 Síntesis de las amenazas relacionadas con el clima en ambientes marino-costeros.....	4
Figura 3. Funciones de las toxinas producidas por los dinoflagelados.....	7
Figura 4. Segmentación y patrones de la teca de <i>p. Bahamense</i> en el esquema kofoidiano.....	8
Figura 5. Quistes de diferentes organismos de <i>pyrodinium bahamense</i> colectados en distintas localidades.....	9
Figura 6. Morfología y patrones de placas de distintas especies del género <i>alexandrium</i>	11
Figura 7. Distribución de fan causante de psp a nivel global.....	13
Figura 8. Muestras colectadas en el caribe guatemalteco en 2017 por el cema-usac.....	17
Figura 9. Muestras colectadas en el pacífico guatemalteco en los años de 2018 a 2022.....	19
Figura 10. Imágenes vistas en microscopio óptico con aumento de 40x y 100x.....	28
Figura 11. Productos de pcr para adn dinoflagelados en pruebas.....	29
Figura 12. Producto de pcr para adn dinoflagelados para muestras de prueba.....	30
Figura 13. Producto de pcr para adn dinoflagelados para muestras del cema-usac.....	31
Figura 14. Producto de pcr para adn dinoflagelados para muestras del cema-usac y del lago de amatitlán.....	32
Figura 15. Producto de pcr para adn dinoflagelados para muestras frescas.....	33
Figura 16. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y cantidad de adn extraído.....	34
Figura 17. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y calidad en a260/280nm.....	35
Figura 18. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y calidad en a260/230nm.....	36
Figura 19. Diagrama de caja y bigotes de medios y cantidad de adn extraído.....	37
Figura 20. Diagrama de caja y bigotes de medios y calidad de adn en a260/280nm.....	38
Figura 21. Diagrama de caja y bigotes de tipos de muestra y cantidad de adn extraído.....	39
Figura 22. Diagrama de caja y bigotes de tipos de muestra y calidad en a260/280nm.....	40
Figura 23. Gel de integridad de muestras frescas.....	41
Figura 24. Gel de integridad de muestras proporcionadas por el cema-usac y del lago.....	41
Figura 25. Productos de pcr para el gen sxt en muestras frescas.....	42
Figura 26. Productos de pcr para el gen sxt con cebadores combinados.....	44
Figura 27. Producto de pcr para adn orientado a <i>p. Bahamense</i>	71
Figura 28. Producto de pcr para adn orientado a dinoflagelados.....	71
Figura 29. Productos de pcr para el gen sxt con cebadores combinados.....	72
Figura 30. Productos de pcr para cebadores orientados a sxt en muestras frescas (marzo 2022) y muestras del fan de mayo 2022.....	73
Figura 31. Distintos dinoflagelados observados por microscopía en las muestras analizadas. 40x.....	74
Figura 32. Ensayo de pcr in silico realizado para cebadores orientados al gen sxt combinados.....	75
Figura 33. Organismos planctónicos observados por microscopía óptica en distintas muestras con magnificación 100. ...	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Soluciones preparadas para el protocolo a.....	20
Cuadro 2. Soluciones preparadas para el protocolo b.....	21
Cuadro 3. Soluciones preparadas para utilización en protocolo c y d	22
Cuadro 4. Concentraciones de reactivos para las reacciones de pcr realizadas	25
Cuadro 5. Programas de pcr utilizados para cebadores dinoflagellata-cianobacteria.....	25
Cuadro 6. Programas de pcr utilizados para cebadores orientados a <i>pyrodinium bahamense</i>	26
Cuadro 7. Programas de pcr utilizados para cebadores orientados al género <i>alexandrium</i>	26
Cuadro 8. Programas de pcr utilizados para cebadores orientados al gen sxta4-	27
Cuadro 11. Tasa de amplificación de los cebadores utilizados	45
Cuadro 12. Descripción de muestras colectadas por el cema-usac.....	63
Cuadro 13. Cebadores utilizados	64
Cuadro 14. Muestras de prueba preparadas para selección de protocolos de extracción.....	64
Cuadro 15. Cuantificación de adn para pruebas de protocolos.....	66
Cuadro 16. Descripción y cuantificación de adn para todas las muestras	67
Cuadro 17. Conteo de células de dinoflagelados observados en las alícuotas de distintas muestras.....	70

Evaluación de sxtA (Saxitoxina) para determinar el potencial toxicológico de *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp. en Guatemala.

Resumen

El plancton está conformado por todos los organismos flotantes en la columna de agua, este se puede clasificar por su tamaño, metabolismo o tipo de producción (autótrofo, mixótrofo y heterótrofo). Los dinoflagelados son clasificados en mixótrofos y autótrofos en su mayoría y son organismos planctónicos importantes en los ecosistemas acuáticos a nivel global. En el mar existen más de 1,500 especies de dinoflagelados los cuales varían en forma, procesos bioquímicos, fisiológicos, etc. Uno de los roles más importantes por los que se conoce a los dinoflagelados es la producción de toxinas. Es importante el estudio de los dinoflagelados productores de toxinas ya que estos son los causantes de los florecimientos de algas nocivas FAN. El monitoreo de dinoflagelados productores de FAN se realiza normalmente con conteo de células e identificación morfológica, sin embargo, la identificación molecular es necesaria y cada vez ha ido tomando más importancia y relevancia. Mediante este estudio, se buscó establecer un método de detección molecular de *P. bahamense* y *Alexandrium* spp. ya que estos son importantes causantes de FAN alrededor del mundo y en Guatemala. Conjuntamente, se realizó la amplificación del gen precursor de la saxitoxina SXT en su dominio sxta4- con distintos marcadores moleculares para detectar el potencial toxicológico de los puntos muestreados. Se utilizaron muestras proporcionadas por el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, Universidad San Carlos de Guatemala (CEMA-USAC) colectadas en el Pacífico y Atlántico guatemalteco, muestras sin fijador y muestras provenientes del lago de Amatitlán. Se logró identificar morfológicamente por microscopía óptica a *P. bahamense* y *Alexandrium* spp. Además, también se estableció un protocolo de extracción de ADN efectivo y de bajo costo para la extracción de muestras de plancton fijadas y frescas. Se logró realizar la amplificación del dominio sxta4- en muestras sin fijador (frescas) y provenientes del lago de Amatitlán; esto debido a que en el lago se encuentra gran cantidad de cianobacteria productoras de saxitoxina y a la mejor integridad de las células y el ADN utilizando muestras frescas. Es necesario realizar mayores estudios en el gen SXT para establecer métodos de monitoreo de este gen y desarrollar monitoreos costo-efectivos para el potencial toxicológico en las costas previo a los FAN.

Abstract

Plankton is made up of all the floating organisms in the water column, it can be classified by its size, metabolism or type of production (autotrophic, mixotrophic and heterotrophic). Dinoflagellates are classified as mostly mixotrophs and autotrophs and are important planktonic organisms in aquatic ecosystems globally. In the sea there are more than 1,500 species of dinoflagellates which vary in form, biochemical and physiological processes, etc. One of the most important roles dinoflagellates are known for is the production of toxins. The study of toxin-producing dinoflagellates is important as these are the cause of (HAB) harmful algal blooms. The monitoring of HAB-producing dinoflagellates is normally carried out with cell counts and morphological identification, however, molecular identification is necessary and has become increasingly important and relevant. Through this study, we sought to establish a molecular detection method for *P. bahamense* and *Alexandrium* spp. since these are important causes of HAB around the world and in Guatemala. Together, the amplification of the SXT saxitoxin precursor gene in its *sxta4*- domain was carried out with different molecular markers to detect the toxicological potential of the sampled points. Samples shown by CEMA-USAC, fresh samples and samples from Lake Amatitlán were used. It will be modified to morphologically identify by light microscopy *P. bahamense* and *Alexandrium* spp. In addition, an effective and low-cost DNA extraction protocol for the extraction of fixed and fresh plankton samples was also established. The amplification of the *sxta4*- domain was carried out in fresh samples and samples from Lake Amatitlán; This is due to the fact that a large number of saxitoxin-producing cyanobacteria are found in the lake and to the better integrity of cells and DNA using fresh samples. Further studies on the SXT gene are needed to establish monitoring methods for this gene and to develop cost-effective monitoring for toxicological potential on shorelines prior to HABs.

I. Introducción

Los dinoflagelados son importantes organismos planctónicos que desempeñan varios roles en los ecosistemas acuáticos. En el ecosistema marino, existen más de 1,500 especies de dinoflagelados, los cuales son muy importantes para la red trófica marina y presentan distintas morfologías, fisiologías y productos bioquímicos (Hackett, Anderson, *et al.*, 2004). Uno de los productos bioquímicos más importantes de estos organismos son las toxinas. Existe una gran variedad de toxinas producidas por dinoflagelados que son causantes de los Florecimientos de Algas Nocivas (FAN) los cuales causan pérdidas económicas y pesqueras en todo el mundo. En Guatemala se han estudiado FAN asociados a saxitoxina producida por *P. bahamense* desde 1987 representando pérdidas económicas y de vidas humanas. En 1991 se establece La Comisión Nacional para la Vigilancia y Control de Marea Roja Tóxica encargada de los conteos de células de *P. bahamense* y otros dinoflagelados asociados a FAN en Guatemala (MARN, 2010).

Con este estudio se buscó establecer un método de identificación de *P. bahamense* y el género *Alexandrium* asociados a FAN en Guatemala para el monitoreo y prevención de estos florecimientos. Así mismo, la identificación del gen precursor de saxitoxina *sxtA* para definir el potencial toxicológico de los distintos puntos en las costas del país. Además, se logró realizar la extracción de ADN en diferentes muestras de plancton marino fijadas en distintos medios.

Las muestras utilizadas fueron donadas por el CEMA-USAC y colectadas en los años de 2017-2022, además se utilizaron muestras colectadas en el lago de Amatitlán y muestras colectadas por estudiantes de la UVG en marzo de 2022. Se probaron distintos protocolos de extracción de ADN, los cuales con base en los criterios de calidad y cantidad de ADN extraído en ng/μL se seleccionó uno el cual se utilizó con todas las muestras y se procedió a la amplificación con varios marcadores moleculares. Se utilizó un marcador específico para *P. bahamense*, uno para *Alexandrium* spp., un marcador específico para el dominio *sxt4*- del gen *sxtA* para detectar el potencial toxicológico de los sitios muestreados.

Se obtuvo una tasa de amplificación baja para el gen *sxtA* la cual fue del 14% (Cuadro 6) y no se logró amplificar el marcador específico para *P. bahamense* y *Alexandrium* spp. Esto debido probablemente al origen de las muestras, ya que, en muestras frescas, es decir sin sustancia de fijación, se logró extraer mayor ADN y de mejor calidad que en muestras con distintos medios de fijación (Figura 18 y 19). También se logró identificar el potencial toxicológico de muestras colectadas en Las Lisas, Santa Rosa en marzo de 2022. La especie *P. bahamense* fue identificada vía microscopía óptica y también electrónica de barrido por (García-Pérez *et al.*, 2020a) debido al FAN que se presentó en 2018. Se identificaron pocos individuos de *Alexandrium* spp. para la identificación específica de los cuales se necesita mayor observación.

La evaluación del gen *sxtA* resultó exitosa y efectiva para muestras sin sustancia fijadora. El método de extracción de muestras de plancton también es efectivo, mostrando mejores resultados en muestras frescas como se mencionó anteriormente. Se recomienda el uso de otras técnicas moleculares como qPCR, secuenciación de nueva generación, entre otras. Además, se recomienda el establecimiento de cultivos de estos dinoflagelados para mejorar el método de detección molecular específica y realizar más estudios del potencial toxicológico y establecerlo como un método de monitoreo rutinario.

II. Marco teórico

A. Zonas marino-costeras de Guatemala

La zona marino-costera (ZMC) del pacífico guatemalteco, ubicada en la Costa Sur de Guatemala, es reconocida por su gran belleza paisajística de playas, manglares, lagunas y por la riqueza de sus suelos que permite a las comunidades locales realizar múltiples actividades económicas proveyendo bienestar local y nacional (Ortiz & Martínez-Dubón, 2020). Es clave mantener los servicios ecosistémicos que la ZMC brinda ya que estos permitirán alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) proporcionando beneficios económicos a pescadores, criadores de cangrejos, lancheros, entre otras, estas zonas ayudan a cumplir el ODS 1 y 2, fin de la pobreza y hambre 0. Además de ser grandes zonas de captación de CO₂ y producción, especialmente las zonas de afloramientos cumpliendo con el ODS 13, cuidar el bentos marino-costero es importante también para preservar la vida submarina (ODS 14) este se alcanza utilizando de manera sostenible los recursos marinos y potenciando el desarrollo sostenible para complementar el cumplimiento de otros objetivos (MARN, 2018).

Guatemala es parte de la Red Iberoamericana de Oficinas de Cambio Climático, en la cual se busca el manejo integral y la mitigación del deterioro de zonas marino-costeras como estuarios, manglares, lechos de pastos marinos, arrecifes coralinos, bosques de macroalgas y regiones de aguas profundas (bentos). La importancia del manejo integrado de la ZMC se puede llevar a cabo dando un Enfoque Ecosistémico a la Pesca para que se busque mantener a las poblaciones de manera íntegra y evitar causar alteraciones mayores en cuanto al ciclaje de nutrientes y la red trófica marina, también la Zonificación con el fin de establecer áreas protegidas según la zona de importancia o una región que abarque varias zonas y reforzar la Institucionalidad y legislación nacional siendo autores claves de estas reformas las universidades y demás instituciones que generen información (Figura 1) (Ortiz & Martínez-Dubón, 2020).

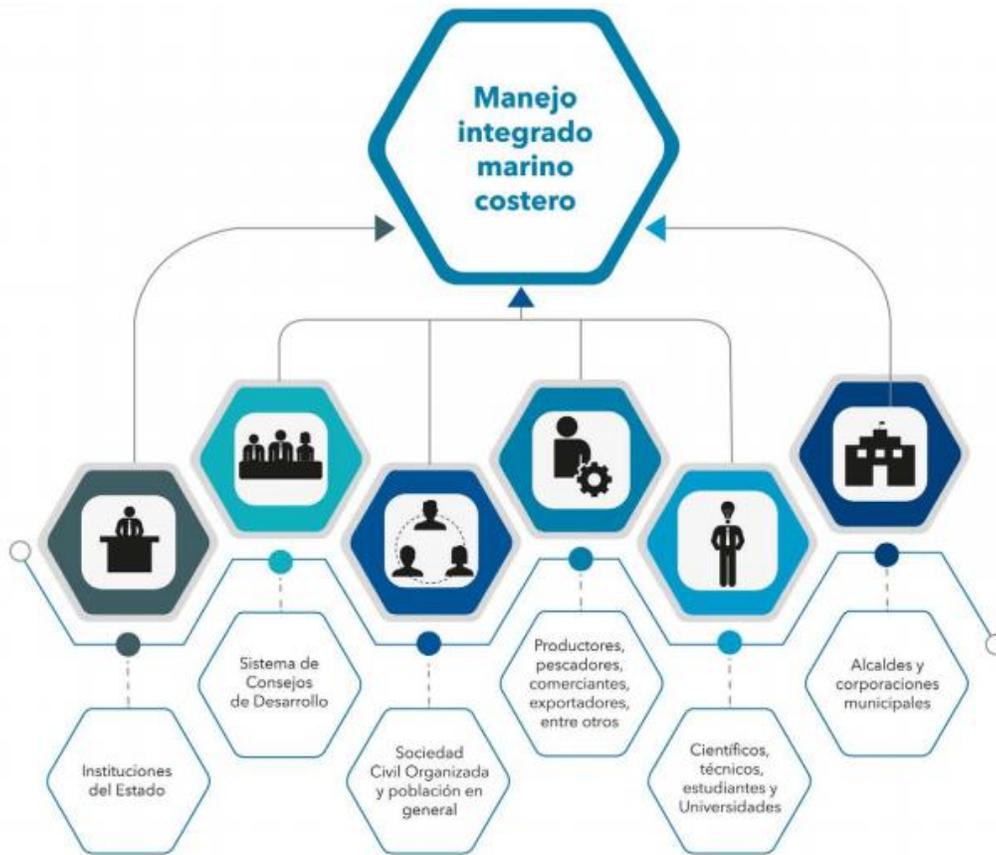


Figura 1. Listado de actores relevantes en el PGIMC.

Fuente: (MARN, 2018).

Como se puede observar, la comunidad científica y Universidades son parte clave para lograr el manejo integrado de la ZMC de Guatemala.

La diversidad planctónica es alta pues se cataloga a la ZMC guatemalteca de alta productividad primaria en la cual se establecen afloramientos de algas y se mantienen alta afluencia de plancton inferida por la cantidad de ballenas que se avistan en esta área. Además, históricamente se sabe que el bentos de la ZMC ha sido deteriorado por la pesca de arrastre, sin embargo no existe una caracterización del estado del bentos ni de los microorganismos que lo conforman y cómo estos pueden estar afectador por las actividades en las zonas pelágicas afectan el bentos continental (Ocampo, 2012).

La zona marino-costera, está siendo impactada por actividades humanas de forma directa e indirecta y también por los efectos del cambio climático y otras amenazas (Figura 2). A lo largo de las últimas décadas, se ha visto amenazada por la pesca intensiva y de arrastre para camarón, pez vela, entre otras y con esto se ven afectadas especies bénticas y zonas de importancias como bosques de macroalgas los cuales son muy productivos y proporcionan una gran cantidad de hábitat para distintas especies (Pennington *et al.*, 2006). Además, los efluentes de ríos que conllevan desechos sólidos y aguas residuales a las zonas marinas afectando las zonas pelágicas que son las principales pesquerías del mundo y las especies de importancia como atunes, sardina ibérica y otras

cada vez se extienden a zonas más profundas lo que provoca una mayor probabilidad de accidentes para pesqueros artesanales y menor ingreso económico (MARN, 2010). Una amenaza creciente para las zonas marino-costeras tanto de Guatemala como a nivel mundial son los Florecimientos de Algas Nocivos (FAN) o HAB por sus siglas en inglés. Estos son eventos naturales que se dan gracias al ciclo natural de nutrientes, sin embargo, han ido incrementando en la última década causando pérdidas económicas considerables y desequilibrio en las cadenas tróficas marinas (Petricioli *et al.*, 1996). Al aumentar la frecuencia de mareas rojas se deberá establecer sistemas de monitoreo, predicción y consecuencias en el resto de las comunidades planctónicas (Murray *et al.*, 2011). Además, es importante el estudio de los efectos del cambio climático para las comunidades pelágicas pues con el aumento de temperatura, también aumenta la reproducción de medusas lo cual afecta la afluencia turística y seguridad humana en playas y zonas marino-costeras (Shin *et al.*, 2017; Vollenweider *et al.*, 2016).

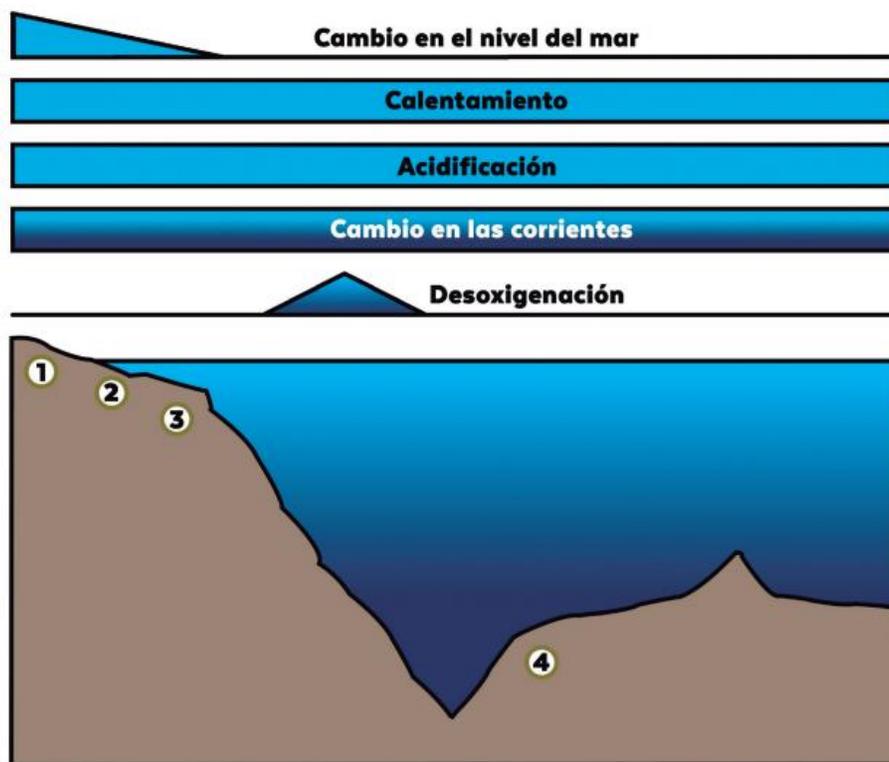


Figura 2 Síntesis de las amenazas relacionadas con el clima en ambientes marino-costeros.

[1] zona intermareal (playas, estuarios, manglares, marismas), [2] ambientes someros (pastos marinos, arrecifes coralinos, fondos blandos y duros), [3] plataforma continental [plancton, bentos, ambientes pelágicos, sitios de emisión de metano y [4] zonas profundas.

Fuente (Cortés *et al.*, 2020)

B. Plancton

Se define como plancton a la comunidad de organismos que existe tanto suspendidos en la columna de agua como flotando cerca de la superficie en un cuerpo de agua con muy poca o ninguna locomoción. Estos organismos se movilizan gracias a las corrientes hacia donde el flujo de agua los lleve. Los organismos planctónicos pueden dividirse en categorías según su función, tamaño, movilidad, hábitat, entre otras. Aquellos organismos capaces de movilizarse en contra de las corrientes conforman el necton (Conde-Porcuna *et al.*, 2004). Los organismos que viven en el fondo de la columna de agua son parte del bentos. El plancton es la base del ecosistema marino pues son los encargados de captar la energía del sol y difundirla en el océano (Garstecki *et al.*, 2000).

Anteriormente se clasificaba al plancton en zooplancton y fitoplancton, sin embargo, actualmente se clasifican a los organismos planctónicos como autótrofos, heterótrofos y mixótrofos (Mansour & Anestis, 2021). Las comunidades pelágicas son aquellas que habitan la zona fótica de la columna de agua (donde penetra la luz del sol) y son mayormente autótrofas y mixótrofas, las cuales además aportan el 50% del oxígeno global necesario para la vida terrestre (Tunin-Ley *et al.*, 2009). Los heterótrofos por otra parte son consumidores primarios y estos suelen tener migración vertical; durante el día se mantienen alejados de la superficie para evitar los rayos del sol directos y durante las noches suben para alimentarse. La migración vertical se da debido a los cambios de temperatura de la columna de agua dada la radiación solar que esta absorba, esto crea una estratificación que cambia a lo largo del día y por ello se da la migración vertical de muchos copépodos, también se ha visto respuesta de estos hacia presencia de depredadores y otras variables medioambientales, esto explicado mayormente en estudios especie-específicos como *Acartia hudsonica*, copépodo cuya migración vertical está relacionada con la abundancia de peces pelágicos, transparencia y estratificación termal de la columna de agua (Bollens *et al.*, 1992).

Por su parte, las comunidades autótrofas y mixótrofas suelen mantenerse mayormente en la zona pelágica y están constituidas por microalgas verdes, doradas y rojas, diatomeas, dinoflagelados y cianobacterias. Además de ser los mayores productores primarios del planeta, las comunidades de dinoflagelados tienen relevancia pues algunos producen florecimientos algales nocivo (FAN), también conocidos como mareas rojas y son importantes atractores de turismo pues también son los responsables de la bioluminiscencia en ciertas playas (Hernandez-Becerril & Alonso-Rodríguez, 2004). Sin embargo, estas comunidades al ser tan importantes, también son muy susceptibles a cambio climático pues los FAN pueden resultar en un declive de la productividad primaria de las costas dada la eutrofización de las éstas por la alta afluencia de nutrientes de ríos que llevan aguas residuales, desechos sólidos y desechos químicos de origen antropogénico (Buskey *et al.*, 2016).

C. Dinoflagelados

Los dinoflagelados (Alveolata: Dinophyceae), constituyen uno de los grupos más abundantes y diversos de organismos planctónicos unicelulares. Habitan tanto ecosistemas marinos como de agua dulce (Spector, 1984). Constan de una cubierta en la pared celular o “teca” formada de celulosa u otros polisacáridos que hacen la pared más rígida. Esta se divide en dos partes superior e inferior separadas por el surco transversal que da lugar a uno de los flagelos encargado de dar un movimiento giratorio y fuerza propulsora, mientras que el otro es longitudinal y da dirección (Hackett, Anderson, *et al.*, 2004). Este grupo consta de más de 2,000 especies que normalmente son descritas e identificadas morfológicamente aunque recientemente se han implementado técnicas moleculares para dilucidar su filogenia y clasificación (Gomez, 2012). Son organismos que

desempeñan funciones muy importantes en los ecosistemas acuáticos. Poseen una gran diversidad de fisiologías, características morfológicas y propiedades bioquímicas; algunos tienen paredes celulares desnudas y otros con ambas tecas pueden presentar protuberancias que dan la impresión de cuernos, collares o manos (Taylor *et al.*, 2008). Varios de estos son parte de la comunidad “fitoplanctónica”, siendo productores primarios constituyendo así la base de la cadena trófica acuática (Spector, 1984; Taylor *et al.*, 2008).

Otra característica importante es la bioluminiscencia. Los dinoflagelados son los únicos organismos fotosintéticos capaces de este comportamiento, dado por la enzima luciferasa, su sustrato la luciferina y una proteína que se une a la luciferina. Emiten una luz cercana a los 490nm por ello se da un color azul-verde y es efectiva para la interacción entre organismos pues coincide con la mayoría de los fotorreceptores de los organismos marinos. No todos los dinoflagelados son bioluminiscentes e incluso hay cepas bioluminiscentes y no bioluminiscentes para la misma especie, la función sugerida de esta característica es que disminuye la depredación por copépodos (Buskey & Swift, 1983; Hackett, Anderson, *et al.*, 2004).

Los dinoflagelados también son conocidos por ser simbioses de muchos otros organismos, entre los cuales figuran como más importantes los bivalvos, radiolarios, anémonas y la relación más famosa es con los corales formadores de arrecifes pues los dinoflagelados aportan sus pigmentos, nutrientes y calcificación (Hackett, Anderson, *et al.*, 2004; Marshall, 1996). Son capaces de dirigir el comportamiento de natación en respuesta a ciertas condiciones y parámetros del agua, como los químicos, la luz o la gravedad. Debido a estos comportamientos de natación se han observado los fenómenos de migración vertical a distintas profundidades de la columna de agua (Spector, 1984).

En el ambiente marino hay más de 1,500 especies de dinoflagelados, que pueden ser fotótrofos, fagótrofos o mixótrofos (Gomez, 2012; Taylor *et al.*, 2008). Algunas especies y géneros de dinoflagelados son los causantes de los florecimientos de algas nocivas (FAN) o “mareas rojas” y eso se debe a la cantidad alta de toxinas que producen y liberan (Anderson, Alpermann, *et al.*, 2012). Estas toxinas tienen distintas funciones. Por ejemplo, las karlotoxinas tienen una función alopatrica pues inhiben el crecimiento de plancton concurrente y también inmovilizan a presas potenciales (Waggett *et al.*, 2008), además, las saxitoxinas y brevetoxinas pueden desempeñar un papel en la reducción del pastoreo, reduciendo la depredación específicamente por copépodos y afectando el comportamiento (Borbolla *et al.*, 2006; Colin & Dam, 2003; Verma *et al.*, 2019); sin embargo aún existen otras funciones celulares no identificadas que estos compuestos puedan tener (Figura 3).

Se ha reportado que las toxinas liberadas por estos organismos pueden ser extremadamente peligrosas y tóxicas para la vida marina incluso en pequeñas dosis resultando en varios síndromes de intoxicación como la Intoxicación paralizante (PSP) (Wang, 2008). La PSP es causada por la saxitoxina, neosaxitoxina y otros derivados; esta toxina es producida principalmente por dinoflagelados del género *Alexandrium*, como *Alexandrium tamarense*, *A. cantenella*, etc y por la especie *Pyrodinium bahamense* (Anderson, Alpermann, *et al.*, 2012; Usup *et al.*, 1994). Otros géneros y especies importantes en la producción de toxinas son *Gymnodinium spp.*, *Protoceratium reticulatum*, *Gambierdiscus spp.*, *Protoperidinium crassipes*, *Karenia brevis*, *Chantonella spp.*, entre otros los cuales afectan a toda la vida marina que en casos extremos puede incluso causar muerte en seres humanos; algunos de los vectores de estas toxinas para los seres humanos son gasterópodos, crustáceos como los camarones, y peces (Baden & Mende, 1982; Carreto & Lasta, 1981; Pérez-Gómez *et al.*, 2006).

Se conoce que la mayoría de toxinas producidas por dinoflagelados son neurotoxinas y estas tienen receptores específicos que bloquean los canales de sodio, potasio y calcio (Jeong *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2004; Wang, 2008). En Latinoamérica las toxinas más estudiadas y conocidas son la saxitoxina, ciguatera y brevetoxina ya que han sido las presentes en los FAN más conocidos y perjudiciales. Son de gran importancia la especie *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* y aproximadamente doce especies del género *Alexandrium* (Baden & Mende, 1982; Band-Schmidt *et al.*, 2019).

La biosíntesis de estas toxinas está mediada por distintas rutas bioquímicas con ciertas bases genéticas (Baden & Mende, 1982; Verma *et al.*, 2019). El genoma de los dinoflagelados consta de una composición alta de citosina y guanina (45% - 70%) y se encuentra ampliamente metilado, el genoma nuclear es altamente quimérico y su contenido genético es bajo pues solo poseen de $37-87 \times 10^3$ genes codificantes de proteínas que represen solo el 0.05%-1.8% del genoma total (Verma *et al.*, 2019). Los policétidos son un grupo largo y complejo de estructuras de carbono a los cuales están ligadas la mayoría de las toxinas dependiendo de su estructura. La biosíntesis de los policétidos está dada por dominios de la β -ketosintasa (KS) y dependiendo de las distintas adiciones a la cadena de carbonos es como se forman los precursores y las estructuras de las distintas toxinas, los genes precursores de toxinas se llaman PKS (Verma *et al.*, 2019). La complejidad de la maquinaria genética hace tedioso el estudio y extracción del ADN en dinoflagelados sin embargo; técnicas de transcriptómica y secuenciación de nueva generación han hecho posibles mejores estudios para dilucidar la ecología, biología y metabolismo único de los dinoflagelados (Hackett, Yoon, *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2019).

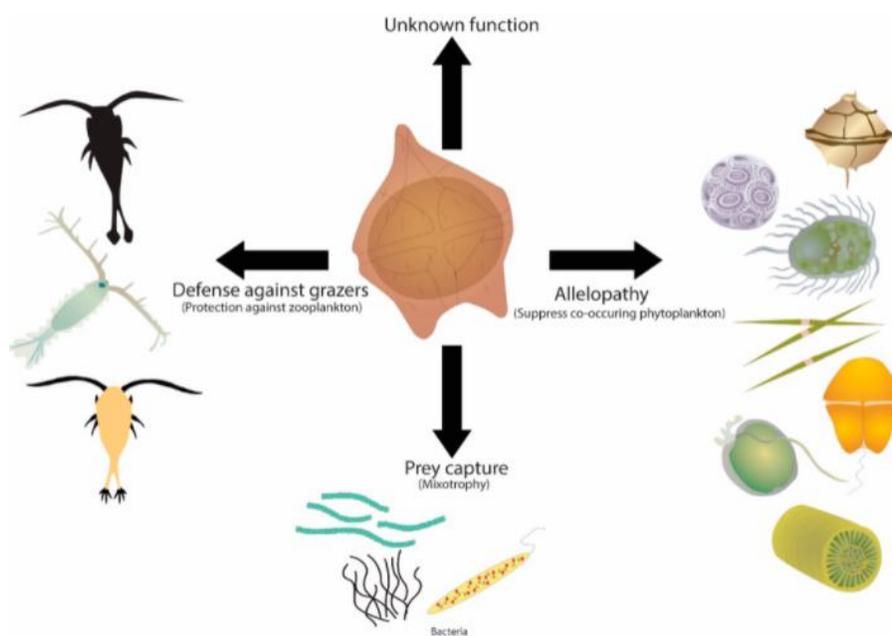


Figura 3. Funciones de las toxinas producidas por los dinoflagelados.

Como se puede observar algunas aún son desconocidas.

Fuente (Verma *et al.*, 2019).

D. *Pyrodinium bahamense*

La especie *P. bahamense* (Gonyaulacales, Dinophyceae) fue descrita originalmente en la Isla de Nueva Providencia, Bahamas. La especie se distribuye en el Pacífico desde el sur del golfo de California hasta Colombia y en el Atlántico desde el Golfo de México hasta Uruguay (Usup *et al.*, 2012) y ha sido vinculada en múltiples ocasiones a FAN. La primera vez que se reportó un FAN en Latinoamérica fue en Guatemala 1987 causando 175 intoxicaciones y 26 muertes (Hallegraeff, 1989).

Los criterios que caracterizan a *P. bahamense* son el cuerno apical sin espina apical prominente, cuerpo comprimido anterior y posteriormente, formación de cadenas largas, apariencia de cinco placas apicales, poros y marcas superficiales evidentes y producción de neurotoxinas. La fórmula Kofoidiana de la teca de *P. bahamense* es Po, pc, 4', 0a, 6'', 6c, 5 +?s, %''', 2''' (Figura 3). El poro ventral en la parte apical presenta forma de coma. Una proyección apical se forma alrededor del poro apical, esta proyección puede variar en los distintos individuos. La proyección izquierda es más grande que la derecha y a veces está adornada con una membrana (Figura 4). El largo de esta membrana varía con la formación de cadenas (Usup *et al.*, 2012).

Se ha caracterizado por poblaciones tóxicas y por constituirse de dos variedades, una Indo-Pacífica designada “compressum” y la variante Atlántico-Caribe “bahamense” aunque se ha demostrado que la distribución de ambas variedades se ha extendido de su rango original y ambas tienen co-ocurrencias en distintas áreas (Gárate-Lizárraga & González-Armas, 2011; Usup *et al.*, 1994). Se sabe que características morfológicas y moleculares pueden separar a ambas variantes dado que la producción de toxinas ha sido demostrada en var. *bahamense* (Usup *et al.*, 1994) al igual que en var. *compressum* (García-Pérez *et al.*, 2020). Es importante mencionar que estas células pueden formar quistes resistentes cuando las condiciones no son favorables por lo que es importante reconocer la morfología de los quistes. Generalmente estos tienen forma elipsoidal, las paredes son transparentes y gruesas (1-3µm), la textura observada en el exterior es granulada o microgranulada con fibrilos interconectados en los gránulos (Figura 5) ((Mertens *et al.*, 2015b).

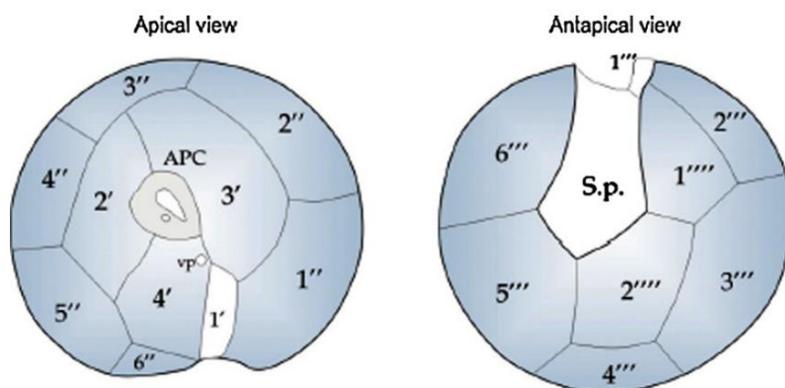


Figura 4. Segmentación y patrones de la teca de *P. bahamense* en el esquema Kofoidiano.

Se observan las placas que conforman la vista apical y antiapical del dinoflagelado *P. bahamense*, además de lúmenes y el poro ventral en la parte apical

Fuente (Usup *et al.*, 2012).

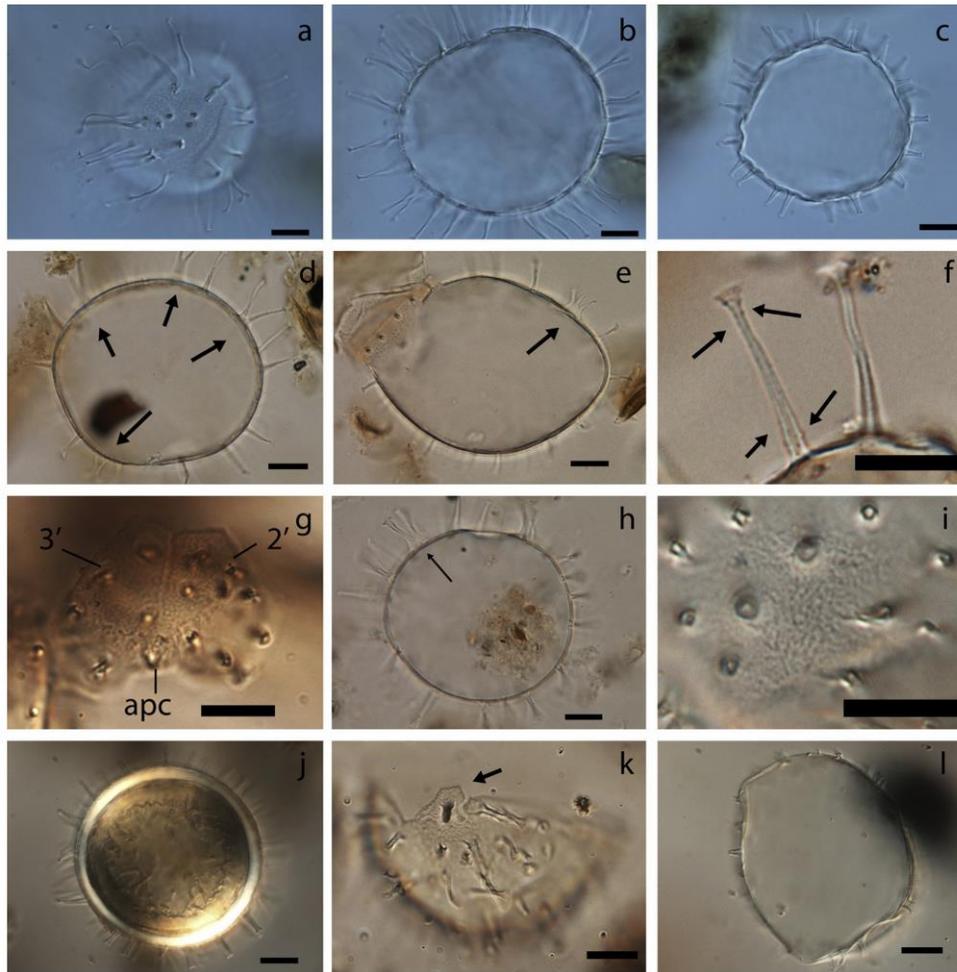


Figura 5. Quistes de diferentes organismos de *Pyrodinium bahamense* colectados en distintas localidades.

Se pueden observar especímenes de distintos tamaños, mostrando las características antes mencionadas para la identificación de un quiste de esta especie. En (g) se observan las divisiones de las placas en la parte apical, en (k) se observa la parte antiapical de las tecas. En (j) se puede observar el grosor de la pared, en (i) se observa la presencia de los gránulos superficiales

Fuente (Mertens *et al.*, 2015b).

Pyrodinium bahamense es una especie importante entre los dinoflagelados productores de saxitoxinas causantes de Intoxicación paralizante (PSP) en aguas tropicales específicamente, causante de la PSP mucho más que otros dinoflagelados (Band-Schmidt *et al.*, 2019). Actualmente, se han realizado estudios para determinar la separación de dos especies de *Pyrodinium*, dejando *P. bahamense* y *P. compressum* como especies crípticas en lugar de dos variedades de la misma especie; sin embargo; a pesar de la evidencia genética presentada en diversos estudios con genes nucleares y genes más específicos asociados a la luciferina Lcf (Cusick *et al.*, 2016; Gárate-Lizárraga & González-Armas, 2011; Mertens *et al.*, 2015a), no se ha llegado a un acuerdo

taxonómico pues las diferencias morfológicas no son suficientemente persistentes en todas las muestras colectadas (Resendiz *et al.*, 2022).

E. *Alexandrium* spp.

El género *Alexandrium* está ampliamente distribuido en América Latina y es el género productor de toxinas relacionadas a FAN más estudiado a nivel mundial (Anderson, Alpermann, *et al.*, 2012). En Latinoamérica, han sido reportadas distintas especies: *A. cantenella*, *A. minutum*, *A. monilatum*, *A. ostefeldii*, *A. tamarense* y *A. tamiyavanichi* (Anderson, Alpermann, *et al.*, 2012; Colin & Dam, 2003; Frangópulos *et al.*, 2000). Este género está distribuido mundialmente y en Latinoamérica desde el Golfo de California hasta Argentina y Chile (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011). Los FAN asociados a *Alexandrium* spp. Son más comúnmente reportados en Suramérica, siendo Chile el país más afectado por esta especie. Desde 1990 los FAN causados por *Alexandrium* han ido en aumento causando pérdidas económicas en el sector pesquero y de acuicultura (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Band-Schmidt *et al.*, 2019).

El género se caracteriza morfológicamente por tener un tamaño de 25-30 μ m de ancho x 22-28 μ m de largo, estas células pueden ser solitarias, colocarse en pares o en cadenas largas esto en el medio marino. En medio de cultivo rara vez forman cadenas. Son células un poco aplanadas en la parte anterior y posterior de las tecas. Poseen poros ya sea ventral apical o posterior de tamaño pequeño, usualmente al lado o en la teca pegada al surco (Sp), estos poros además de su tamaño suelen tener forma de coma. Se observan pocos o ningún poro superficial evidente (Colin & Dam, 2003; Tillmann & John, 2002). Durante florecimientos de este género se han observado cadenas muy largas de individuos (Figura 6). Otra característica importante de este género es el estudio en bacterias simbiotes, pues debido a la facilidad de establecer cultivos de *Alexandrium*, se han realizado varios estudios que aún son pioneros en las asociaciones bacterianas-planctónicas las cuales influyen en la producción de toxinas (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Jasti *et al.*, 2005; MacKenzie *et al.*, 2004).

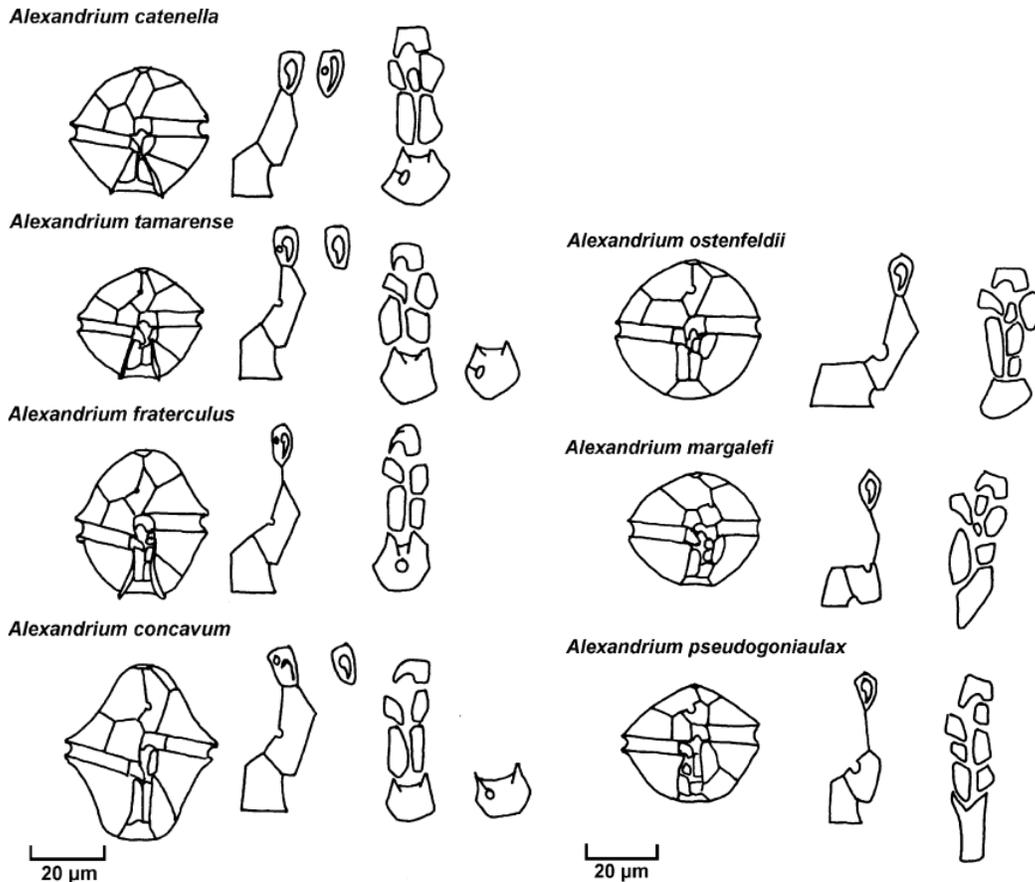


Figura 6. Morfología y patrones de placas de distintas especies del género *Alexandrium*.

Se observan en escala de 20 μ m, además en cada especie se observa en el lado derecho el complejo del poro apical en forma de coma y en algunas como *A. tamarense* y *A. concavum*, la presencia de poro antiapical.

Fuente (MacKenzie *et al.*, 2004).

F. FAN en Guatemala

En Guatemala existen reportes de “mareas rojas” desde el año 1956, sin embargo, en julio-agosto de 1987 se dio un FAN que fue conocido por causar 187 afectados con Intoxicación paralizante PSP y 26 personas fallecidas (Tauxe *et al.*, 1990), este florecimiento fue causado por *Pyrodinium bahamense* y la toxina medida fue saxitoxina (STX), la toxicidad calculada fue de 7,500 mg STX 100g⁻¹ lo cual fue una cantidad 93.7 veces por encima del límite permisible de esta toxina en Latinoamérica (80 μ g STXeq 100g⁻¹) y 400 unidades de ratón (UR) /g para consumo humano. A partir de este año se redactó un documento estableciendo los retos, riesgos, causas y monitoreos que debían ser llevados a cabo en las costas para controlar los FAN y cuidar la salud del pueblo guatemalteco (Hallegraeff, 1989). Las intoxicaciones más comunes en Guatemala y Latinoamérica son PSP o intoxicación paralizante causada por saxitoxinas e intoxicación diarreica DSP causada por ciguatera (Cuellar-Martinez *et al.*, 2018).

A partir del FAN en 1987, en los años posteriores se designaron a distintas instituciones encargadas del monitoreo de FAN en Guatemala, como el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura (CEMA) el cual gracias a su estación en el litoral Pacífico se encargó de monitorear los FAN y posteriormente, en 1991 bajo el decreto gubernativo 412-91 se establece La Comisión Nacional para la Vigilancia y Control de la Marea Roja Tóxica, de dicha institución está conformada de varios ministerios y asesorada por instituciones como el CEMA, INSIVUMEH, OBIMAR entre otras a su vez apoyada con FUNDAECO en el Atlántico; gracias a estas colaboraciones se han realizado reportes de los FAN y estudios sobre los organismos causantes (García, 2019; Hallegraeff, 1989). Las FAN identificadas en Guatemala más significativas han sido causadas por *P. bahamense var. compressum* dadas en los años de 1987, 1989, 1990, 1995, 2001, 2005, 2007, 2009, 2010, 2011, 2015, 2018 y 2019 a la fecha. Las más significativas y con mayores mediciones de STXeq y STX (UR/g) han sido los florecimientos de 1987, 2011 y 2018 (García, 2019; García-Pérez *et al.*, 2020b).

G. Monitoreo y manejo de FAN en el mundo

Se ha llegado al consenso que las especies planctónicas productoras de FAN, la concentración de toxinas, distribución, ocurrencia, pérdidas económicas y humanas por los FAN en las últimas décadas han aumentado (Figura 7) (Anderson, Cembella, *et al.*, 2012; Cao & Han, 2021). Este aumento global ha provocado interés en realizar estudios holísticos, detallados y constantes para lograr un mejor monitoreo, pronóstico y manejo de los FAN tomando en cuenta que las técnicas puedan aplicarse localmente en todas las costas y cuerpos de agua (Anderson, 2009; Anderson, Cembella, *et al.*, 2012).

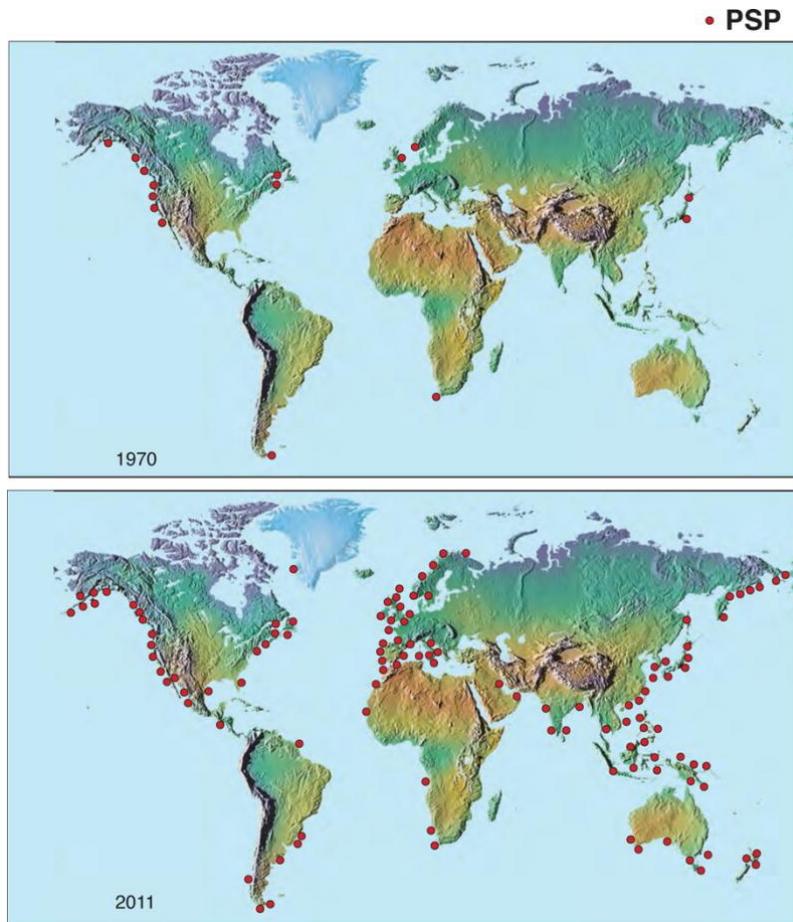


Figura 7. Distribución de FAN causante de PSP a nivel global

Se puede evidenciar un aumento en la distribución de los FAN a nivel global, en donde todas las costas se han encontrado afectadas por las toxinas causantes de PSP, este mapa representa datos desde 1970 hasta el 2009 proporcionado por la oficina nacional para florecimientos algales nocivos de Estados Unidos (U.S National Office for Harmful Algal Blooms)

Fuente (Anderson, Cembella, *et al.*, 2012).

Las tendencias globales han sido diversas, se han realizado varios estudios para dilucidar la taxonomía y las especies que son causantes de FAN, estos estudios incluyen cultivo y establecimientos de modelos en laboratorio para observar los cambios y respuestas de estas especies a distintos factores ambientales (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Anderson, 2009; Usup *et al.*, 1994). Sin embargo, debido a la dificultad de clasificación taxonómica que se ha presentado desde los inicios de estudios fitoplanctónicos y de FAN, los esfuerzos de identificación y establecimiento de especies por vías moleculares han encontrado varios obstáculos, pues a pesar de la evidencia genética y biogeográfica que se ha presentado para separar a varias especies y géneros. La falta de diferencias morfológicas y el requerimiento de dichas diferencias para el establecimiento de especies diferentes ha evitado el reconocimiento de especies crípticas y otras morfoespecies esto ha sucedido con diatomeas como *Skeletonema costatum* (Saunders & McDevit, 2012), dinoflagelados

como *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium tamranse* (Anderson, Cembella, *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2015a; Vingiani *et al.*, 2020).

Por otra parte, sí se han implementado métodos moleculares para el monitoreo en tiempo real de las especies y cepas de especies potencialmente tóxicas, esto se ha realizado con técnicas de PCR en tiempo real (RT-PCR), ensayos de hibridación de sándwich (SHA) (Anderson, 2009; Bowers *et al.*, 2006), pruebas de microsatélites para dilucidar genes productores de toxinas los cuales tienen diversas variaciones en poco tiempo (Kellmann *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2011; Stumpf *et al.*, 2009). Los métodos más utilizados para el monitoreo y manejo de las toxinas presentes en los FAN (saxitoxinas, gonyautoxinas, ácido domónico, *ect.*) es la cromatografía líquida, espectrofotometría de masas, perfiles de proteínas y cromatografía con detector de fluorescencia (Anderson, 2009), estos estudios se hacen tradicionalmente en moluscos, como bivalvos los cuales son los que contienen las mayores concentraciones de toxinas y se suelen medir en LU ($\mu\text{mol/L}$)⁻¹ y LQS ($\mu\text{g}/100\text{g}$), además de tener límites dados por los equipos de cuantificación lo cual disminuye la sensibilidad de estos métodos (Rojas-Arrieta *et al.*, 2018).

Se han implementado otras formas de monitoreo de FAN a nivel global, por ejemplo, incluyendo imágenes satelitales las cuales proporcionan información de los pigmentos y de la biomasa presente en las costas, pero estas técnicas por sí solas generan falsos positivos por lo que se han combinado con visualización e identificación morfológica de especies potencialmente causantes de FAN. Además estos monitoreos remotos pueden realizarse de manera semiautomatizada lo cual facilita su implementación diaria y hasta horaria (Cao & Han, 2021; Morón-López, 2021). Otra forma de monitoreo es el uso de drones, esto ha resultado como un método efectivo de monitoreo ya que son estudios basados en la radiación UAV la cual al ser monitoreada constantemente por sensores puede ser un pronosticador de FAN efectivo (Wu *et al.*, 2019).

Los acercamientos holísticos son importantes, pues engloban la problemática de los FAN junto al monitoreo remoto, la detección de fuentes de contaminación, estrategias de mitigación y muestreos manuales (Morón-López, 2021). Los programas de monitoreo y manejo de FAN en Guatemala predominantes han sido; sin embargo; remotos, basados en morfología y conteo celular, muestreos rutinarios y diversos estudios (MARN, 2018) que, a pesar de haber mejorado e implementado nuevas técnicas y metodologías, requieren de mayor investigación y la implementación de métodos moleculares para un mejor pronóstico y un monitoreo continuo que sea más efectivo tanto local como globalmente.

III. Justificación

Los dinoflagelados son un grupo diverso de la comunidad planctónica, estos pueden desempeñar distintos roles ecológicos (Hackett, Anderson, *et al.*, 2004). Pueden ser fotótrofos, heterótrofos o mixótrofos y desempeñan funciones importantes para el ecosistema marino. Uno de los procesos bioquímicos más relevantes para la vida marina y humana es la producción de toxinas (Hackett *et al.*, 2013). Estas toxinas están mediadas por complejos de genes llamados PSK, que son codificadores para policétidos, los policétidos son precursores de la mayoría de las toxinas producidas por los dinoflagelados (Akbar *et al.*, 2020; Kellmann *et al.*, 2010). Estas toxinas son las causantes de los florecimientos algales nocivos (FAN) que son responsables de pérdidas pesqueras, de vida marina y económicas.

En Guatemala, las zonas marino-costeras (ZMC) presentan una productividad primaria elevada, tanto las costas del Pacífico como las costas del Atlántico. La ZMC guatemalteca provee diversos servicios ecosistémicos y actividades económicas importantes a nivel local y nacional (Ortiz & Martínez-Dubón, 2020). Además, la riqueza y productividad de sus suelos permite a las comunidades desarrollarse económicamente y representar un ingreso relevante para el país (MARN, 2010, 2018)

Los florecimientos de algas nocivas (FAN) en Guatemala son producidos por la proliferación de ciertas especies de dinoflagelados y la liberación de toxinas especialmente de la especie *Pyrodinium bahamense* y el género *Alexandrium* spp. que son productores de saxitoxinas causantes de la intoxicación paralizante (PSP) (García-Pérez *et al.*, 2020a; Rashidi *et al.*, 2021). Estos, además son una problemática que ha aumentado a nivel mundial (Anderson, 2009).

Los FAN en Guatemala son monitoreados y manejados por La Comisión Nacional para la Vigilancia y Control de la Marea Roja Tóxica que se encarga junto a varias instituciones gubernamentales como no gubernamentales de medir y reportar las células de especies tóxicas, la cuantificación de toxinas y medición vía remota con imágenes satelitales y muestreos rutinarios (García-Pérez *et al.*, 2020a; MARN, 2018).

A pesar de que estos esfuerzos se han realizado para mitigar los efectos de los FAN sobre la salud y la economía nacional; se requieren métodos que permitan una detección temprana de las especies potencialmente tóxicas de dinoflagelados lo cual se lograría con métodos de identificación molecular (Anderson *et al.*, 2005; Morón-López, 2021) por lo que es necesaria la implementación y aplicación de monitoreos que implementen estas técnicas y se logre un control y manejo holístico efectivo para los FAN en la ZMC guatemalteca.

En este trabajo de investigación, se buscó establecer un método de detección molecular para las especies de dinoflagelados que han sido causantes de FAN más problemáticas en Guatemala, *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp., además de la evaluación molecular de la presencia del gen precursor para saxitoxina SXT en las costas del país. Por último, establecer un protocolo de extracción de ADN efectivo y de bajo costo para muestras de plancton colectadas, fijadas y sin fijación. Esto con fin de establecer un precedente para la aplicación de métodos moleculares en el monitoreo de los FAN en Guatemala debido a que actualmente no se realizan pruebas moleculares de manera rutinaria para las ZMC.

IV. Objetivos

Habiendo expuesto lo anterior, el presente estudio se realiza con la finalidad de alcanzar los siguientes objetivos:

A. General

Establecer una metodología de detección temprana y de bajo costo para identificar el gen precursor de la saxitoxina (SXT) en *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium spp.* en muestras colectadas por el CEMA.

B. Específicos

Identificación de *P. bahamense* y *Alexandrium spp.* con marcadores moleculares específicos.

Realizar la extracción de ADN de *P. bahamense* y *Alexandrium spp.* en muestras de plancton fijadas en Lugol y etanol.

Identificación del gen precursor de la saxitoxina (SXT) con marcadores moleculares específicos.

V. Metodología

A. Muestras

Las muestras fueron donadas por el Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, de la Universidad San Carlos de Guatemala, CEMA-USAC colectadas en los años de 2017-2021 (Figura 8 y 9). Se realizaron muestreos con red planctónica de 25cm de diámetro en distintos puntos del litoral Pacífico y Atlántico. También se colectaron muestras bénticas siguiendo la metodología de sustrato artificial y natural (Tester *et al.*, 2014), esto en el Atlántico. Se obtuvieron un total de 33 muestras, 15 del Pacífico y 18 del Caribe. Dos de estas muestras con duplicados y triplicados por lo que se obtuvo un total de 36 tubos eppendorf con 1.5mL de muestra cada uno. De estas muestras, 19 preservadas en Lugol ácido, 12 en Lugol, 1 en etanol 95%, 3 en formalina 4% y 1 sin fijador (Codificación en Anexos, Cuadro 16).

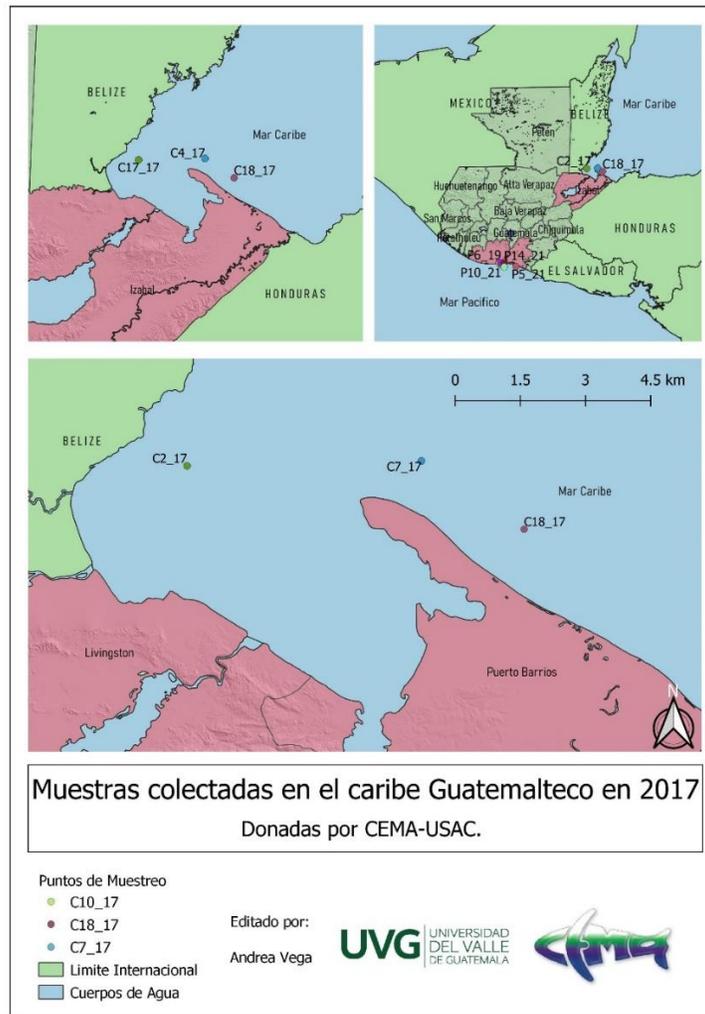


Figura 8. Muestras colectadas en el Caribe guatemalteco en 2017 por el CEMA-USAC

Se observan las tres localidades de muestreo en las cuales se realizó la colecta de las 18 muestras recibidas de esta área.

Además, se utilizaron muestras provenientes del lago de Amatitlán, colectadas en el año 2020 y preservadas en Lugol (0.5%). Estas muestras se colectaron directo de la superficie del lago con galones de agua que después fueron congelados a -20°C , descongelados y filtrados para su observación bajo el microscopio ya que fueron colectadas en colaboración con European Regional Centre for Ecohydrology of the Polish Academy of Sciences, Tylna 3, 90-364 Łódź, Poland. Estas muestras se utilizaron traspasando 1mL de muestra guardada tubos cónicos de 50mL a tubos eppendorf de 1.5mL y su contenido mayormente era de diatomeas y cianobacterias (Codificación en Anexos, Cuadro 16).

Finalmente, el 19 de marzo del año 2022 se realizó la colecta de 5 muestras utilizando una red planctónica con diámetro de boca de 25cm (Figura 9). Durante estos muestreos se hizo 1 arrastre de 8 minutos a 3 nudos, dejando 1 Km de distancia entre transectos, se realizaron 3 transectos, dos muestras en dos de estos y una en el último. Estas muestras fueron colectadas a una distancia mínima de 10mi náuticas y máxima de 20mi náuticas, guardadas en tubos cónicos de 50mL y se colocaron en hielera a 8°C hasta su llegada al laboratorio donde se guardaron a 4°C (Codificación en Anexos, Cuadro 16).

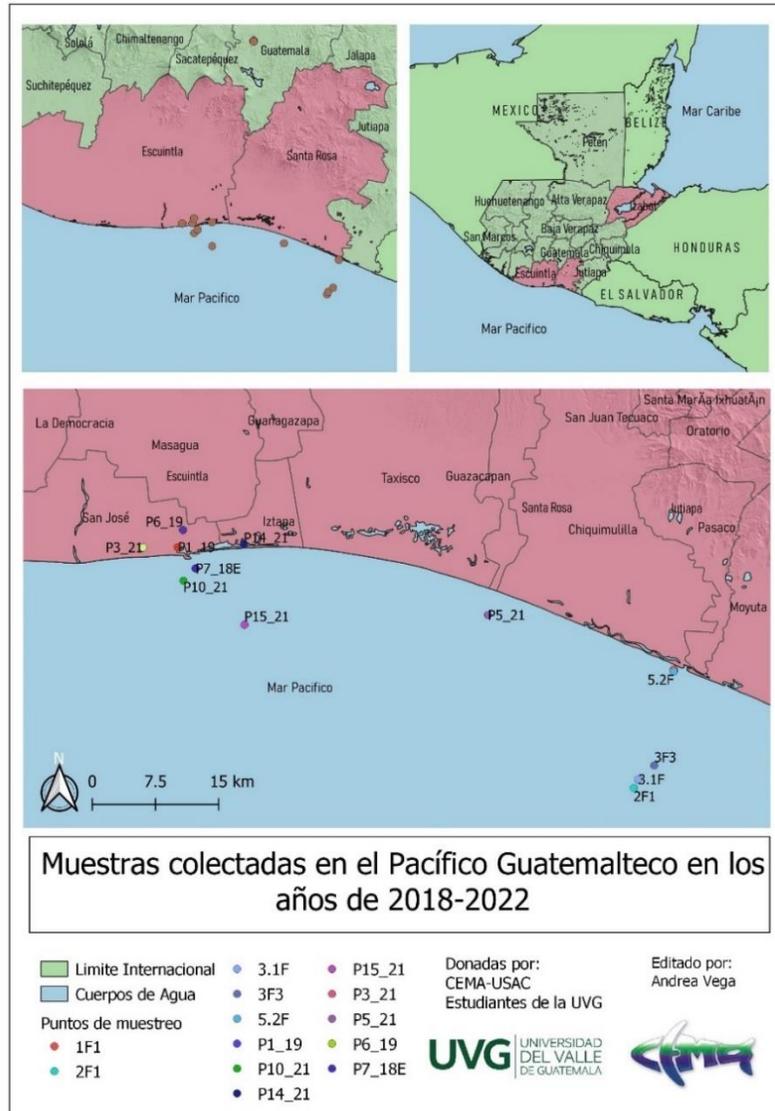


Figura 9. Muestras colectadas en el Pacífico guatemalteco en los años de 2018 a 2022

Se observan los puntos de colecta de los cuales se obtuvieron las 15 muestras donadas por CEMA-USAC (Codificación en Anexos, Cuadro 16) y las 5 muestras colectadas por los estudiantes de la UVG en marzo de 2022 (Codificación en Anexos, Cuadro 16).

B. Visualización de las muestras

Se tomó una alícuota de 100µL de cada una de las muestras colocadas en sus tubos eppendorf de 1.5mL, dejando un volumen de 1mL en cada tubo. En estas muestras se contabilizaron las células pertenecientes a Cianobacteria y Dinoflagellata. Posteriormente se realizó el cálculo según la dilución de las muestras a número de células por 1mL de muestra. La identificación morfológica se realizó con ayuda de herramientas visuales así como claves dicotómicas («Identification of Harmful Marine Dinoflagellates», 2001; Matthews & Matthews, 2018; Verlecar & Desai, 2004).

Ecuación 1. Cálculo de células por mL de muestra según alícuotas

de células en 100µL: Ne

de células en 1mL: Nf

Dilución de alícuota: D

$$Nf = Ne \times 10$$

C. Procesamiento de muestras antes de la extracción

En los tubos eppendorf con volumen de 1mL se realizó la precipitación del pellet de células para la extracción de ADN, esto se hizo centrifugando cada tubo a una velocidad de 13,400rpm durante 25 a 45 minutos dependiendo de las propiedades del medio en que se encontrara cada muestra. En las muestras en medios de fijación como Lugol, etanol o formalina se realizaron 3 lavados con agua ultrapura, entre cada lavado se descartó el sobrenadante y se llenó a 1mL.

D. Pruebas de diferentes protocolos de extracción de ADN

Se utilizarán cuatro protocolos de extracción (Protocolo A-D), tanto para algas y como para plantas (esto debido a que las tecas de los dinoflagelados pueden ser de distintos polisacáridos como la celulosa en plantas o con sílice).

La realización de estos protocolos de extracción se hizo tomando 250µL de cada una de las muestras y llevándolos a nuevos tubos eppendorf hasta formar 1mL, en total se obtuvieron 9 muestras de prueba, codificadas en Anexos, Cuadro 14 para seleccionar el protocolo óptimo. Estas pruebas de protocolos se realizaron con las muestras obtenidas del CEMA-USAC. Cada protocolo utilizado fue modificado para lograr la mayor cantidad de ADN en la extracción, se pueden observar los protocolos originales en las referencias de cada uno. Los protocolos C y D son la unión de dos protocolos utilizados para extracción en dinoflagelados y con ligeras variaciones entre cada uno.

Protocolo A (Inglis *et al.*, 2018)

Cuadro 1. Soluciones preparadas para el Protocolo A

Nombre	Componentes	Concentración	Observaciones
Buffer de lisis	Tris-HCl	100mM	pH 8.0
	NaCl	3M	
	CTAB	3%	w/v
	EDTA	20mM	pH 8.0
	Polyvinylpyrrolidone	1%	w/v
	2-mercaptoetanol	1%	v/v
CIA	Cloroformo	---	24:1 (v/v)
	Alcohol isoamílico	---	
Buffer TE	Tris-HCl	10mM	pH 8.0
	EDTA	1mM	pH 8.0

El buffer de lisis se esterilizó en autoclave y antes de su uso se agregó el 2-mercaptoetanol, luego se mantuvo a temperatura ambiente. La solución CIA se mantuvo en refrigeración a -20°. Antes de iniciar el protocolo de extracción, se calentó el buffer de lisis a 65°C.

1. Se agregan 600µL de buffer de lisis a cada tubo con pellet de muestra y se mezcla en vortex durante 1 minuto.
2. Se incuban las muestras a 65°C durante 3 horas mezclando en vortex cada media hora.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 400µL de CIA, mezclar en vortex durante 10 segundos.
4. Centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
5. Remover la fase acuosa con una micropipeta y transferir a un nuevo tubo, no transferir la interfase.
6. Agregar 1/10 del volumen de solución 3M acetato de sodio pH 5.2 y 0.66 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar por inmersión y mantener a -20°C durante una hora.
7. Centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
8. Decantar el supernadante y secar los tubos dejándolos invertidos en toallas de papel
9. Lavar los pellets añadiendo 1mL de etanol al 70%, centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
10. Remover el supernadante absorbiendo para evitar pérdida del pellet de ADN.
11. Secar los tubos a temperatura ambiente por una hora aproximadamente
12. Suspender los pellets en 70µL de buffer TE a 37°C por media hora.
13. Almacenar a 4°C o a -20°C.

Protocolo B (Peñafiel *et al.*, 2019)

Cuadro 2. Soluciones preparadas para el Protocolo B

Nombre	Componentes	Concentración	Observaciones
Buffer de lisis	Tris-HCl	100mM	pH 8.0
	NaCl	1M	
	SDS	0.5%	w/v
	EDTA	25mM	pH 8.0
Solución precipitadora de proteínas	Tris-HCl	0.1M	pH 7.5
	Guanidina isotiocianato	4M	
Buffer TE	Tris-HCl	10mM	pH 8.0
	EDTA	1mM	pH 8.0

El SDS se agregó después de esterilizar el buffer de lisis en autoclave. Precalentar el buffer de lisis para disolver cristales de SDS a no más de 55°C.

1. Colocar 300µL de buffer de lisis y 3µL de proteinasa K, mezclar en vortex durante 2 minutos.
2. Incubar a 55°C durante 15-18 horas asegurándose de mezclar en vortex cada 20-30 minutos durante las primeras horas y al finalizar la fase de lisis.
3. Calentar los tubos a 95°C durante 10 minutos para inactivar cualquier residuo de proteinasa K.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir 4µL solución de RNasa y mezclar.

5. Incubar a 37°C por 30 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Agregar 100µL de Solución Precipitadora de proteínas y mezclar en vortex 20 segundos
7. Centrifugar tubos a 13,400rpm durante 15 minutos
8. Transferir el supernadante a otro tubo sin tocar el pellet.
9. En el nuevo tubo agregar 300µL de etanol absoluto frío, mezclar por invertido.
10. Centrifugar a 13400rpm por 7 minutos
11. Descartar el supernadante y agregar 300µL de etanol al 70%, mezclar por invertido 5-10 veces.
12. Descartar el supernadante absorbiendo con micropipeta y dejar los tubos abiertos hasta que estén secos.
13. Resuspender en buffer TE
14. Dejar los tubos a 4°C para completar la resuspensión.

Protocolo C (Campos & Gilbert, 2012; Yuan *et al.*, 2015)

Cuadro 3. Soluciones preparadas para utilización en protocolo C y D

Nombre	Componentes	Concentración	Observaciones
Buffer de lisis	Tris-HCl	100mM	pH 8.0
	SDS	0.5%	w/v
	EDTA	100mM	pH 8.0
Solución NaCl	NaCl	5M	
Solución CTAB	CTAB	3%	w/v
	NaCl	0.7M	
Buffer TE	Tris-HCl	10mM	pH 8.0
	EDTA	1mM	pH 8.0
Proteinasa K	Proteinasa K	200ug/mL	

Se agregó el SDS al Buffer de lisis después de haber esterilizado esta solución en autoclave. Antes de iniciar la extracción de ADN, se calentó este buffer a ~55°C. El resto de las soluciones, con excepción de la Proteinasa K se mantuvo a temperatura ambiente, la proteinasa K se mantuvo en refrigeración a ~4°C.

1. Se agregan 400-500µL de buffer de lisis a cada tubo con pellet de muestra y se mezcla en vortex durante 20 segundos.
2. Agregar 10 µL de proteinasa K y mezclar en vortex nuevamente
3. Se incuban las muestras a 55°C durante 72 horas mezclando en vortex cada media hora durante últimas 3 horas y cada 2-3 horas el primer día.
4. Agregar 165µL de NaCl 5M, mezclar en vortex durante 10 segundos.
5. Agregar 165 µL de solución CTAB
6. Incubar a 56°C por 10 minutos
7. Dividir el contenido de cada tubo en dos
8. Agregar 500µL de cloroformo a cada tubo y mezclar en vortex algunos segundos
9. Centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos

10. Remover la fase acuosa con una micropipeta y transferir a un nuevo tubo, no transferir la interfase.
11. Agregar 0.6-1 volumen de solución 3M acetato de amonio pH ~5.2 y 0.66 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar por inmersión y mantener a -20°C durante una hora.
12. Centrifugar a 13,400rpm durante 30 minutos
13. Decantar el supernadante y secar los tubos dejándolos invertidos en toallas de papel
14. Lavar los pellets añadiendo 1mL de etanol al 70%, centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
15. Remover el supernadante absorbiendo para evitar pérdida del pellet de ADN.
16. Secar los tubos a temperatura ambiente por una hora aproximadamente.
17. Suspender los pellets en 70µL de buffer TE.

Protocolo D

1. Sumergir la muestra en nitrógeno líquido y macerar con un pistilo de maceración
2. Se agregan 400µL de buffer de lisis a cada tubo con pellet de muestra y el pistilo dentro del tubo eppendorf para lavar el pellet y se mezcla en vortex durante 20 segundos.
3. Centrifugar el pellet macerado a 13,000 rpm por 15 minutos, retirar el buffer de lisis y volver a introducir en nitrógeno líquido y macerar con el pistilo de maceración nuevamente.
4. Lavar el pistilo con 400µL de buffer de lisis dentro del tubo eppendorf.
5. Agregar 10 µL de proteinasa K y mezclar en vortex durante un minuto.
6. Se incuban las muestras a 65°C durante 18 horas mezclando en vortex cada media hora durante las 3 horas finales de la lisis.
7. Agregar 165µL de NaCl 5M, mezclar en vortex durante 10 segundos.
8. Agregar 165 µL de solución CTAB
9. Incubar a 56°C por 10 minutos
10. Dividir el contenido de cada tubo en dos
11. Agregar 500µL de cloroformo y agitar durante algunos minutos
12. Centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
13. Remover la fase acuosa con una micropipeta y transferir a un nuevo tubo, no transferir la interfase.
14. Agregar 0.6-1 volumen de solución 3M acetato de sodio pH 5.2 y 0.66 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar por inmersión y mantener a -20°C durante una hora.
15. Centrifugar a 13,400rpm durante 30 minutos
16. Decantar el supernadante y secar los tubos dejándolos invertidos en toallas de papel
17. Lavar los pellets añadiendo 1mL de etanol al 70%, centrifugar a 13,400rpm durante 10 minutos
18. Remover el supernadante absorbiendo para evitar pérdida del pellet de ADN.
19. Secar los tubos a temperatura ambiente por una hora aproximadamente
20. Suspender los pellets en 70µL de buffer TE.

E. Cuantificación e integridad del ADN

Se cuantificó la cantidad de ADN extraída de cada protocolo de extracción utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ One. Se utilizaron 2µL de cada extracción y se utilizó buffer TE como blanco. Se utilizó como variable de análisis la concentración de ADN en ng/µL, pureza a una absorbancia de 260/280 nm y presencia de contaminantes a una absorbancia de 260/230.

Se realizó un gel de electroforesis para evaluar la integridad para del ADN extraído con cada protocolo. El gel se hizo con agarosa al 1.5% y buffer TBE y fue teñido con 1µL de gel red. Se cargó el gel con 5µL de ADN y 1µL de loading buffer. El gel de integridad se dejó correr a 90V durante 1 hora y se observó en un transiluminador UVP para su posterior análisis.

F. Selección del protocolo de extracción y extracción de ADN

Con base en los parámetros mencionados anteriormente (E), se seleccionó el protocolo de extracción con la mejor relación cantidad-pureza del ADN y se procedió a realizar la extracción de todas las muestras en las cuales, como se mencionó (C) se utilizó 1mL de muestra. Estas extracciones se guardaron en refrigeradora a -20°C hasta su posterior uso en la amplificación del ADN.

G. Amplificación y visualización del ADN

Se realizaron varias reacciones de PCR para la amplificación del ADN de dinoflagelados (Dinoflagellata) y Cianobacteria, según la muestra seleccionada. Para dichas reacciones se realizó la búsqueda de los cebadores necesarios los cuales fueron pedidos a Macrogen®.

1. Reacción de PCR para la determinación de ADN de Dinoflagellata

En esta reacción se utilizó el par de cebadores propuestos en (Sze *et al.*, 2018), estos con un producto de PCR esperado de 313 pares de bases (pb), amplificando para las regiones V4-V5 del gen 18S ARNr. Se utilizó el cebador directo REL18S1F (5'- GTT GCG GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA-3') y el cebador reverso REL18S1R (5'-AAC AAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT GAC-3') siendo este último el reverso complementario del cebador Dino18SF3 (Lin *et al.*, 2006).

2. Reacción de PCR para identificación de *P. bahamense* y *Alexandrium* spp.

En estas reacciones de PCR se utilizaron los cebadores orientados a especificidad de la especie *Pyrodinium bahamense* utilizando como cebador directo Pcomp370F (5'-AAATTACCCAATCCTGACACT-3') y como cebador reverso Pcomp1530R (5'-CTGATGACTCAGGCTTACT-3'), estos amplifican en una región conservada para esta especie del gen 18S ARNr con un producto de PCR de ~1200pb (Cusick *et al.*, 2016).

Para *Alexandrium* spp. se utilizará como cebador directo 18SF08 (5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG-3') y como cebador reverso R0ITS (5'-CCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTC-3'), con un producto de PCR esperado de ~1780pb y amplificando para la región ITS orientado al género *Alexandrium* (Orr *et al.*, 2011).

3. Reacción de PCR para determinación del gen precursor de la saxitoxina SXT

Para la identificación del gen precursor de la saxitoxina mediante el gen sxtA4-, para esto se utilizaron los cebadores orientados al gen sxtA4- en *Pyrodinium bahamense* propuestos en (Cusick & Duran, 2021) siendo el cebador directo SxtA4166F (5'-CATGGCTGCGGCGTTCTTG-3') y cebador reverso PyrosxtA4R680 (5'-CTAGATGGGGTACCACATAG-3') los cuales se derivan de los cebadores para el gen SXT generalizados (Murray *et al.*, 2011).

Los productos de estas reacciones de PCR se visualizaron posteriormente en geles de electroforesis elaborados con agarosa al 1% y buffer TBE. Fueron teñidos con 1-3µL de gel red y cargados con 5µL de ADN/producto de PCR y 1µL de loading buffer. Dichos geles se dejaron correr a 85V durante 90 minutos los cuales se observaron en un transiluminador UVP para su posterior análisis.

H. Optimización de reacciones de PCR

Se realizó la optimización de los programas de PCR según la información del fabricante (Macrogen®) y los programas presentados en la literatura citada de cada par de cebadores utilizados. Además, se realizaron las reacciones de PCR de los cebadores con concentraciones finales de los reactivos estandarizadas para estas reacciones en un volumen final de 25µL.

Cuadro 4. Concentraciones de reactivos para las reacciones de PCR realizadas

Reactivo	[Ci]	[Cf]	Vol. 1 mxm (µL)
H ₂ O ultra pura			76.5
Buffer con MgCl ₂	10x	1x	15
DNTP's	2.5m M	200µL	12
Cebador directo	10µ M	0.5µM	7.5
Cebador reverso	10µ M	0.5µM	7.5
Taq polimerasa	5U/µ L	1.25U/ µL	1.5
ADN			5

1. Optimización de PCR para cebadores Dinoflagellata

En esta reacción se utilizaron los cebadores directo REL18S1F (5'- GTT GCG GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA-3') y el cebador reverso REL18S1R (5'-AAC AAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT GAC-3').

Cuadro 5. Programas de PCR utilizados para cebadores Dinoflagellata-Cianobacteria

Program a #	TD1		Ciclo				TEF		# ciclos		
	Te (°C)	T	TD2		TA		TE	T (°C)		T	
			Te (°C)	T	Te (°C)	T	T (°C)	T	T (°C)	T	
1	94	3 min	94	1 min	54.2	1 min	72	2 min	72	5 min	35
2 *	94	1 min	94	45 seg	53	45 seg	72	1 min	72	3 min	35
3	94	1 min	94	45 seg	57	45 seg	72	1 min	73	3 min	35

*(Sze *et al.*, 2018)

TD = Temperatura de Desnaturalización

TA = Temperatura de Alineamiento

TE = Temperatura de Extensión
 TEF = Temperatura de Extensión Final
 Te = Temperatura
 T = Tiempo

Todos estos programas fueron modificados y optimizados para la amplificación de los amplicones esperados (G) se realizaron las pruebas para la optimización con las muestras cuyos parámetros de pureza e integridad así como concentración fueran óptimos (E).

2. Optimización de PCR para cebadores orientados a identificación de *P. bahamense* y *Alexandrium*.

En este caso se realizaron dos programas para PCR, tomando en cuenta la naturaleza de los cebadores para *Pyrodinium bahamense*, cebador directo Pcomp370F (5'-AAATTACCCAATCCTGACACT-3') y como cebador reverso Pcomp1530R (5'-CTGATGACTCAGGCTTACT-3') además de los cebadores orientados al género *Alexandrium*, siendo el cebador directo 18SF08 (5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG-3') y como cebador reverso R0ITS (5'-CCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTC-3').

Cuadro 6. Programas de PCR utilizados para cebadores orientados a *Pyrodinium bahamense*.

Programa #	TD1		Ciclo				TEF		# ciclos		
	Te (°C)	T	TD2	TA	TE	T	T				
	Te (°C)	T	Te (°C)	T	Te (°C)	T	T (°C)	T	T (°C)	T	
1	94	3 min	94	1 min	58	1 min	72	2 min	72	5 min	35
2	94	1 min	94	45 seg	55	45 seg	72	60 seg	72	3 min	35
3	94	1 min	94	45 seg	60	45 seg	72	80 seg	72	3 min	35

Cuadro 7. Programas de PCR utilizados para cebadores orientados al género *Alexandrium*.

Programa #	TD1		Ciclo				TEF		# ciclos		
	Te (°C)	T	TD2	TA	TE	T	T				
	Te (°C)	T	Te (°C)	T	Te (°C)	T	T (°C)	T	T (°C)	T	
1	94	3 min	94	1 min	54.2	1 min	72	2 min	72	5 min	35
2	94	1 min	94	45 seg	53	45 seg	72	1 min	72	3 min	35
3	95	5 min	94	1 min	62	1 min	72	80 seg	72	5 min	35

3. Optimización de PCR para cebadores orientados al gen *sxtA4*-

Para esta reacción se utilizó el cebador directo SxtA4166F (5'-CATGGCTGCGGCGTTCTTG-3') y cebador reverso PyrosxtA4R680 (5'-CTAGATGGGGTACCACATAG-3') que son orientados al gen *sxtA4*- en *P. bahamense*.

Cuadro 8. Programas de PCR utilizados para cebadores orientados al gen sxtA4-

Program a #	TD1		Ciclo								# ciclos
	Te (°C)	T	TD2		TA		TE		TEF		
			Te (°C)	T	Te (°C)	T	T (°C)	T	T (°C)	T	
1	94	2.5 min	94	1 min	58.4	1 min	72	2 min	72	5 min	35
2	94	1.5 min	94	40 seg	56.5	40 seg	72	1 min	72	3 min	35
3	94	3 min	94	40 seg	60	45 seg	72	1.5 min	72	5 min	35

VI. Resultados

A. Identificación de *P. bahamense* y *Alexandrium* sp. y amplificación de ADN de dinoflagelados.

Se realizó la observación microscópica de las muestras en las cuales se observaron en total 2 especies del género *Pyrodinium*, las cuales fueron *Pyrodinium bahamense* (Figura 10. I, V) y *Pyrodinium* sp. (Figura 10. II). También se observaron individuos de *Alexandrium* sp. (Figura 10. III, IV). Estos individuos se observaron en muestras obtenidas del CEMA-USAC, específicamente en la muestra proporcionada del florecimiento de *P. bahamense* reportado en 2018 (García-Pérez *et al.*, 2020a).

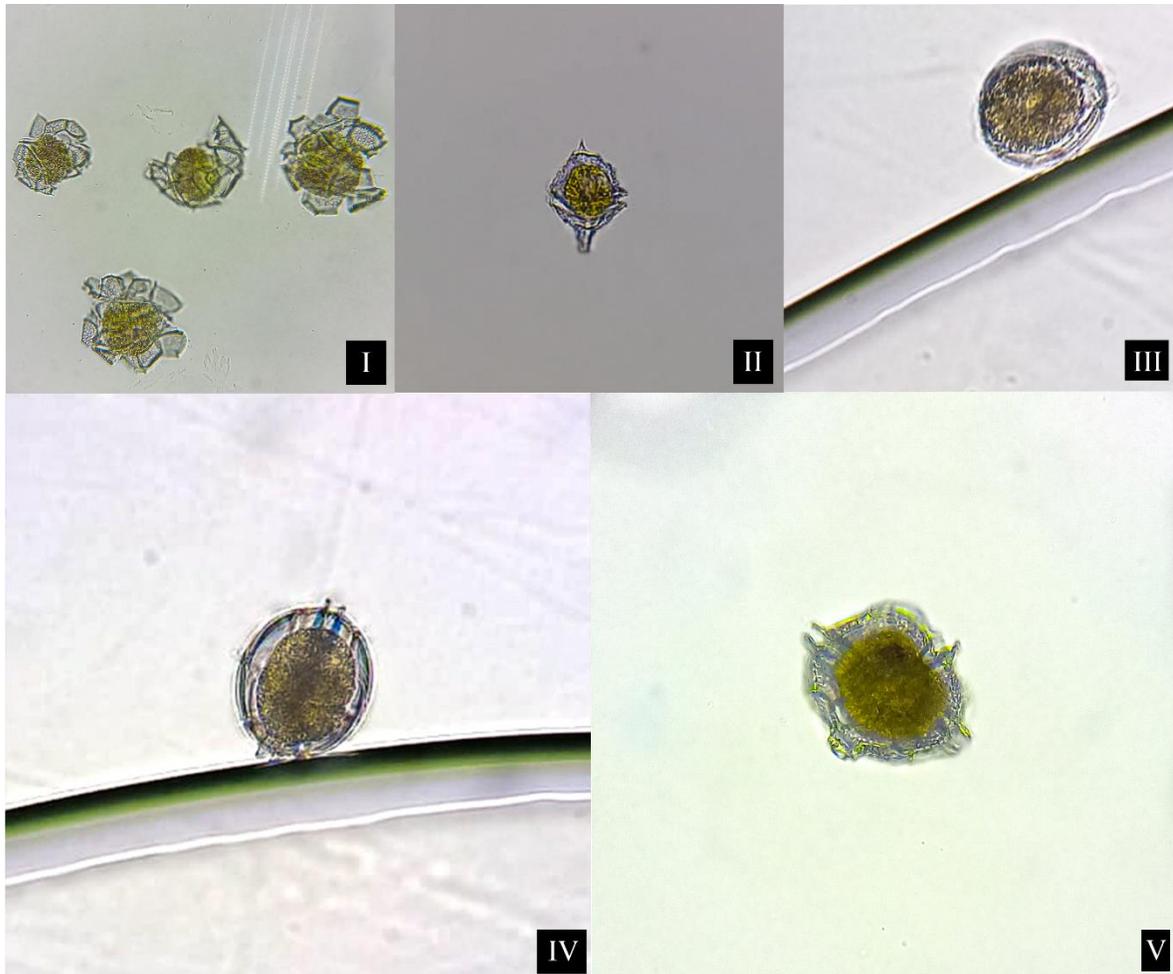


Figura 10. Imágenes vistas en microscopio óptico con aumento de 40x y 100x.

Se pueden observar células de *P. bahamense* (I y V) algunas de las cuales, se encuentran deterioradas por el medio y tiempo de conservación (I). También se observa otra especie del género *Pyrodinium* (II). Por último, se observan dos individuos del género *Alexandrium* (III y IV).

Los productos de PCR para cebadores orientados a dinoflagelados visualizados en geles de electroforesis (Metodología vii.1), en dichos geles se observaron varias bandas, lo cual significó un resultado positivo para la presencia de dinoflagelados. La presencia de bandas fue especialmente en las muestras utilizadas como pruebas de protocolos (Metodología iv, Anexos, Cuadro 3) en las cuales se muestra la banda del producto a la altura de 313 pares de bases (Figura 11 y 12). También se observaron algunas bandas pertenecientes a las extracciones de las muestras donadas por el CEMA-USAC y muestras colectadas por personal del European Regional Centre for Ecohydrology of the Polish Academy of Sciences (Figura 13 y 14). Al igual que en las anteriores se puede observar la banda a la altura del producto esperado, sin embargo, se observan también otras bandas tenues (Figura 12). Además, se observan errores de corrida en el gel en los cuales se evidenciaron bandas curvas o en “W” (Figura 14). Finalmente, se observó amplificación en las muestras frescas (Figura 15) con bandas tenues.

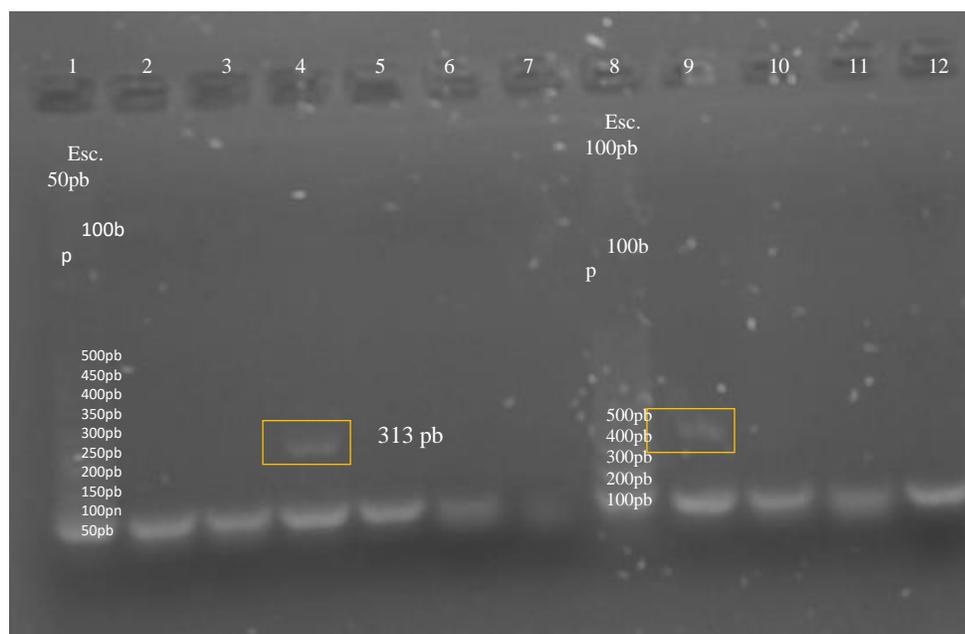


Figura 11. Productos de PCR para ADN dinoflagelados en pruebas.

Gel de electroforesis con agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para cebadores orientados a dinoflagelados en muestras de pruebas de protocolos de extracción. Se observa una banda (pozo 4) perteneciente a la muestra con el código P6 y banda (pozo 9) para P9 (Anexos. Cuadro 14 y 15), también se observa el blanco sin producto en el pozo 7. Se observa la escalera que va de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 8 y la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 1.

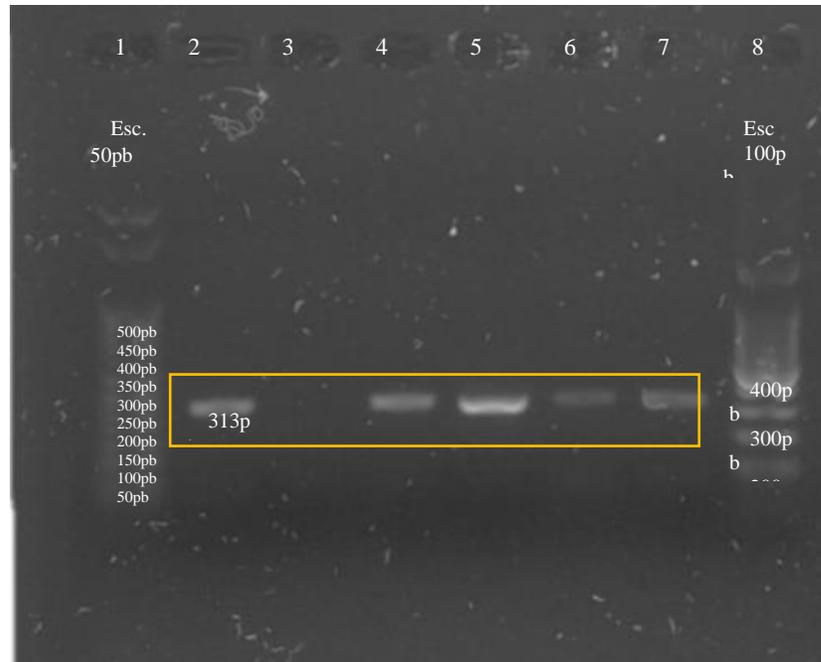


Figura 12. Producto de PCR para ADN dinoflagelados para muestras de prueba.

Gel de electroforesis con agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para el marcador molecular orientado a dinoflagelados en muestras de pruebas de protocolos de extracción. Se observan cinco bandas (pozo 2) perteneciente a la muestra con el código P7.2 y banda (pozo 4) para P9.2, (pozo 5) para P7.1, (pozo 6) para P2 y (pozo 7) para P6.1 (Codificación de muestras en Anexos, Cuadro 14) y se puede observar el blanco sin amplificación en el pozo 3. Se observa la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 1 y la escalera de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 9.

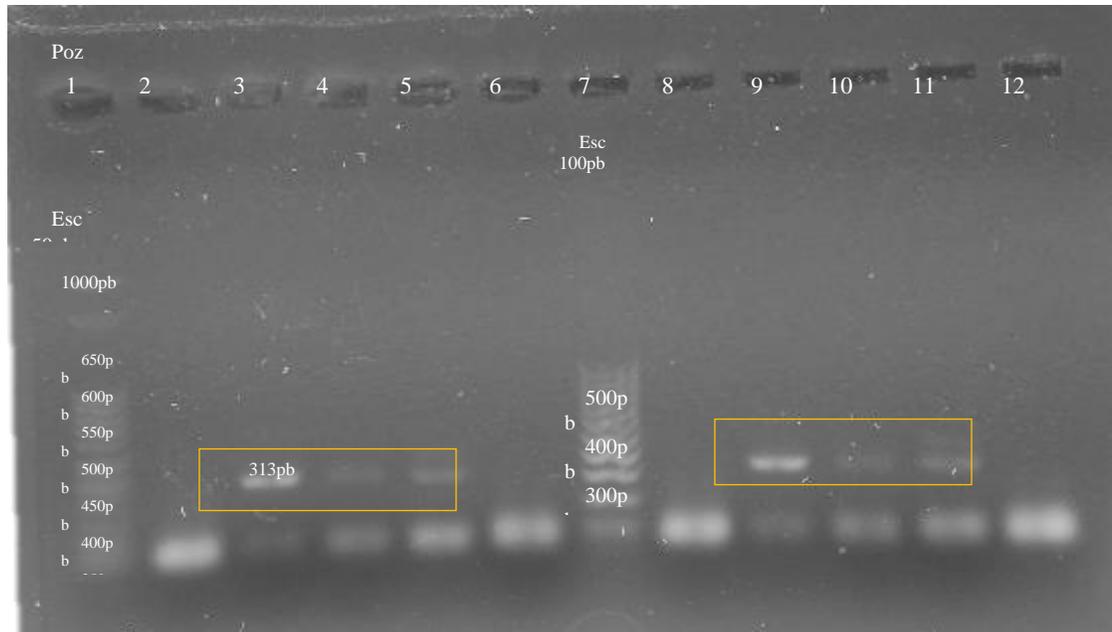


Figura 13. Producto de PCR para ADN dinoflagelados para muestras del CEMA-USAC.

Gel de electroforesis con agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para los marcadores moleculares orientados a dinoflagelados en muestras proporcionadas por el CEMA-USAC en las cuales se pueden observar tres bandas claras pertenecientes a las muestras con los códigos C2_17(poza 3 y 9), P7_18L(poza 4 y 10) y P7_O (poza 5 y 11) (Codificación en Anexos. Cuadro 14 y 15). También se puede observar una banda tenue amplificando a ~400bp en pozo 11. Se observa el blanco en pozo 6. Se observa la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 1 y la escalera de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 7.

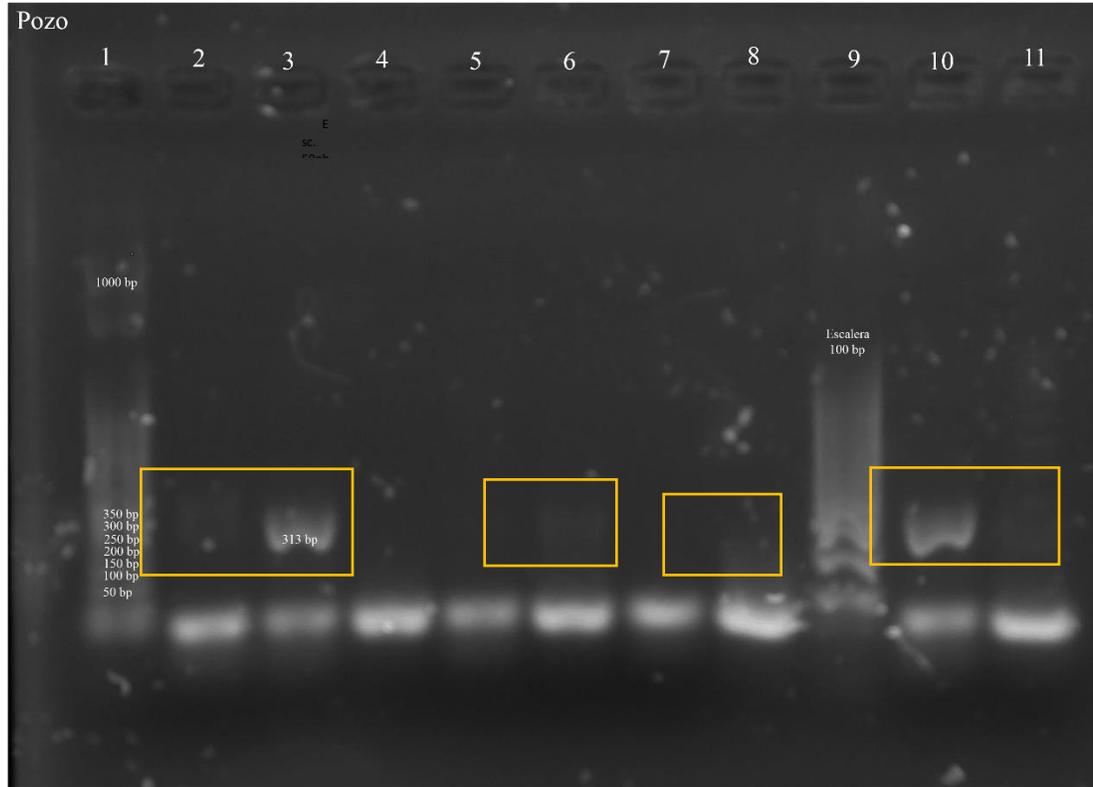


Figura 14. Producto de PCR para ADN dinoflagelados para muestras del CEMA-USAC y del Lago de Amatitlán

Gel de electroforesis con agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para los marcadores moleculares orientados a dinoflagelados en muestras proporcionadas por el CEMA-USAC y muestras provenientes del Lago de Amatitlán. Se pueden observar 3 bandas y 1 producto escalonado, pertenecientes a las muestras con los códigos, C1_17(poza 2) C2_17(poza 3 y 10), AF2 (poza 6) y P4_21 (poza 8) (Codificación en Anexos, Cuadro 15). Se observa una banda tenue amplificando a 313bp en sin embargo se observan diferentes bandas tenues a otras alturas (poza 11). Se observa el blanco en pozo 7. Se observa la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 1 y 9.

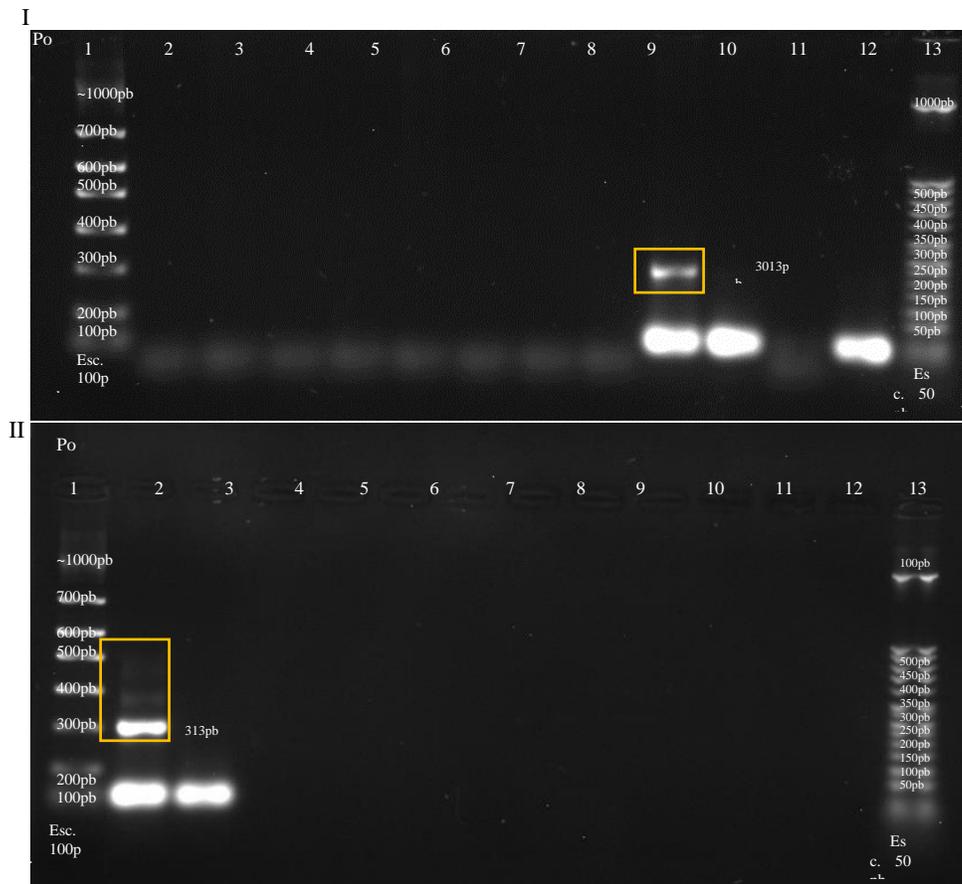


Figura 15. Producto de PCR para ADN dinoflagelados para muestras frescas

Gel de electroforesis con agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para los marcadores moleculares orientados a dinoflagelados en muestras frescas en las cuales se pueden observar dos bandas, una de ellas con ADN escalonado (pozo 2. II). Estas muestras con los códigos 3F1(poza 10. I), 5.2F (poza 2.II) (Codificación de muestras en Anexos, Cuadro 16). El blanco fue cargado en el pozo 2.I. Se observa la escalera que va de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 1 para I y II y la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 14 para I y II.

B. Selección del protocolo de extracción y extracción de ADN

Se tabularon los datos de las mediciones de cantidad y calidad de ADN realizadas y se analizaron estos datos separándolos con distintos criterios (Figura 16-24) (Anexos, Cuadro 15). Se comparó la calidad de ADN extraído con el parámetro de absorbancia en 260/280nm y la cantidad de ADN con concentración en [ng/uL], según los protocolos probados (Metodología D), en la cual se observó el protocolo C como el óptimo (Figura 16, 17 y 18). Según medio de conservación, en esta se observa que la calidad y concentración de ADN mejor y más alta son para muestras conservadas en Lugol y en agua es decir muestras frescas (Figura 19 y 20). Se comparó también el origen de cada muestra, en esta se observa que las muestras frescas y de lago son aquellas con mayor cantidad y mejor calidad de ADN extraído (Figura 21 y 22). Finalmente se observaron los geles de electroforesis para visualizar la integridad de ADN en muestras de todos los tipos (Lago,

CEMA y Frescas) en donde se observó la presencia de ADN únicamente para las muestras de Lago y Frescas (Figura 23 y 24).

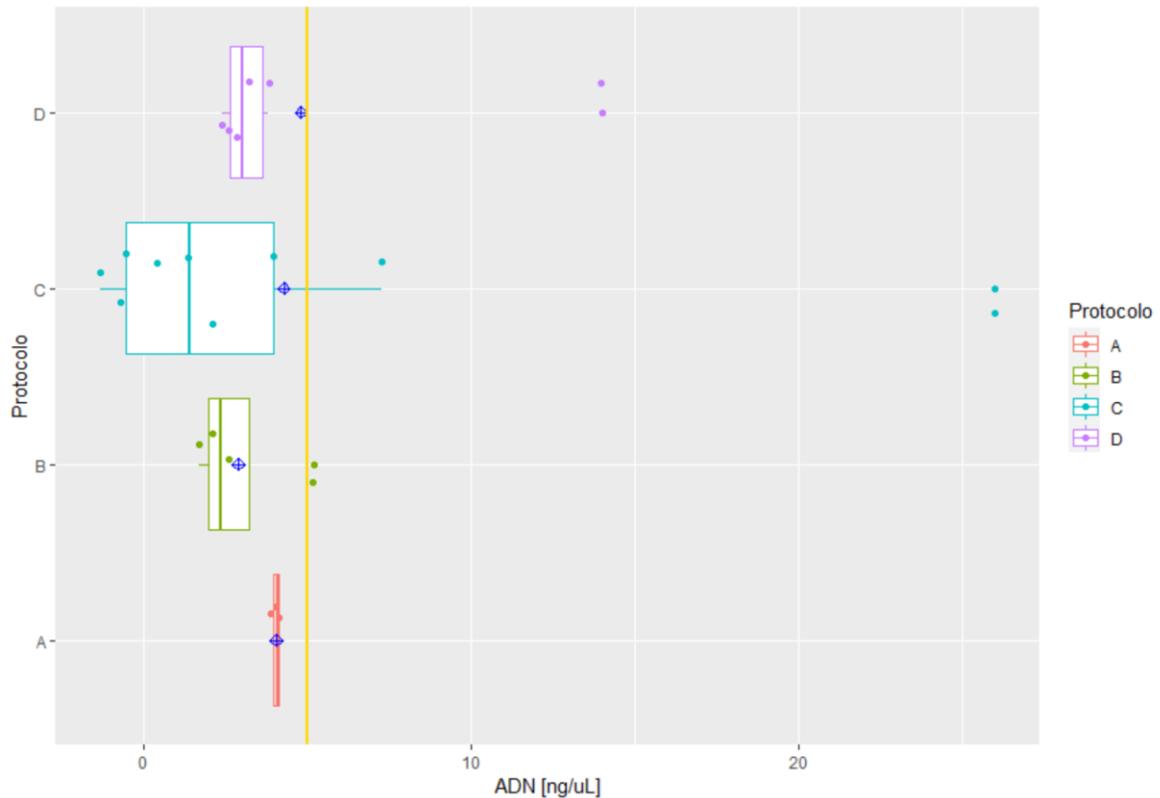


Figura 16. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y cantidad de ADN extraído.

Diagrama de caja y bigotes comparando los diferentes protocolos de extracción probados (D) eje y versus la concentración de ADN [ng/uL] eje x. También se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 5ng/uL. Se puede observar la media de concentración de ADN de cada uno de los protocolos en color azul.

Los protocolos con concentraciones más cercanas o mayores a esta línea fueron B, C y D de los cuales C tuvo muestras con las concentraciones más altas en sus valores máximos y también en los datos atípicos, a pesar de esto tuvo la mayor dispersión en los datos esto también relacionado a la cantidad de muestras medidas. El protocolo A cuenta con menor dispersión de datos, sin embargo, este tuvo menos muestras medidas en el espectrofotómetro. Los protocolos B y D presentan datos atípicos con concentraciones de ADN arriba de 5ng/uL sin embargo la mediana y la mayoría de los datos se encuentran muy por debajo de estos.

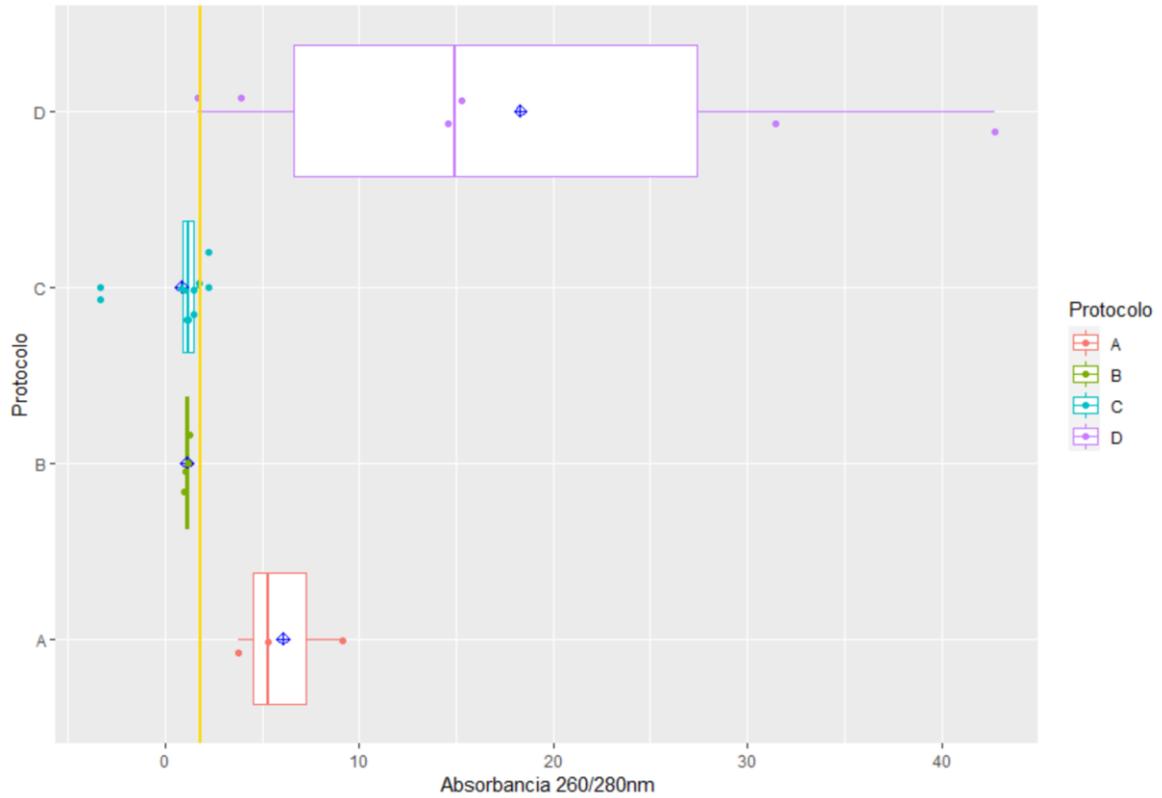


Figura 17. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y calidad en A260/280nm.

Diagrama de caja y bigotes comparando los diferentes protocolos de extracción probados (D) eje y versus la calidad del ADN extraído en Absorbancia 260/280nm eje x . También se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 1.8 el cual es la absorbancia óptima indicadora de una buena calidad de ADN. Por último, se observan las medias de cada protocolo en color azul.

Los protocolos con calidad más cercana a esta línea fueron B y C, que contaban con los mejores valores de calidad y la menor dispersión de los datos. Los protocolos A y D cuentan por otra parte con una dispersión mucho mayor de los datos en este parámetro y además todos por encima del valor óptimo.

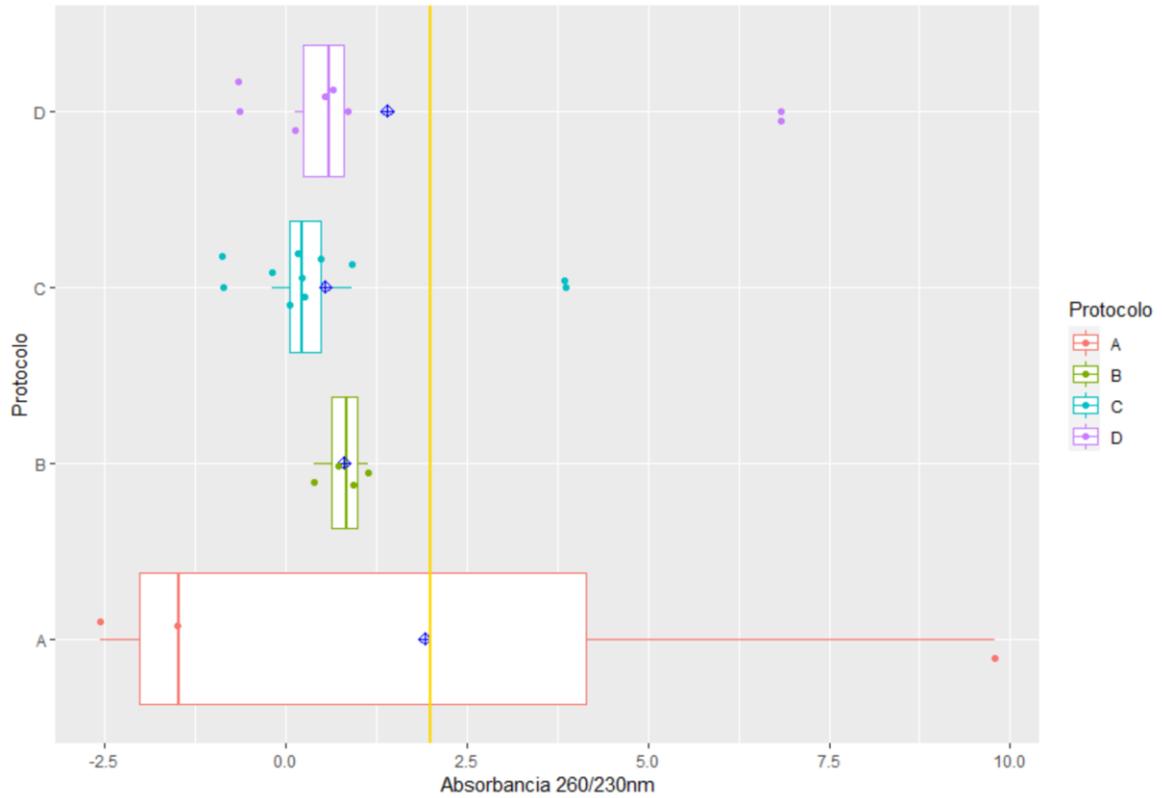


Figura 18. Diagrama de caja y bigotes de protocolos y calidad en A260/230nm

Diagrama de caja y bigotes comparando los diferentes protocolos de extracción probados (D) eje y versus la calidad de ADN extraído en Absorbancia 260/230nm eje x. Se observan las medias de cada protocolo en color azul y también se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 2, el cual es el valor óptimo de absorbancia en este parámetro de calidad de ADN.

En este caso el protocolo A tuvo la media más cercana a 2, sin embargo, la dispersión de este protocolo es demasiado grande para considerarse buena, el resto de los protocolos con una media que se encuentra distante a 2 y con menor dispersión de datos, se presentan datos atípicos en C y en D bastante alejados, en valores cercanos a 4 y 7.

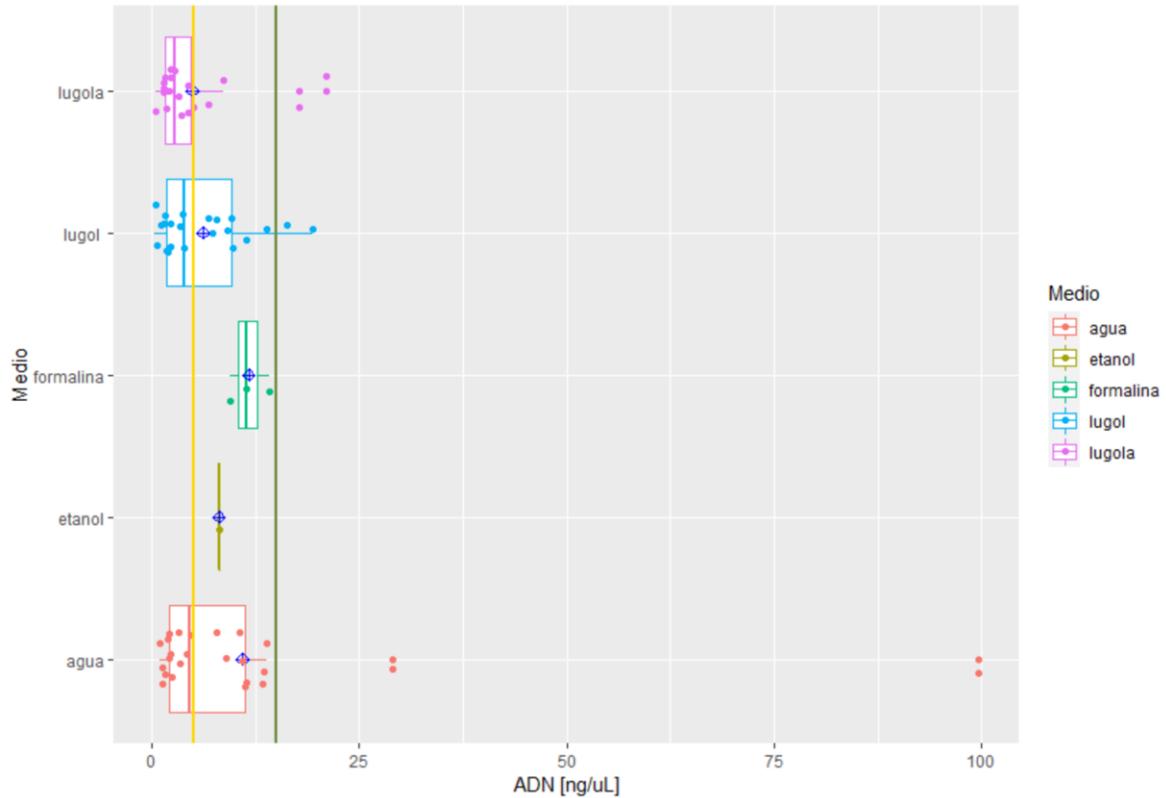


Figura 19. Diagrama de caja y bigotes de medios y cantidad de ADN extraído.

Diagrama de caja y bigotes comparando los diferentes medios en que se encontraban las muestras eje y, estos son agua de agua marina, etanol al 95%, formalina 4%, Lugol y Lugol ácido (lugola) versus la cantidad de ADN extraído en [ng/uL] en el eje x. Se observan las medias de cada medio en color azul y también se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 5ng/uL y en color verde una línea que indica el valor de 15ng/uL.

Las muestras en agua y lugol fueron las que mayor concentración de ADN alcanzaron, esto se muestra tanto en los valores máximos como en los datos atípicos y media de cada uno, siendo ambas medias bastante altas cercanas a 5ng/uL para Lugol y a 15ng/uL para agua, además de tener datos superiores a 15ng/uL en sus valores atípicos. Estos medios también tienen valores debajo de 5ng/uL y mayor dispersión de datos comparado con el resto. En Lugol ácido se puede observar que la media es 5, sin embargo, más datos se encuentran debajo de este número y unos pocos arriba, se pueden observar también datos atípicos arriba de 15ng/uL. Las muestras de formalina y la muestra de etanol se pueden observar arriba de 5ng/uL, también se observan datos cercanos a 15ng/uL en formalina.

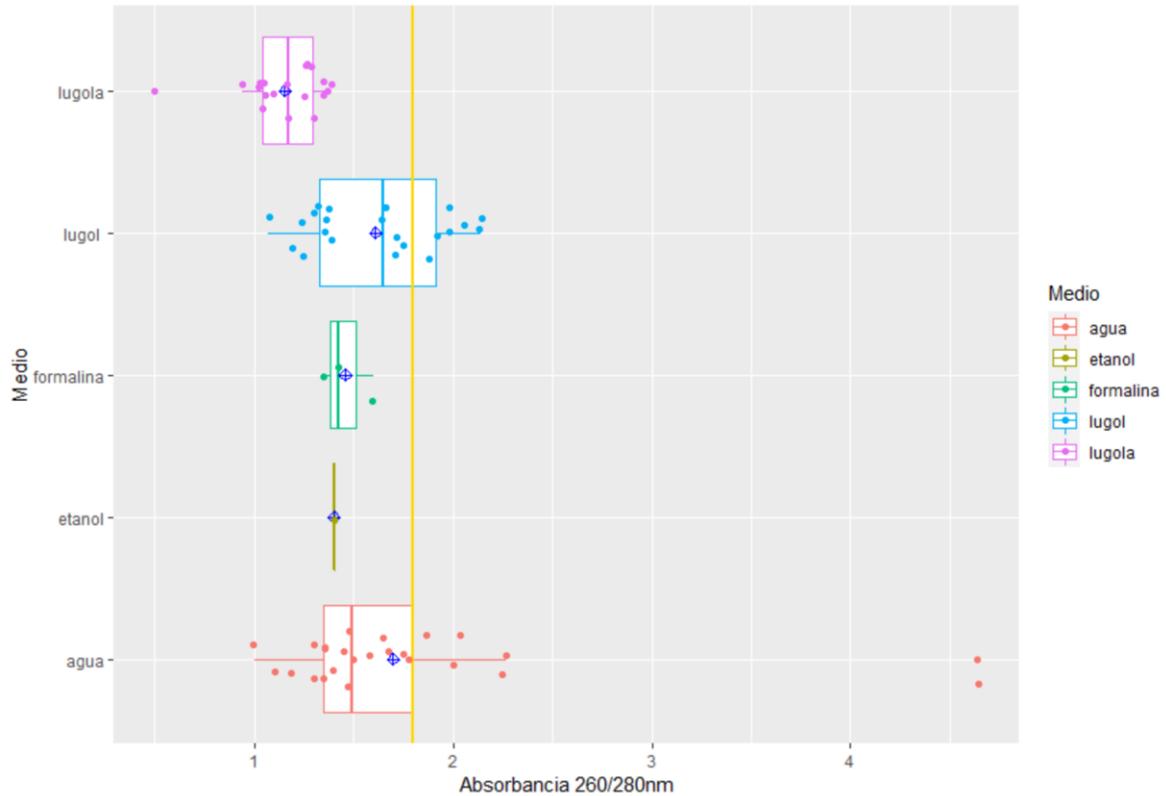


Figura 20. Diagrama de caja y bigotes de medios y calidad de ADN en A260/280nm.

Diagrama de caja y bigotes comparando los diferentes medios en que se encontraban las muestras eje y, estos son agua de agua marina, etanol al 95%, formalina 4%, Lugol y Lugol ácido (lugola) versus la calidad del ADN extraído en Absorbancia a 260/280nm en el eje x. Se observan las medias de cada medio en color azul y también se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 1.8 el cual es el valor que se considera óptimo para ADN extraído en esta longitud de onda.

En este caso se puede observar nuevamente que Lugol y agua son los medios cuyos datos se acercan más al valor de 1.8, es decir que estas muestras tuvieron la mejor calidad de ADN extraído, se observa que los valores de muestras en medio agua se encuentran menos dispersos que Lugol, pero presentan datos atípicos y varios datos debajo de 1.8, cercanos a 1. En el medio Lugol no se observan datos atípicos, sin embargo, se observa dispersión y la mayoría de los datos debajo de 1.8. En los medios formalina y etanol, ambas medias se encuentran debajo de 1.8, alrededor de 1.5. El medio Lugol ácido es el que presentó valores más bajos de calidad de ADN presentando valores cercanos a 0 y la media cercana a 1.

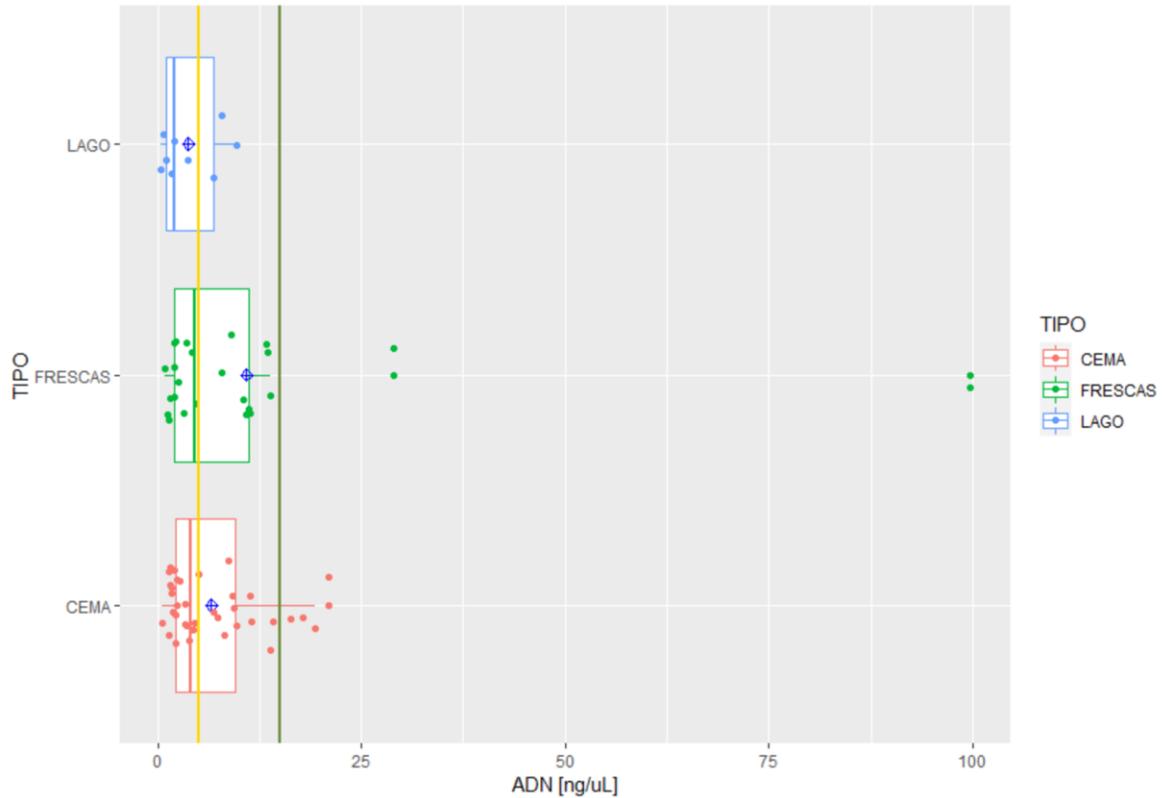


Figura 21. Diagrama de caja y bigotes de tipos de muestra y cantidad de ADN extraído.

Diagrama de caja y bigotes comparando el tipo de muestra ya sea provenientes del Lago de Amatitlán, muestras Frescas de mar y muestras proporcionadas por el CEMA-USAC en el eje y versus la concentración de ADN extraído en [ng/uL] en el eje x. Se observan las medias de cada tipo en color azul y también se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 5ng/uL y una línea verde al valor de 15ng/uL.

Se observa que las muestras frescas y muestras proporcionadas por el CEMA-USAC son aquellas con mayores concentraciones de ADN pues ambas tienen valores por encima de los 15ng/uL, sin embargo, las muestras frescas con concentraciones arriba de los 25ng/uL y casi llegando a 100ng/uL. Las muestras del lago tuvieron las concentraciones más bajas de ADN extraído con la media debajo de 5ng/uL y ninguno de los valores llegó a la línea de 15ng/uL. La dispersión de los datos es baja para los tres tipos de muestras y todos contienen valores cercanos a 0ng/uL.

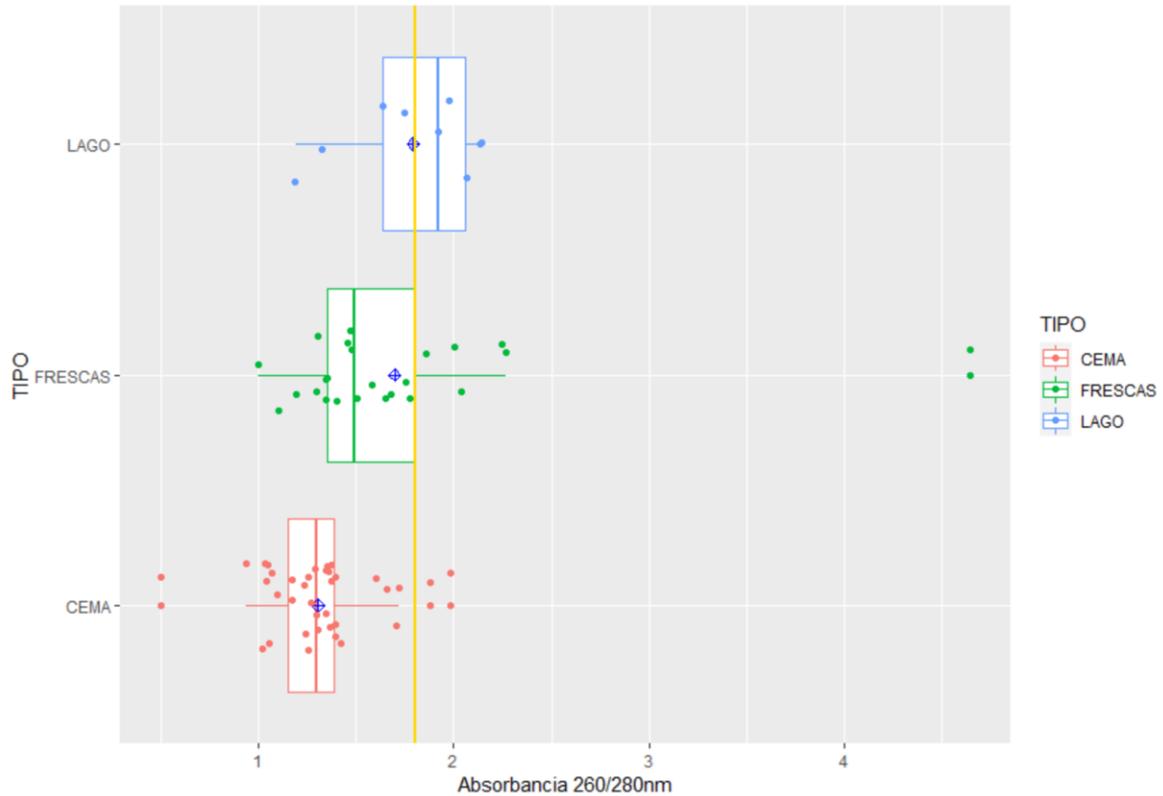


Figura 22. Diagrama de caja y bigotes de tipos de muestra y calidad en A260/280nm.

Diagrama de caja y bigotes comparando el tipo de muestra ya sea provenientes del Lago de Amatitlán, muestras Frescas de mar y muestras proporcionadas por el CEMA-USAC en el eje y versus la calidad del ADN extraído en Absorbancia a 260/280nm en el eje x. Se observan las medias de cada tipo en color azul y también se observa en color amarillo una línea que indica el valor de 1.8 el cual es el valor que se considera óptimo para ADN extraído en esta longitud de onda.

Las muestras frescas de mar tienen la media cercana a 1.8, la dispersión de los datos es mayor que las muestras proporcionadas por el CEMA-USAC y datos atípicos arriba de 4.5. Por otra parte, las muestras proporcionadas por el CEMA-USAC tienen una media cercana a 1 y datos en 0, además, la mayoría de sus datos se encuentran por debajo de 1.8. Por último, las muestras del lago presentan un ADN bastante íntegro pues la media se encuentra en 1.8, no hay datos por encima de 2.5 y sus datos más bajos son cercanos a 1 sin embargo no llegan a ese valor.

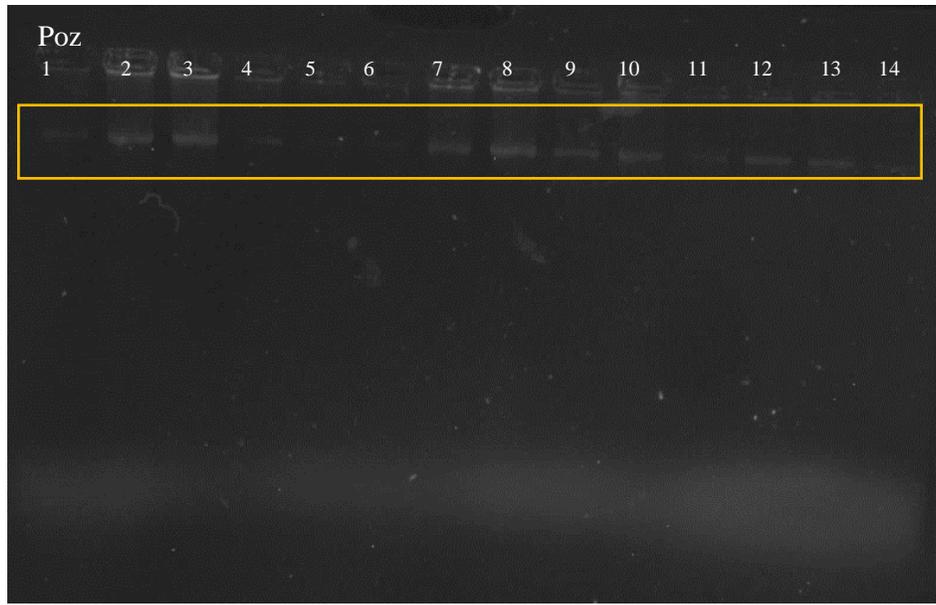


Figura 23. Gel de integridad de muestras Frescas.

Este gel se realizó al 1.5% de agarosa y se dejó correr durante 1 hora a 90V. Se observan bandas en los 14 pozos, sin embargo, en los pozos 4, 5, 6, 11 y 14 estas son tenues, pertenecientes a las muestras con código 1.3F, 1.4F, 2.2F, 5F1 y 5.2F (Anexos. Cuadro 16). Esto indica la presencia de ADN en todas las muestras, además de esto las bandas son únicas es decir que el ADN no se encuentra fragmentado o escalonado. Lo cual indica que se extrajo ADN de buena calidad y en las muestras con bandas tenues indica una menor concentración de ADN extraído.

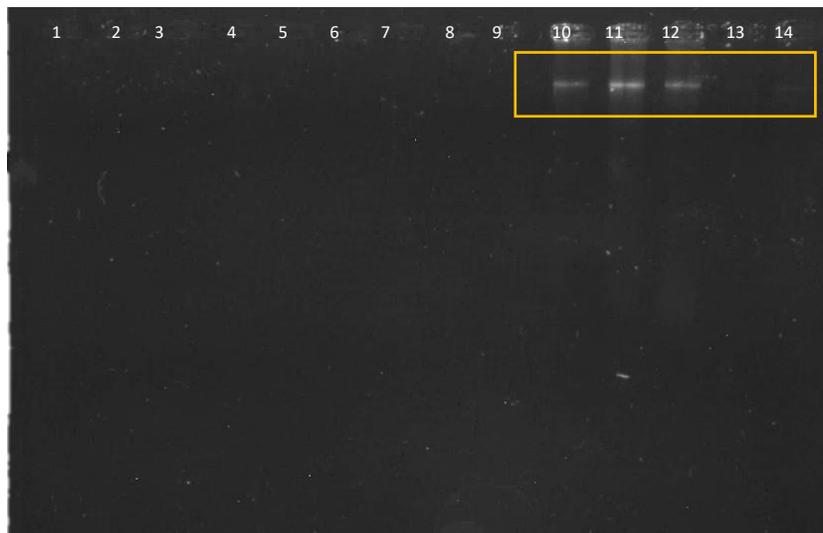


Figura 24. Gel de integridad de muestras proporcionadas por el CEMA-USAC y del Lago.

En los pozos 1-8 y muestras tomadas del Lago de Amatitlán en los pozos 9-14. Este gel se realizó al 1.5% de agarosa y se dejó correr durante 1 hora a 90V. En este caso únicamente se

observan bandas en los pozos 10-14 los cuales corresponden a las muestras tomadas del Lago de Amatitlán con códigos AF2.2, AF2.3, AF1.1, AF1.2 respectivamente. En los pozos 13 y 14 se observan bandas muy tenues. En este caso se observan las bandas de los pozos 10-12 fuertes en comparación a las muestras frescas (Figura 17) indicando una mayor cantidad de ADN. No se observa el ADN fragmentado ni escalonado lo cual indica que es de buena calidad. En cuanto a los pozos 1-8, es decir las muestras proporcionadas por el CEMA-USAC no se observan bandas claras ni bandas tenues por lo que el ADN de estas muestras tenía concentraciones muy bajas y calidad no óptima para correr en el gel ya que en este caso sí se midió en el espectrofotómetro y demostró contener ADN (Figuras 14 y 15, Anexos. Cuadro 16).

C. Amplificación del gen precursor de saxitoxina *sxta*

Se logró amplificar el gen *sxta4-* en muestras del Lago de Amatitlán (Figura 23) y muestras Frescas (Figura 22). Sin embargo, en las muestras obtenidas del Lago de Amatitlán se nota ADN escalonado y bandas a diferentes tamaños (pares de bases) esto debido a que el cebador directo orientado a saxitoxina en *P. bahamense* se mezcló con un cebador orientado a saxitoxina pero para varios organismos por lo cual se muestran distintas bandas en lugar de solo una (Figura 23). En la Figura 22 se observa la amplificación de ADN en dos pozos, sin embargo, no se logran observar bandas completas a la altura esperada, 500bp.

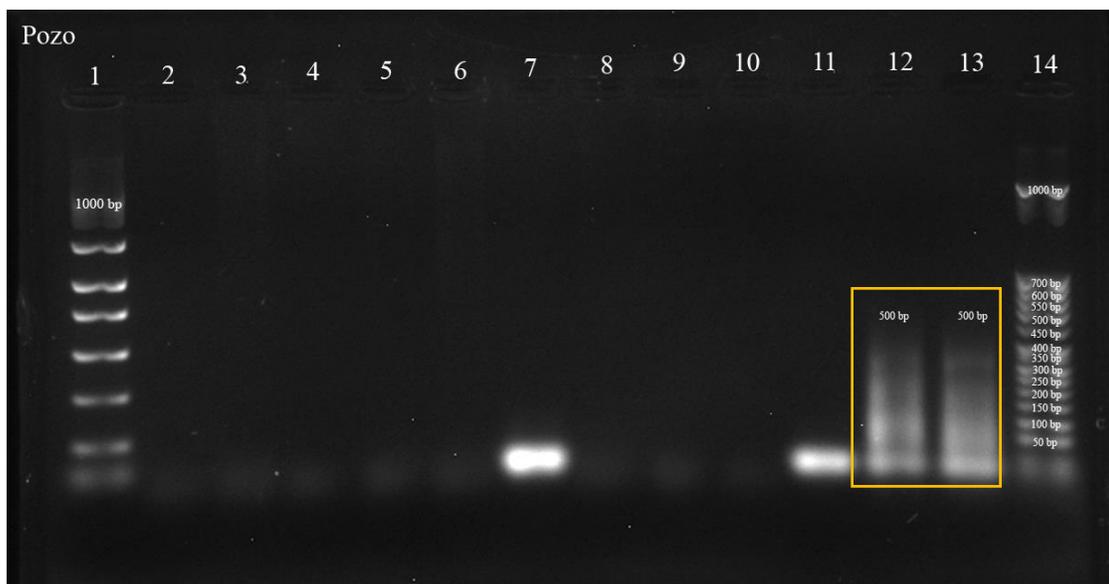


Figura 25. Productos de PCR para el gen SXT en muestras frescas.

Gel de agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para los marcadores moleculares orientados al gen precursor de la saxitoxina en muestras Frescas. Se pueden observar bandas escalonadas en los pozos 12 y 13. Se observa la escalera que va de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 1 y la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 14.

Las muestras que presentan bandas escalonadas (pozo 12 y 13) corresponden a los códigos 3F1 y 1F1 respectivamente (Anexos. Cuadro 14). Esto indica que únicamente en estas muestras se

encontraba el gen *sxt4*-, sin embargo, a pesar de mostrarse escalonada desde la altura de 500 pares de bases, no se logran observar bandas claras ni diferenciadas.

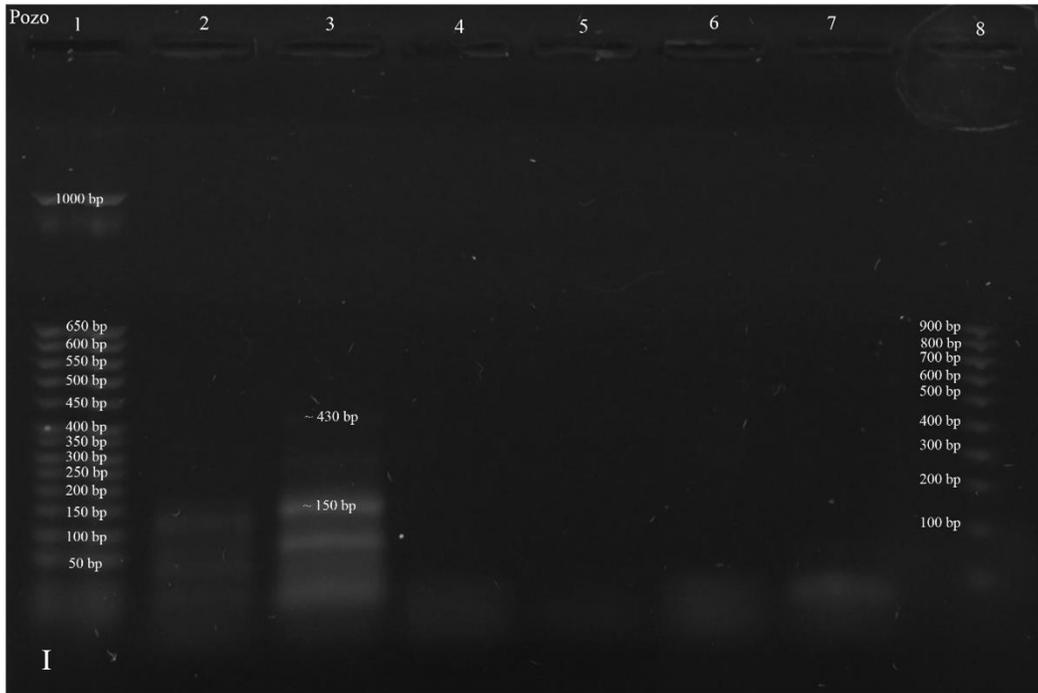
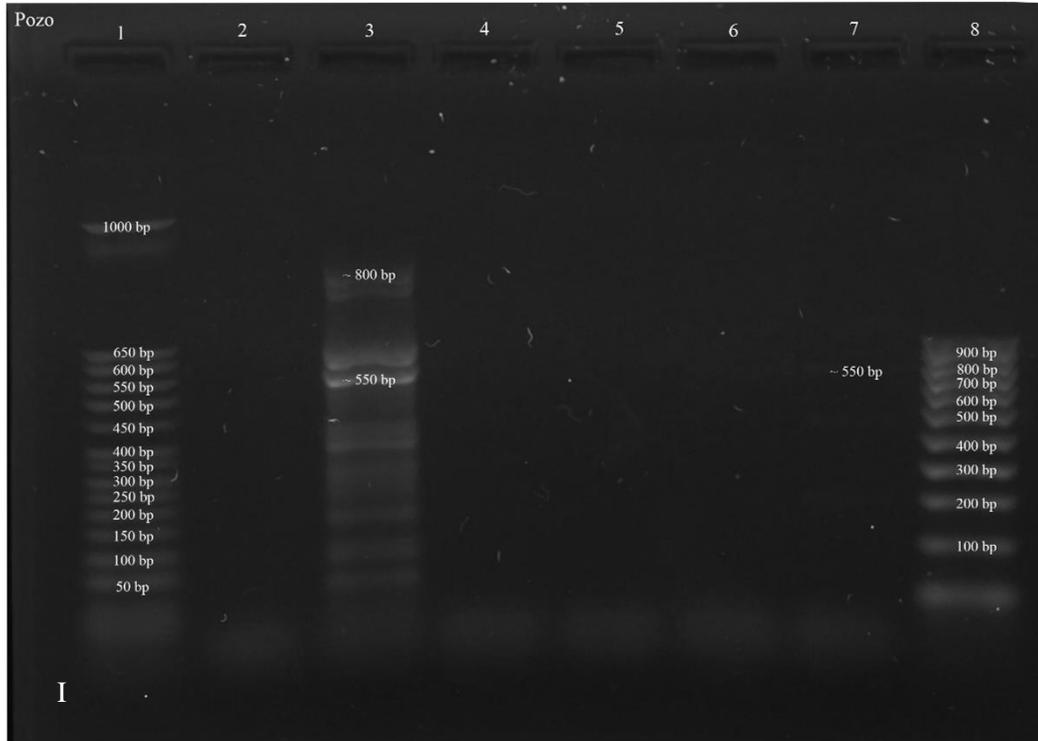


Figura 26. Productos de PCR para el gen SXT con cebadores combinados.

Gel de agarosa 1% en el cual se visualiza el producto del PCR para los marcadores moleculares orientados al gen precursor de la saxitoxina en muestras Frescas. Se pueden observar

bandas escalonadas en los pozos 3.I y 3.II Se observa la escalera que va de 100 a 1000 pares de bases en el pozo 8 y la escalera de 50 a 1000 pares de bases en el pozo 1 tanto arriba como abajo.

En este gel se observan bandas escalonadas en el pozo 3 de arriba (I) correspondiente a la muestra con el código AF2.2, abajo (II) también se observan dos bandas escalonadas en el pozo 2 y 3 correspondientes a las muestras con códigos AF1.1 y AF2.1 respectivamente, todas las bandas se encuentran escalonadas sin embargo se pueden distinguir las bandas específicas a varios tamaños, abajo se observa en el pozo 2 una banda en 150pb y muy tenue alrededor de 450pb. Arriba (I) se observa en la banda escalonada una banda fuerte a ~800pb y a 500pb, también se observa en el pozo 7 una banda muy tenue a ~550pb. Este ADN escalonado se debe, como se mencionó con anterioridad a que en esta reacción de PCR se realizó una mezcla de cebadores utilizando el cebador directo orientado a saxitoxina de *P. bahamense* SxtA4166F (5'-CATGGCTGCGGCGTTCTTG-3') y el cebador reverso orientado a saxitoxina de varios organismos sxt008 (5'-GGGTCCAGTAGATGTTGACGATG-3') (Stüken *et al.*, 2011).

Cuadro 11. Tasa de amplificación de los cebadores utilizados

Nombre	Secuencia	Tasa de amplificación (%)
REL18S1F - REL18S1R	(5'- GTT GCG GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA- 3') - (5'-AAC AAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT GAC-3')	44
SxtA4166F - PyrosxtA4R680	SxtA4166F (5'-CATGGCTGCGGCGTTCTTG-3') - PyrosxtA4R680 (5'-CTAGATGGGGTACCACATAG-3')	15
Pcomp370F - Pcomp1530R	(5'-AAATTACCCAATCCTGACACT-3') - (5'-CTGATGACTCAGGCTTACT-3')	0
18SF08 - R0ITS	(5'-TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG-3') - (5'-CCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTC-3').	0

Se calculó la tasa de amplificación de cada uno de los cebadores probados durante el estudio basado la cantidad de muestras que se probó versus la cantidad de muestras con algún tipo de amplificación, no se tomaron en cuenta únicamente las bandas claras.

VII. Discusión

A. Detección de *Alexandrium* y *Pyrodinium bahamense* con marcadores moleculares y microscopía óptica.

Actualmente, los FAN en Guatemala y el mundo están siendo monitoreados y manejados con técnicas de cuantificación de toxinas en organismos afectados (bivalvos, camarones, etc.). Técnicas como cromatografía líquida, de absorbancia atómica, sistemas de monitoreo remoto vía imágenes satelitales o drones, entre otros (Rashidi *et al.*, 2021). Esto combinado con identificación morfológica de las especies productoras de toxinas, causantes de FAN (García-Pérez *et al.*, 2020b; Liu *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2017).

La identificación morfológica requiere poder dilucidar todas las características de los dinoflagelados como la cantidad de placas en cada teca, la posición del poro apical y antiapical, presencia de poros superficiales, entre otras y también la utilización de microscopios que permitan una visión tridimensional que provea una mejor visualización de estas características (Cuellar-Martinez *et al.*, 2018; Reis Costa *et al.*, 2010; Usup *et al.*, 2012). Los métodos moleculares facilitan la identificación de estas especies y además proveen una forma de detección y pronóstico temprana de FAN (Anderson *et al.*, 2005).

Se realizó la amplificación de los cebadores orientados a dinoflagelados (Metodología H1) con una tasa de amplificación positiva de 44% (Cuadro 11), esto para todos los tipos de muestra utilizados. Este resultado se puede clasificar como exitoso para estos cebadores, tomando en cuenta además que el volumen del cual se extrajo ADN fue únicamente 1mL de muestra de plancton. En diversos estudios se ha realizado extracción de ADN para dinoflagelados utilizando alícuotas de cultivos puros del organismo de interés y con volúmenes de 10mL y hasta 50mL (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2019; Vingiani *et al.*, 2020).

Debido a esta concentración y calidad del ADN extraído (Figura 18 y 19), las tasas de amplificación para los amplicones orientados a *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp (Metodología H2). fue 0% (Cuadro 9) esto dado a los tamaños de estos amplicones que fue de 1000-1500 pb ya que la calidad, especialmente en absorbancia de 260/230nm fue bastante alejada de los valores óptimos (Figura 21). Sin embargo, debido a que este estudio buscó el establecimiento de un precedente para la implementación de métodos moleculares en el monitoreo de FAN en Guatemala, el establecimiento de cultivos puros no es una opción viable, pues estos se toman de 3 a 4 semanas en tener un crecimiento óptimo (Vingiani *et al.*, 2020).

Estas tasas de amplificación también pueden deberse al número de células de esta especie y género encontradas en la mayoría de las muestras, ya que solamente en algunas se encontraron individuos de *P. bahamense* o *Alexandrium* spp. Esto exceptuando las muestras del CEMA-USAC pertenecientes al florecimiento de *P. bahamense* reportado en 2018 (García-Pérez *et al.*, 2020a), (Anexos. Cuadro 11) en las cuales se puede hipotetizar que la calidad del ADN extraído inhibió la amplificación de estos cebadores pues tampoco se lograron observar bandas de estas muestras en los geles de electroforesis realizados para observar la integridad de este (Figura 23).

En la visualización morfológica realizada, se observaron células de dinoflagelados en 100% de las alícuotas analizadas (Anexos, Cuadro 17), por lo que la tasa de amplificación de los cebadores

orientados a dinoflagelados se pudo ver afectada por el volumen utilizado para la extracción, por la cantidad de ADN que se logró extraer de cada una de las muestras individuales y también de la calidad de este (Anexos, Cuadro 16). Al ser un volumen pequeño comparado con lo utilizado comúnmente, la cantidad de ADN extraído no es igual a la cantidad de ADN de dinoflagelados extraído, por lo que no hay un criterio ni un estándar que pueda utilizarse para saber el origen de esta amplificación negativa del 66%.

En las muestras fijadas se encontraron cantidades bastante bajas de células de dinoflagelados (Anexos, Cuadro 17), estas cantidades afectan la cantidad de ADN extraído por muestra, sin embargo se observaron bastantes células de diatomeas y la cantidad de zooplancton variaba en cada una de las muestras por lo que, al ser muestras colectadas y no cultivos puros se extrajo mucho menos ADN de dinoflagelados es decir que la concentración de estas células no era tan alta para lograr amplificar los productos deseados para las reacciones de PCR (Cuadro 9); especialmente de estos cebadores pues el tamaño esperado del amplicón fue de 1000-1500pb (Cusick *et al.*, 2016; Orr *et al.*, 2011).

Se comprobó por la amplificación de los cebadores REL18S1F - REL18S1R orientados a dinoflagelados (Metodología G.1) la presencia de ADN perteneciente a dinoflagelados en el medio, este ADN perteneciente a *P. bahamense* y *Alexandrium spp.* en algunas muestras según la visualización en microscopía óptica y el conteo de células de dinoflagelados (Anexos, Cuadro 17). No se logró identificar molecularmente a *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium spp.* con cebadores específicos (Metodología G2 y 3; Cuadro 9).

Es importante conocer el origen de los cebadores anteriormente mencionados, pues estos provienen del gen 18S. Este es un gen conservado por los organismos eucariotas (Aylagas *et al.*, 2016), por lo que la amplificación positiva pudo deberse a otros eucariontes en el medio a pesar de estar orientados y optimizados a diversas cepas de dinoflagelados existe este error y es por eso que se prefiere utilizar cultivos puros (Lin *et al.*, 2006). Este error no pudo ser evidenciado debido a la ausencia de un control positivo y distintos controles negativos para el estudio.

I. Protocolo de extracción

Se realizó la extracción de ADN de muestras fijadas en distintos medios los cuales son formalina 4%, lugol, lugol ácido y etanol al 95%; sin embargo; la cantidad del ADN extraído no fue en ninguno de los casos mayor a 50ng/uL (Figura 15 y 19). En las muestras colectadas y colocadas en agua únicamente, es decir muestras frescas sin fijador sí se logró extraer cantidades cercanas a 100ng/uL lo cual puede estar relacionado tanto con el medio de fijación como con la cantidad y tipo de células en cada una de las muestras. Debido a la presencia de varios organismos en la muestra, no se puede tener un estimado directo de cuanto del ADN extraído era perteneciente a dinoflagelados, únicamente se puede asegurar que se extrajo el ADN de las muestras de plancton fijadas y frescas siendo estas últimas las que mayores concentraciones de ADN presentaron, especialmente en sus datos atípicos (Figura 18).

El número de células en cada muestra es importante para la cantidad de ADN que se puede extraer de cada una de estas (Inglis *et al.*, 2018). En este caso se realizó la extracción en pruebas formadas por alícuotas de varias muestras (Metodología D Anexos, Cuadro 14). El pellet de células formado de cada una de estas, a pesar de cada muestra ser de 1mL, fue variable en tamaño y composición de organismos lo cual significa que el número de células por muestra también fue diferente entre cada una de estas (Anexos, Cuadro 14 y 16). El protocolo C tuvo valores de ADN

extraído, cercanos a 25ng/uL (Figura 15) lo cual demostró que este protocolo fue el óptimo para la extracción de ADN de todas las muestras utilizadas, además de la calidad del ADN en absorbancias 260/280nm presentó mejores valores en comparación a los demás protocolos probados (Figura 16).

Se logró extraer ADN en cantidades consideradas favorables para estudios moleculares 5ng/uL durante esta investigación (Figura 19) en la cual se observa que la cantidad de ADN en las muestras no tuvo variaciones contrastantes con las muestras en agua fresca por lo que, el protocolo C, establecido, es efectivo para realizar la extracción de ADN en muestras de plancton fijadas y frescas. Esto a pesar de que las distintas sustancias de fijación que se utilizaron fueron variables (Anexos, Cuadro 16). La calidad de ADN en absorbancia 260/280nm no mostró variaciones considerables en los tipos de muestra, sin embargo las muestras frescas tuvieron valores más cercanos al óptimo (1.8) que el resto de sustancias fijadoras (Figura 20) por lo que el medio sí afectó la calidad de ADN extraído en cada muestra (Campos & Gilbert, 2012; Serth *et al.*, 2000).

En cuanto a la absorbancia 260/230nm no se observó que ninguno de los protocolos tuvieran valores favorables (Figura 17), pues los valores óptimos de calidad en esta absorbancia van de 2 a 2.2 (Datukishvili *et al.*, 2010; Monroy-Vaca *et al.*, 2014). Esta longitud de onda es importante para dilucidar la pureza del ADN extraído y corroborar que funcione en la amplificación de PCR (*Control de Calidad / Banco Nacional de ADN*, 2022). Los valores menores a 1.8 en esta longitud de onda indican posible contaminación por proteínas, carbohidratos o ARN, sin embargo; estos valores pueden ser utilizados como de “pureza óptima” para concentraciones iguales o mayores a 50ng/uL (Cubero *et al.*, 1999). En las muestras extraídas de prueba, ninguna tuvo estas concentraciones (Figura 20), además se presentaron en algunos datos atípicos valores A_{260/230nm} mayores a 2.2 lo cual indica una fuerte contaminación por fenoles, carbohidratos o ARN.

Debido a que no se utilizó fenol en los protocolos probados (D), esta contaminación puede ser de residuos de cloroformo y errores de pipeteo al realizar el traslado para la precipitación del ADN. Otra fuente de contaminación puede deberse a que no se pudo agregar ARNasa a las muestras al finalizar las extracciones por lo que pudo existir ARN en las muestras y este el causante de la calidad de ADN extraído. Además, se observó que el protocolo A tuvo una gran dispersión de datos y valores muy superiores a 2.2 por lo que este protocolo se descartó tanto por calidad como por cantidad de ADN extraído (Figura 15, 16 y 17).

Los tampones de extracción utilizados en las pruebas de protocolos de extracción (D) contenían los mismos componentes (SDS, CTAB, Tris-HCl y EDTA), sin embargo, las concentraciones y pH de cada uno de estos influyó en la cantidad y calidad de ADN extraído esto dado el origen de cada una de las muestras. Se ha demostrado que la digestión o lisis alcalina de las muestras (especialmente muestras fijadas en formalina) es importante para lograr el correcto rompimiento celular y liberación del ADN al medio (Campos & Gilbert, 2012).

En estas pruebas se mantuvo el pH alcalino en todos los protocolos pues se utilizó tris-HCl en pH 8 para todos los tampones de lisis realizados. Esto indica que las variaciones de pH fueron dadas por el SDS y CTAB. El SDS es un surfactante utilizado muy comúnmente en extracciones de ADN, las concentraciones de 0.5% que se utilizaron en los tampones de lisis no alteraron el pH de la solución pues esta siguió siendo alcalina. En el protocolo que utilizó CTAB (Protocolo A), sí se alteró el pH pues este reactivo necesita otros componentes para producir la lisis de las paredes celulares debido a esto es utilizado comúnmente en plantas («CTAB Extraction Buffer», 2009; Telzur *et al.*, 1999) . A pesar de la naturaleza de las tecas de los dinoflagelados, formada por varios

compuestos minerales y polisacáridos como celulosa, semejante a las paredes celulares de células vegetales (Spector, 1984), la extracción con CTAB no produjo los mejores resultados de calidad ni cantidad de ADN (Figura 15, 16 y 17).

La lisis alcalina con SDS fue entonces el mejor procedimiento para realizar la extracción de muestras de plancton fijadas (Figura 15, 16 y 17) mostrando los parámetros de calidad en A260/280 óptimos y la mayor cantidad de ADN extraído, esto también debido al tiempo de 72 horas de lisis (iv. C). Combinado a esta, el proceso de “salting out” es muy utilizado en extracciones de ADN («CTAB Extraction Buffer», 2009; Tel-zur *et al.*, 1999), especialmente para tejidos vegetales, este consiste en la precipitación de proteínas con la ayuda de sales (Aljanabi & Martinez, 1997; Campos & Gilbert, 2012; Datukishvili *et al.*, 2010); en los protocolos probados, se realizó “salting out” en el A y el C sin embargo la mejor precipitación de proteínas se dio en el protocolo C esto se puede comprobar con la pureza medida del ADN (Figura 16 y 17).

Se demostró que la lisis alcalina con proteinasa K y “salting out” fue el mejor método para la extracción del ADN, la proteinasa K a concentraciones bajas (200ug/mL) ayuda a la lisis de los tejidos y células en la extracción de ADN, en este caso no se probaron protocolos sin proteinasa K, sin embargo, se utilizaron a distintas concentraciones debido a la disponibilidad de este reactivo en el laboratorio, la cantidad de proteinasa K afecta a la cantidad de ADN que se extrae (Campos & Gilbert, 2012).

El cloroformo comúnmente es utilizado en combinación con fenol y alcohol isoamílico (Barnett & Larson, 2012). Estos reactivos son importantes ya que son los que determinan en su mayoría la calidad y cantidad de ADN que se puede obtener. Estos deben tener la capacidad de separar el ADN y de resuspender o disolver posibles contaminantes como lo son proteínas, carbohidratos y lípidos. El uso de cloroformo sin ningún otro reactivo facilitó la extracción de ADN realizada en el protocolo C y D, debido a que este sirve para la separación de la fase orgánica y la fase acuosa dejando el ADN resuspendido en la fase acuosa para su futura precipitación. En el primer protocolo probado, A, se utilizó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), sin embargo al mostrar una baja pureza (Figura 19 y 20) al igual que el protocolo B, se descartó debido a la cantidad y calidad de ADN extraído (Figura 15, 16 y 17), este último es más utilizado en tejidos animales (Peñañiel *et al.*, 2019).

El etanol y acetato de amonio son los encargados de precipitar el ADN. Se utiliza normalmente acetato de amonio para precipitación de tejidos animales (Peñañiel *et al.*, 2019), sin embargo, este se eligió preferiblemente al acetado de sodio dado la capacidad de precipitación ya que se probaron ambos en el protocolo de extracción C y se observó que las muestras a las que se les agregó acetado de amonio tuvieron mayor concentración de ADN (Anexos. Cuadro 15).

El protocolo C fue efectivo tanto para muestras fijadas como para muestras frescas y sin importar la cantidad de células (tamaño de pellet), medio u origen, tuvo rendimientos que son considerados normales y hasta altos para muestras de plancton (Yuan *et al.*, 2015) por lo que se seleccionó como un método efectivo y de bajo costo para la extracción de ADN de muestras de plancton colectadas.

J. Amplificación del gen precursor de saxitoxina sxt

Se realizó la amplificación del dominio sxt4- en muestras frescas colectadas en el Pacífico guatemalteco y en muestras en Lugol colectadas en el Lago de Amatitlán. En esta amplificación se

pueden observar bandas escalonadas para las muestras en Lugol (provenientes del lago) esto debido a que se realizó la reacción de PCR utilizando dos cebadores de distintos pares (Figura 25), se utilizó el cebador reverso de los cebadores para saxitoxina de diferentes organismos productores pero orientado al complejo *sxta4+* (Stüken *et al.*, 2011) y el cebador directo para saxitoxina orientado específicamente en *P. bahamense* (Cusick & Duran, 2021). Esta unión de cebadores produjo distintos productos de PCR a varios tamaños, lo cual se observó en un ensayo PCR *in silico* que se realizó anterior a la reacción de PCR en el laboratorio (Anexos. Figura 32). Esta reacción demostró que es posible la amplificación de distintas regiones del dominio *sxt4+* y *sxt4-* ya que el gen STX cuenta con más de 30 dominios (Akbar *et al.*, 2020; Hackett, Anderson, *et al.*, 2004).

Se observó que con las muestras frescas no se amplificaron bandas claras, sino barridos de producto de PCR (Figura 25). Estos barridos del producto de PCR pueden deberse a varias razones relacionadas tanto con la optimización del programa como con variantes del gen que se desea amplificar, esto se ha demostrado con bacterias, en el gen 16S (Zrimec *et al.*, 2013) esto debido a variantes estructurales del gen que se desea amplificar. Sin embargo también puede deberse a la baja especificidad de los cebadores que puede deberse al cebador o a la temperatura de alineamiento que se esté utilizando (Musheev & Krylov, 2006).

Para los cebadores orientados al dominio *sxta4-* y *sxta4+* se probaron varias temperaturas de alineamiento (Cuadro 8) por lo que se puede hipotetizar que el barrido observado en los productos de PCR para muestras frescas (Figura 25) no se debe a la temperatura de alineamiento utilizada; sin embargo; podrían hacerse PCR con gradientes de temperatura para determinar si se puede lograr una optimización del programa. La especificidad de los cebadores se ha comprobado en diversos estudios, sin embargo dichos estudios se han realizado con cultivos de dinoflagelados, no con la cantidad de muestras plantónicas como las que se probaron en este estudio (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Cusick & Duran, 2021; Murray *et al.*, 2011).

Según la naturaleza de las muestras y lo observado en los microscopios (Anexos. Cuadro 17. Figura 31) se observaron diferentes especies de dinoflagelados, de géneros que no se han categorizado como tóxicos para Guatemala por ejemplo el género *Tripos*, *Proceratium*, *Dinophysis*, etc. Debe tomarse en cuenta que estos dinoflagelados podrían no estar expresando el gen SXT y por ende no estar produciendo saxitoxina, pero poseer el dominio *sxta4* para diferentes fines debido a que las rutas metabólicas y la función de todos los dominios del gen SXT no ha sido dilucidada por completo (Stüken *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2019). Además, cabe destacar que en distintos estudios se ha evidenciado la producción de toxinas para *Dinophysis* y *Proceratium* (Anderson, Cembella, *et al.*, 2012; Rashidi *et al.*, 2021) por lo que aunque no hayan presentado FAN en Guatemala, podrían tener un potencial toxicológico para la ZMC guatemalteca.

Se ha determinado que el gen SXT y sus dominios, especialmente el dominio *sxta4* es bastante conservado en los dinoflagelados marinos caracterizados como tóxicos (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Akbar *et al.*, 2020); también que este gen tiene homólogos y diferentes dominios en organismos productores de saxitoxina por ejemplo entre cianobacterias, diatomeas y dinoflagelados marinos (Akbar *et al.*, 2020). Debido a que no se conoce la función de cada dominio del gen SXT para la producción de las distintas moléculas de saxitoxina. Se ha determinado que estos dominios pueden estar ligados a producción de distintas moléculas secundarias en variedades no tóxicas de dinoflagelados marinos (Hackett, Anderson, *et al.*, 2004; Hackett *et al.*, 2013; Vingiani *et al.*, 2020). Esta información es importante pues nos indica que no necesariamente una amplificación del

gen *sxta4* es suficiente para evidenciar o pronosticar un FAN de saxitoxina, por lo que métodos de monitoreo integrados y constantes son necesarios.

Se ha estudiado que las variaciones en el medio y distintos factores de estrés provenientes del ambiente pueden provocar distintos patrones de amplificación y expresión del gen *sxta* debido a que se ha demostrado que distintas especies de *Alexandrium* y variedades de estas especies pueden producir saxitoxina si son expuestas a deficiencias de nutrientes como fósforo o nitrógeno bajo condiciones de laboratorio, sin embargo en condiciones de vida silvestre estas variedades son clasificadas como “no tóxicas” por lo que se cree que la expresión y viabilidad del gen está ligada a estos factores medioambientales debido a que su producción de toxina por célula es baja rondando los 0.5fmol (Tunin-Ley *et al.*, 2009; Vingiani *et al.*, 2020). Se ve afectado el gen en cuanto a variaciones estructurales, por ejemplo en distintas variantes se han observado variaciones en el codón de stop debido a su origen y distintas variantes estructurales de la toxina, las proteínas codificantes y demás (Kellmann *et al.*, 2010; Vingiani *et al.*, 2020); esto da la pauta a creer que la amplificación vista en las distintas reacciones de PCR con las muestras utilizadas puedan contener distintas variaciones por lo que un mayor estudio de los estresores ambientales que son detonantes para la producción de FAN y de las variaciones de este gen es necesario para entender las dinámicas de este gen en los dinoflagelados presentes en el Pacífico guatemalteco.

Actualmente, los métodos de estudio de saxitoxina y plancton, especialmente monitoreos y detección de la toxina se realizan por métodos de cromatografía HPLC (Hackett *et al.*, 2013; Vingiani *et al.*, 2020). Los estudios moleculares y la determinación de la ruta del gen hasta la producción y liberación de la saxitoxina continúan escasos y sin ser implementados como rutinarios (Rashidi *et al.*, 2021), sin dado la naturaleza de este gen y la complejidad del mismo (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Akbar *et al.*, 2020; Anderson, Alpermann, *et al.*, 2012).

Es importante ahondar en estos estudios y dilucidar metodologías costo-efectivas para el monitoreo de la saxitoxina y especies de dinoflagelados productoras de saxitoxina potencialmente tóxicas para la vida marina y mejorar el monitoreo y prevención de florecimientos de algas nocivos FAN (mareas rojas) que tienen consecuencias perjudiciales para la economía global y la vida marina en general (García-Pérez *et al.*, 2020b; Murray *et al.*, 2011; Usup *et al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, aún se debe realizar investigación molecular para separar muchas de las especies de dinoflagelados que pueden ser especies crípticas, además de detectar cepas que son tóxicas y otras no tóxicas para la misma especie de dinoflagelado. Estos estudios ayudan a conocer el potencial toxicológico de la ZMC de interés, en este caso la ZMC guatemalteca.

A pesar de no tener más estudios con la aplicación de los cebadores orientados al gen SXT utilizados en este estudio, la amplificación de este gen en las muestras utilizadas establece un precedente para continuar realizando estudios moleculares en el gen SXT para las costas guatemaltecas. Esto se menciona dado el FAN presentado en el mes de mayo detectado en Tiquisate, Escuintla por almejas analizadas en este municipio («Mayo 2022. Alerta por marea roja en Guatemala», 2022) en la zona del pacífico guatemalteco, habiendo amplificado el producto de PCR para este gen con muestras tomadas en el Pacífico guatemalteco colectadas durante el mes de marzo del presente año (Figura 9 y 23), por lo que se puede hipotetizar que el potencial toxicológico de la zona se detectó antes de haberse presentado el FAN.

Deben discutirse además los negativos de la reacción de PCR, esto debido a que no se puede determinar y comprobar la ausencia de dinoflagelados productores de saxitoxina al observar únicamente alícuotas de las muestras colectadas, ya que deben confirmarse con microscopía exhaustiva estas ausencias y/o presencias, para poder validar el método de detección del gen *sxta4* en las muestras utilizadas. Es necesario además confirmar con características morfológicas específicas las diferentes especies de *Alexandrium* y *Pyrodinium* observadas en las muestras por lo que se necesitan realizar más observaciones.

Como se mencionó anteriormente, no se contaba con controles negativos ni positivos durante este estudio, estos son necesarios, especialmente para la detección molecular de las especies que se deseaba realizar. El control positivo pudo ser por ejemplo una cepa de *P. bahamense* y de *Alexandrium* spp. con las cuales la optimización de los programas de PCR realizados se hubiera favorecido. Además, la ausencia de estos controles pudo perder importancia para que el estudio fuera concluyente con haber secuenciado los productos de PCR obtenidos, esto para determinar que los productos amplificados pertenecían a los genes de interés. Se deseaba utilizar las muestras del FAN de *P. bahamense* reportado en 2018 (García-Pérez *et al.*, 2020a) como control positivo para *P. bahamense* y gen SXT, sin embargo dado la calidad del ADN extraído de estas muestras (Anexos, Cuadro 16) no se logró la amplificación de estos cebadores (Cuadro 11).

Es importante recalcar, que el tamaño de los productos de PCR puede reducirse al utilizar otras técnicas moleculares, una de las más efectivas es el PCR cuantitativo en tiempo real o RTqPCR, este método se basa en la cuantificación de copias del gen presenten en las muestras y ha sido exitosa en diversos estudios tanto para cultivos establecidos como para muestras planctónicas (Cusick *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2011). En la realización de este tipo de PCR, es importante establecer no solo controles positivos y negativos, sino también curvas de amplificación para establecer límites experimentales (valor C_T). Esta técnica además permite la cuantificación de copias del gen deseado por célula o por volumen de muestra con diversos cálculos pues el valor C_T es inversamente proporcional al número de copias del amplicón deseado (Kamikawa *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2008), dicha información es muy importante sobre todo para una aplicación de monitoreos rutinarios (Correa *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2011).

Dada la noticia FAN presentado en el mes de mayo, se realizó un muestreo de un galón de agua del sitio donde se detectó el FAN, este fue realizado y donado por Josué García Pérez. Posterior a esto se realizó la extracción de ADN y la reacción de PCR para los cebadores orientados al gen SXT con dicha muestra. El producto obtenido fueron bandas de amplificación cuyo tamaño estimado de ~50-100bp no coincide con el producto esperado de estos cebadores 500bp (Anexo, Figura 30) por lo que no se puede establecer la detección del gen SXT para esta muestra, sin embargo, se espera realizar otras reacciones de PCR y dilucidar los errores que se cometieron en la anteriormente mencionada.

Esto evidencia lo necesario de establecer un método molecular costo-efectivo para el monitoreo de estas especies de dinoflagelados con potencial toxicológico. Debido a la sensibilidad de estos métodos y la efectividad de la detección temprana para reducir las pérdidas económicas y de vida marina que se dan en los florecimientos algales nocivos, debido a que estos tienden a aumentar junto con las amenazas y restos que afectan actualmente al ecosistema marino-costero.

VIII. Conclusiones

Se logró la identificación de *P. bahamense* y *Alexandrium* sp. en las muestras proporcionadas por el CEMA-USAC mediante microscopía óptica apoyada con la identificación molecular de ADN de dinoflagelados comprobada con los cebadores REL18S1F - REL18S1R del gen 18S orientados a dinoflagelados.

Se logró establecer un protocolo de extracción de ADN costo-efectivo para las muestras proporcionadas por el CEMA-USAC, fijadas en distintos medios, además de muestras de plancton de lago preservadas en lugol y muestras marinas frescas.

El protocolo utilizado para la extracción de ADN mostró un rendimiento alto para la extracción de muestras de plancton y en distintos fijadores, sin embargo, la mayor cantidad y mejor calidad de ADN extraído se logró en muestras marinas frescas, atribuyendo interferencia de los medios de fijación y densidad de células como principales limitantes de la extracción.

Se realizó la amplificación del gen precursor de la saxitoxina SXT, dominio *sxta4*- en muestras marinas frescas y muestras del Lago de Amatitlán. No se logró la amplificación en muestras proporcionadas por el CEMA-USAC lo cual se atribuye a la calidad del ADN extraído de estas muestras y al volumen y densidad de células en cada muestra.

Es necesario realizar mayores estudios en el gen SXT para establecer métodos de monitoreo de este gen y desarrollar monitoreos costo-efectivos para el potencial toxicológico en las costas sin cuantificar las toxinas del medio.

Se estableció un precedente para la utilización de técnicas moleculares como métodos de detección temprana de FAN para la ZMC del Pacífico guatemalteco, evidenciando además la necesidad del uso de estas técnicas y su aplicación en monitoreos de FAN tanto local como globalmente.

IX. Recomendaciones

Para realizar un estudio más profundo y establecer tanto la amplificación molecular de los cebadores orientados a *Pyrodinium bahamense* y *Alexandrium* spp.; se recomienda realizar muestreos sin colocar dichas muestras en medio de fijación, esto debido a que se demostró que las muestras frescas tuvieron un mayor rendimiento en la extracción y amplificación del ADN (Figura 16 y 17).

Se recomienda el establecimiento de cultivos puros de las especies productoras de toxinas (Salgado *et al.*, 2017; Usup *et al.*, 1994; Vingiani *et al.*, 2020) para determinar su potencial toxicológico, establecer modelos biológicos y comprobar molecularmente su identidad específica con marcadores moleculares para establecer el método rápido y costo-efectivo de monitoreo en las costas guatemaltecas. Estos modelos biológicos, se recomienda que sean utilizados para determinar los parámetros que son detonantes para la producción de FAN, como el fósforo, las temperaturas, la falta o sobreexposición de luz, oxígeno disuelto, acidez del medio, nitrógeno, entre otros los cuales son importantes para determinar de mejor manera en las épocas que es más probable que se produzcan FAN (Aguilera-Belmonte *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2017).

Es importante recalcar que la detección molecular de distintas especies de dinoflagelados de importancia toxicológica se realiza como un método de confirmación de las especies identificadas por morfología (Usup *et al.*, 2012; Vingiani *et al.*, 2020). Probablemente, la detección molecular como monitoreo rápido y costo-efectivo aún deba seguirse estudiando y desarrollando para establecer los protocolos y procesos que proporcionen mayor información conjuntamente con los métodos actuales de conteo celular, imágenes satelitales, etc. (Aylagas *et al.*, 2016; Hernandez-Becerril & Alonso-Rodriguez, 2004; Shin *et al.*, 2017). Esto además, permitiría que las técnicas moleculares sean la primera línea durante los monitoreos y la detección molecular como una confirmación de estas.

Para realizar la extracción de ADN de muestras de plancton, se recomienda realizar los muestreos utilizando redes para fitoplacton, esto permitirá que haya más células de dinoflagelados debido a que el poro de estas redes es más pequeño que el poro de las redes de zooplancton (Liu *et al.*, 2017) con las cuales se realizaron los muestreos de este estudio. La cantidad de ADN extraído de las muestras se relaciona con la cantidad de células en la muestra (Orr *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2015) lo cual depende del volumen de la muestra con el que se realice la extracción por lo que se recomienda utilizar 10mL en lugar de 1mL para extraer mayor cantidad de ADN y garantizar una mejor amplificación de los cebadores deseados. Además, se recomienda la toma de muestras específicamente para estudios moleculares, las cuales sean colectadas con más volumen (1-4L) colectadas en las áreas de monitoreo. Esto para concentrar aún más la cantidad de células (Murray *et al.*, 2011).

A pesar de haber realizado la amplificación del gen SXT en algunas de las muestras (frescas y del lago), es necesario optimizar el programa de PCR que se estuvo probando para obtener bandas claras y no ADN estelado o corrido. Además, se recomienda utilizar otros cebadores orientados a otros dominios del gen, esto debido a que a pesar de que el dominio conservado en dinoflagelados productores de toxinas sea el *sxta4-*, existen más de 20 dominios en dinoflagelados considerados “tóxicos” por lo que utilizar cebadores para los diferentes dominios es importante para dilucidar el potencial toxicológico de una muestra. Secuenciar los productos de PCR obtenidos es importante

para dilucidar su identidad, sobre todo cuando no se tiene un control positivo con el que comparar, por lo que se recomienda purificar y secuenciar los productos de PCR amplificados durante este estudio para aumentar su validez y la implementación de estas técnicas.

Se recomienda, el uso de otras técnicas de amplificación, como el uso de qPCR en tiempo real el cual es más sensible y podría resultar más la detección de las especies de dinoflagelados categorizados tóxicos (Anderson *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2009; Cusick *et al.*, 2016) presentes en las ZMC guatemaltecas (*P. bahamense*, *Alexandrium* spp., *Gymnodinium*, entre otras) y el gen SXT (Cusick & Duran, 2021; Murray *et al.*, 2011). Al realizar la reacción del qPCR es importante establecer valores experimentales del umbral de ciclos (valor C_T) y establecer mínimos y máximos para los monitoreos (Correa *et al.*, 2009; Cusick *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2008). Esto puede realizarse utilizando diluciones de cultivos puros de distintas especies de interés, o incluso diluciones de muestras planctónicas esto para producir una curva con la cual se puedan calcular los valores de número de copias del amplicón a partir de los valores C_T . Esta técnica, a pesar de ser más costosa que los PCR de este estudio, es más sensible dado que los valores de umbral de ciclos (C_T) proveen información cuantitativa de la presencia de los genes analizados por lo que para el establecimiento de un monitoreo constante la información que provee puede ser analizada con mayores criterios y rigurosidad (Murray *et al.*, 2011; Orbayinah *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2008).

X. Literatura citada

- Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Franco, J. M., Riobó, P., & Gómez, P. I. (2011). The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae*, 12, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.006>
- Akbar, M. A., Mohd Yusof, N. Y., Tahir, N. I., Ahmad, A., Usup, G., Sahrani, F. K., & Bunawan, H. (2020). Biosynthesis of Saxitoxin in Marine Dinoflagellates: An Omics Perspective. *Marine Drugs*, 18(2), 103. <https://doi.org/10.3390/md18020103>
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & Coastal Management*, 52(7), 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.006>
- Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., & Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.012>
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. (2012). Progress in understanding harmful algal blooms (HABs): Paradigm shifts and new technologies for research, monitoring and management. *Annual review of marine science*, 4, 143-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Keafer, B. A., Gribble, K. E., Marin, R., & Scholin, C. A. (2005). Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. From the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 52(19), 2467-2490. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2005.06.015>
- Aylagas, E., Borja, A., Irigoien, X., & Rodríguez-Ezpeleta, N. (2016). Benchmarking DNA Metabarcoding for Biodiversity-Based Monitoring and Assessment. *Frontiers in Marine Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00096>
- Baden, D. G., & Mende, T. J. (1982). Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, *Ptychodiscus brevis*. *Toxicon*, 20(2), 457-461. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90009-5)
- Band-Schmidt, C. J., Durán-Riveroll, L. M., Bustillos-Guzmán, J. J., Leyva-Valencia, I., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. J., Hernández-Sandoval, F. E., & Ramírez-Rodríguez, D. V. (2019). Paralytic Toxin Producing Dinoflagellates in Latin America: Ecology and Physiology. *Frontiers in Marine Science*, 6, 42. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00042>
- Barnett, R., & Larson, G. (2012). A Phenol-Chloroform Protocol for Extracting DNA from Ancient Samples. En B. Shapiro & M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA: Methods and Protocols* (pp. 13-19). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_2
- Bollens, S. M., Frost, B. W., Thoreson, D. S., & Watts, S. J. (1992). Diel vertical migration in zooplankton: Field evidence in support of the predator avoidance hypothesis. *Hydrobiologia*, 234(1), 33-39. <https://doi.org/10.1007/BF00010777>
- Borbolla, M., Colín, F., Vidal Pérez, M., & May, M. (2006). *Marea roja de Tabasco 2005, Karenia brevis*. 12, 425-433.
- Bowers, H. A., Tomas, C., Tengs, T., Kempton, J. W., Lewitus, A. J., & Oldach, D. W. (2006). Raphidophyceae [chadefaud Ex Silva] Systematics and Rapid Identification: Sequence Analyses and Real-Time Pcr Assays1. *Journal of Phycology*, 42(6), 1333-1348. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00285.x>

- Buskey, E. J., & Swift, E. (1983). Behavioral responses of the coastal copepod *Acartia hudsonica* (Pinhey) to simulated dinoflagellate bioluminescence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 72(1), 43-58. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(83\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(83)90018-7)
- Buskey, E. J., White, H. K., & Esbaugh, A. J. (2016). Impact of Oil Spills on Marine Life in the Gulf of Mexico: EFFECTS ON PLANKTON, NEKTON, AND DEEP-SEA BENTHOS. *Oceanography*, 29(3), 174-181. JSTOR.
- Campos, P. F., & Gilbert, T. M. P. (2012). DNA Extraction from Formalin-Fixed Material. En B. Shapiro & M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA: Methods and Protocols* (pp. 81-85). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_11
- Cao, H., & Han, L. (2021). Hourly remote sensing monitoring of harmful algal blooms (HABs) in Taihu Lake based on GOCI images. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(27), 35958-35970. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13318-6>
- Carreto, J., & Lasta, M. L. (1981). *Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el Mar Argentino—Aquatic Commons*. <http://aquaticcommons.org/4779/>
- Colin, S. P., & Dam, H. G. (2003). Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* on the copepod *Acartia hudsonica*: A test of the mechanisms that reduce ingestion rates. *Marine Ecology Progress Series*, 248, 55-65. <https://doi.org/10.3354/meps248055>
- Conde-Porcuna, J. M., Ramos-Rodríguez, E., & Morales-Baquero, R. (2004). El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Revista Ecosistemas*, 13(2). <https://doi.org/10.7818/re.2014.13-2.00>
- Control de Calidad | Banco Nacional de ADN. (s. f.). Recuperado 1 de mayo de 2022, de <https://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>
- Correa, A. M. S., McDonald, M. D., & Baker, A. C. (2009). Development of clade-specific Symbiodinium primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Marine Biology*, 156(11), 2403-2411. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1263-5>
- Cortés, J., Rica, C., Villamizar, A., Nagy, G. J., Girot, P. O., Rica, C., & Miglioranza, K. S. B. (s. f.). *Ecosistemas marino-costeros*. 31.
- CTAB extraction buffer. (2009). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb.rec11984. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec11984>
- Cubero, O. F., Crespo, A., Fatehi, J., & Bridge, P. D. (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution*, 216(3), 243-249. <https://doi.org/10.1007/BF01084401>
- Cuellar-Martinez, T., Ruiz-Fernández, A. C., Alonso-Hernández, C., Amaya-Monterrosa, O., Quintanilla, R., Carrillo-Ovalle, H. L., Arbeláez M, N., Díaz-Asencio, L., Méndez, S. M., Vargas, M., Chow-Wong, N. F., Valerio-Gonzalez, L. R., Enevoldsen, H., & Dechraoui Bottein, M.-Y. (2018). Addressing the Problem of Harmful Algal Blooms in Latin America and the Caribbean- A Regional Network for Early Warning and Response. *Frontiers in Marine Science*, 5, 409. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00409>
- Cusick, K., & Duran, G. (2021). SxtA4+ and sxtA4- Genotypes Occur Together within Natural Pyrodinium bahamense Sub-Populations from the Western Atlantic. *Microorganisms*, 9(6), 1128. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061128>
- Cusick, K., Wilhelm, S., Hargraves, P., & Saylor, G. (2016). Single-cell PCR of the luciferase conserved catalytic domain reveals a unique cluster in the toxic bioluminescent dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. *Aquatic Biology*, 25, 139-150. <https://doi.org/10.3354/ab00664>
- Datukishvili, N., Gabriadze, I., Kutateladze, T., Karseladze, M., & Vishnepolsky, B. (2010). Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops. *International Journal of Food Science and Technology*, 5.

- Frangópulos, M., Guisande, C., Maneiro, I., Riveiro, I., & Franco, J. (2000). Short-term and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. *Marine Ecology Progress Series*, 203, 161-169. <https://doi.org/10.3354/meps203161>
- Gárate-Lizárraga, I., & González-Armas, R. (2011). Occurrence of *Pyrodinium bahamense* var. *Compressum* along the southern coast of the Baja California Peninsula. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3), 626-630. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.009>
- García, A. (2019). *Comisión Nacional de Marea Roja Tóxica*. 12.
- García-Pérez, J., García-Lopez, A., Carrillo-Ovalle, L., Solares-Cortez, N., & López-Bran, R. (2020a). Florecimiento algal nocivo por *Pyrodinium bahamense* en diciembre 2018 en la Costa del Pacífico de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.36829/63CTS.v7i1.810>
- García-Pérez, J., García-Lopez, A., Carrillo-Ovalle, L., Solares-Cortez, N., & López-Bran, R. (2020b). Reporte de Casos / Case Report Harmful algal bloom of *Pyrodinium bahamense* in December 2018 in the Pacific coast of Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 7, 2409-3459. <https://doi.org/10.36829/63CTS.v7i1.810>
- Garstecki, T., Verhoeven, R., Wickham, S. A., & Arndt, H. (2000). Benthic–pelagic coupling: A comparison of the community structure of benthic and planktonic heterotrophic protists in shallow inlets of the southern Baltic. *Freshwater Biology*, 45(2), 147-167. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00676.x>
- Gomez, F. (s. f.). *A CHECKLIST AND CLASSIFICATION OF LIVING DINOFLAGELLATES (DINOFLAGELLATA, ALVEOLATA)*. Recuperado 12 de septiembre de 2021, de https://www.academia.edu/28681928/A_CHECKLIST_AND_CLASSIFICATION_OF_LIVING_DINOFLAGELLATES_DINOFLAGELLATA_ALVEOLATA
- Hackett, J. D., Anderson, D. M., Erdner, D. L., & Bhattacharya, D. (2004). Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 91(10), 1523-1534. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1523>
- Hackett, J. D., Wisecaver, J. H., Brosnahan, M. L., Kulis, D. M., Anderson, D. M., Bhattacharya, D., Plumley, F. G., & Erdner, D. L. (2013). Evolution of Saxitoxin Synthesis in Cyanobacteria and Dinoflagellates. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 70-78. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss142>
- Hackett, J. D., Yoon, H. S., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Nosenko, T., & Bhattacharya, D. (2004). Migration of the Plastid Genome to the Nucleus in a Peridinin Dinoflagellate. *Current Biology*, 14(3), 213-218. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.032>
- Hallegraeff, G. M. (1989). *Biology, Epidemiology, and Management of Pyrodinium Red Tides: Proceedings of the Management and Training Workshop, Bandar Seri Begawan, Brunei Darussalam, 23-30 May 1989*. WorldFish.
- Hernandez-Becerril, D. U., & Alonso-Rodríguez, R. (2004). Study of the marine planktonic dinoflagellate *Ceratium divaricatum* (Dinophyceae), a confused and considerably variable species. *Phycological Research*, 52(4), 346-354. <https://doi.org/10.1111/j.1440-183.2004.00354.x>
- Identification of Harmful Marine Dinoflagellates. (2001). *Journal of Phycology*, 37(s3), 17-18. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2001.jpy37303-39.x>
- Inglis, P. W., Pappas, M. de C. R., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, 13(10), e0206085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085>
- Jasti, S., Sieracki, M. E., Poulton, N. J., Giewat, M. W., & Rooney-Varga, J. N. (2005). Phylogenetic Diversity and Specificity of Bacteria Closely Associated with *Alexandrium* spp. And Other Phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3483-3494. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3483-3494.2005>

- Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Kim, J. S., Seong, K. A., Kang, N. S., & Kim, T. H. (2010). Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal*, 45(2), 65-91. <https://doi.org/10.1007/s12601-010-0007-2>
- Kamikawa, R., Nagai, S., Hosoi-Tanabe, S., Itakura, S., Yamaguchi, M., Uchida, Y., Baba, T., & Sako, Y. (2007). Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. *Harmful Algae*, 6(3), 413-420. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.12.004>
- Kellmann, R., Mihali, T. K., Jeon, Y. J., Pickford, R., Pomati, F., & Neilan, B. A. (2008). Biosynthetic Intermediate Analysis and Functional Homology Reveal a Saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4044-4053. <https://doi.org/10.1128/AEM.00353-08>
- Kellmann, R., Stüken, A., Orr, R. J. S., Svendsen, H. M., & Jakobsen, K. S. (2010). Biosynthesis and Molecular Genetics of Polyketides in Marine Dinoflagellates. *Marine Drugs*, 8(4), 1011-1048. <https://doi.org/10.3390/md8041011>
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L., & Bhattacharya, D. (2006). Development of a Dinoflagellate-Oriented PCR Primer Set Leads to Detection of Picoplanktonic Dinoflagellates from Long Island Sound. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5626-5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.00586-06>
- Liu, Y., Yu, R.-C., Kong, F.-Z., Chen, Z.-F., Dai, L., Gao, Y., Zhang, Q.-C., Wang, Y.-F., Yan, T., & Zhou, M.-J. (2017). Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1), 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.023>
- MacKenzie, L., de Salas, M., Adamson, J., & Beuzenberg, V. (2004). The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: Comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae*, 3(1), 71-92. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.09.001>
- Mansour, J. S., & Anestis, K. (2021). Eco-Evolutionary Perspectives on Mixoplankton. *Frontiers in Marine Science*, 8, 666160. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.666160>
- MARN. (2010). *Política para el manejo integral de las zonas marino-costeras de Guatemala*. Gobierno de Guatemala. http://www.segeplan.gob.gt/downloads/clearinghouse/politicas_publicas/Recursos%20Naturales/Pol%C3%ADtica%20Marino%20Costera.pdf
- MARN. (2018). *Programa de Gestión Integrada Marino-Costera pra el Pacífico de Guatemala*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. <https://www.marn.gob.gt/Multimedios/15588.pdf>
- Marshall, A. T. (1996). Calcification in Hermatypic and Ahermatypic Corals. *Science*, 271(5249), 637-639. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.637>
- Matthews, R., & Matthews, G. (2018). Cyanobacteria Key. *Environmental Sciences Faculty and Staff Publications*. https://cedar.wvu.edu/esci_facpubs/52
- Mayo 2022. Alerta por marea roja en Guatemala. (2022, mayo 10). *Fundación iO*. <https://fundacionio.com/alerta-por-marea-roja-en-guatemala/>
- Mertens, K. N., Wolny, J., Carbonell-Moore, C., Bogus, K., Ellegaard, M., Limoges, A., de Vernal, A., Gurdebeke, P., Omura, T., Al-Muftah, A., & Matsuoka, K. (2015a). Taxonomic re-examination of the toxic armored dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Plate 1906: Can morphology or LSU sequencing separate *P. bahamense* var. *compressum* from var. *bahamense*? *Harmful Algae*, 41, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.09.010>
- Mertens, K. N., Wolny, J., Carbonell-Moore, C., Bogus, K., Ellegaard, M., Limoges, A., de Vernal, A., Gurdebeke, P., Omura, T., Al-Muftah, A., & Matsuoka, K. (2015b). Taxonomic re-examination of the toxic armored dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Plate 1906: Can

- morphology or LSU sequencing separate *P. bahamense* var. *compressum* from var. *bahamense*? *Harmful Algae*, *41*, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.09.010>
- Monroy-Vaca, E. X., Fernández-Andreu, C. M., Díaz-Rodríguez, R., Martínez-Machín, G., Illnait-Zaragoz, M. T., & Perurena-Lancha, M. (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *Vaccinmonitor*, *23*(2), 49-56.
- Morón-López, J. (2021). A holistic water monitoring approach for an effective ecosystem management. *Ecohydrology & Hydrobiology*, *21*(3), 549-554. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2021.08.003>
- Murray, S. A., Wiese, M., Stüken, A., Brett, S., Kellmann, R., Hallegraeff, G., & Neilan, B. A. (2011). SxtA-Based Quantitative Molecular Assay To Identify Saxitoxin-Producing Harmful Algal Blooms in Marine Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(19), 7050-7057. <https://doi.org/10.1128/AEM.05308-11>
- Musheev, M. U., & Krylov, S. N. (2006). Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Addressing the polymerase chain reaction issue. *Analytica Chimica Acta*, *564*(1), 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.069>
- Ocampo, L. (2012). Uso y aprovechamiento del camarón de profundidad y de la fauna de acompañamiento. En: López-Martínez J. y E. Morales-Bojórquez (Eds.). Efectos de la pesca de arrastre en el Golfo de California. En *Efectos de la pesca de arrastre en el Golfo de California* (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y Fundación Produce Sonora).
- Orbayinah, S., Widada, H., Hermawan, A., Sudjadi, S., & Rohman, A. (2019). Application of real-time polymerase chain reaction using species specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for analysis of pork in meatball products. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *6*(2), 260-265. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f342>
- Orr, R. J. S., Stüken, A., Rundberget, T., Eikrem, W., & Jakobsen, K. S. (2011). Improved phylogenetic resolution of toxic and non-toxic *Alexandrium* strains using a concatenated rDNA approach. *Harmful Algae*, *10*(6), 676-688. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.05.003>
- Ortiz, J. R., & Martínez-Dubón, R. M. (2020). Diversidad malacológica del humedal marino-costero Las Lisas-La Barrona en el Pacífico de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.36829/63CTS.v7i1.789>
- Pan, M., McBeath, A. J. A., Hay, S. J., Pierce, G. J., & Cunningham, C. O. (2008). Real-time PCR assay for detection and relative quantification of *Liocarcinus depurator* larvae from plankton samples. *Marine Biology*, *153*(5), 859-870. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0858-y>
- Pennington, J. T., Mahoney, K. L., Kuwahara, V. S., Kolber, D. D., Calienes, R., & Chavez, F. P. (2006). Primary production in the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*, *69*(2), 285-317. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2006.03.012>
- Peñañiel, N., Flores, D., Rivero de Aguilar, J., Guayasamin, J., & Bonaccorso, E. (2019). A cost-effective protocol for total DNA isolation from animal tissue. *Neotropical Biodiversity*, *5*, 69-74. <https://doi.org/10.1080/23766808.2019.1706387>
- Pérez-Gómez, A., Ferrero-Gutierrez, A., Novelli, A., Franco, J. M., Paz, B., & Fernández-Sánchez, M. T. (2006). Potent Neurotoxic Action of the Shellfish Biotxin Yessotoxin on Cultured Cerebellar Neurons. *Toxicological Sciences*, *90*(1), 168-177. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj064>
- Petricioli, D., Bakran-Petricioli, T., Viličić, D., & Požar-Domac, A. (1996). Freshwater Phytoplankton Bloom in Visovac Lake—A Possible Cause of Benthic Mortality in Krka Estuary (Adriatic Sea, Croatia). *Marine Ecology*, *17*(1-3), 373-382. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1996.tb00515.x>
- Rashidi, H., Baulch, H., Gill, A., Bharadwaj, L., & Bradford, L. (2021). Monitoring, Managing, and Communicating Risk of Harmful Algal Blooms (HABs) in Recreational Resources across

- Canada. *Environmental Health Insights*, 15, 11786302211014400. <https://doi.org/10.1177/11786302211014401>
- Reis Costa, P., Botelho, M., & Lefebvre, K. (2010). Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia*, 655, 89-97. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0406-5>
- Resendiz, M. E. Z., Bata, A. de J. E., Resendiz, M. L. N., & Castillo, M. E. M. del. (2022). Reconocimiento de dos variedades taxonómicas de *Pyrodinium bahamense* (Gonyaulacales, Dinophyceae): Var. bahamense y var. compressum. *Acta Botanica Mexicana*, 129, Article 129. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1967>
- Rojas-Arrieta, K., Salazar-Chacón, Y., Rojas- Martínez, J. L., & Borbón, H. (2018). Validación de una técnica para la determinación de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos de Costa Rica mediante cromatografía líquida acoplada a reactor post columna con detector de fluorescencia. *Revista Tecnología en Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3973>
- Salgado, P., Figueroa, R. I., Ramilo, I., & Bravo, I. (2017). The life history of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Gonyaulacales) in culture. *Harmful Algae*, 68, 67-81. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.07.008>
- Saunders, G. W., & McDevit, D. C. (2012). Methods for DNA Barcoding Photosynthetic Protists Emphasizing the Macroalgae and Diatoms. En W. J. Kress & D. L. Erickson (Eds.), *DNA Barcodes: Methods and Protocols* (pp. 207-222). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_10
- Serth, J., Kuczyk, M. A., Paeslack, U., Lichtinghagen, R., & Jonas, U. (2000). Quantitation of DNA Extracted after Micropreparation of Cells from Frozen and Formalin-Fixed Tissue Sections. *The American Journal of Pathology*, 156(4), 1189-1196. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64989-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64989-9)
- Shin, M., Lee, H.-J., Kim, M. S., Park, N.-B., & Lee, C. (2017). Control of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* by ozone in seawater. *Water Research*, 109, 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.050>
- Spector, D. L. (1984). Dinoflagellates: An Introduction. En *Dinoflagellates* (pp. 1-15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-656520-1.50005-5>
- Stüken, A., Orr, R. J. S., Kellmann, R., Murray, S. A., Neilan, B. A., & Jakobsen, K. S. (2011). Discovery of Nuclear-Encoded Genes for the Neurotoxin Saxitoxin in Dinoflagellates. *PLOS ONE*, 6(5), e20096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020096>
- Stumpf, R. P., Tomlinson, M. C., Calkins, J. A., Kirkpatrick, B., Fisher, K., Nierenberg, K., Currier, R., & Wynne, T. T. (2009). Skill assessment for an operational algal bloom forecast system. *Journal of Marine Systems*, 76(1), 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2008.05.016>
- Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., & Barry, W. H. (2004). Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(1), 324-329. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.056564>
- Sze, Y., Miranda, L. N., Sin, T. M., & Huang, D. (2018). Characterising planktonic dinoflagellate diversity in Singapore using DNA metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e25136. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.25136>
- Tauxe, R. V., Kilbourne, E. M., de Porras, E., Hall, S., Velasquez, O. H., Rodrigue, D. C., Blake, P. A., & Etzel, R. A. (1990). Lethal Paralytic Shellfish Poisoning in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(3), 267-271. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.267>
- Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., & Saldarriaga, J. F. (2008). Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation*, 17(2), 407-418. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9258-3>
- Tel-zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D., & Mizrahi, Y. (1999). Modified CTAB Procedure for DNA Isolation from Epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae).

- Plant Molecular Biology Reporter*, 17(3), 249-254.
<https://doi.org/10.1023/A:1007656315275>
- Tester, P. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandarsea, M. W., Leaw, C. P., Teen, L. P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M. A., & Litaker, R. W. (2014). Sampling harmful benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae*, 39, 8-25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.009>
- Tillmann, U., & John, U. (2002). Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: An allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Marine Ecology Progress Series*, 230, 47-58. <https://doi.org/10.3354/meps230047>
- Tunin-Ley, A., Ibañez, F., Labat, J.-P., Zingone, A., & Lemée, R. (2009). Phytoplankton biodiversity and NW Mediterranean Sea warming: Changes in the dinoflagellate genus *Ceratium* in the 20th century. *Marine Ecology Progress Series*, 375, 85-99. <https://doi.org/10.3354/meps07730>
- Usup, G., Ahmad, A., Matsuoka, K., Lim, P. T., & Leaw, C. P. (2012). Biology, ecology and bloom dynamics of the toxic marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. *Harmful Algae*, 14, 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.026>
- 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(5), 254-262. <https://doi.org/10.1002/nt.2620020503>
- Verlecar, X. N., & Desai, S. R. (2004). *Phytoplankton Identification Manual*. National Institute of Oceanography, Goa. <https://drs.nio.org/xmlui/handle/2264/97>
- Verma, A., Barua, A., Ruvindy, R., Savela, H., Ajani, P. A., & Murray, S. A. (2019). The Genetic Basis of Toxin Biosynthesis in Dinoflagellates. *Microorganisms*, 7(8), 222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080222>
- Vingiani, G. M., Štālberga, D., De Luca, P., Ianora, A., De Luca, D., & Lauritano, C. (2020). De novo Transcriptome of the Non-saxitoxin Producing *Alexandrium tamutum* Reveals New Insights on Harmful Dinoflagellates. *Marine Drugs*, 18(8), 386. <https://doi.org/10.3390/md18080386>
- Vollenweider, R. A., Marchetti, R., & Viviani, R. (2016). *Marine Coastal Eutrophication: Proceedings of an International Conference, Bologna, Italy, 21-24 March 1990*. Elsevier.
- Waggett, R. J., Tester, P. A., & Place, A. R. (2008). Anti-grazing properties of the toxic dinoflagellate *Karlodinium veneficum* during predator-prey interactions with the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 366, 31-42. <https://doi.org/10.3354/meps07518>
- Wang, D.-Z. (2008). Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Marine Drugs*, 6(2), 349-371. <https://doi.org/10.3390/md6020349>
- Wu, D., Li, R., Zhang, F., & Liu, J. (2019). A review on drone-based harmful algae blooms monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(4), 211. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7365-8>
- Yuan, J., Li, M., & Lin, S. (2015). An Improved DNA Extraction Method for Efficient and Quantitative Recovery of Phytoplankton Diversity in Natural Assemblages. *PLoS ONE*, 10(7), e0133060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133060>
- Zrimec, J., Kopinč, R., Rijavec, T., Zrimec, T., & Lapanje, A. (2013). Band smearing of PCR amplified bacterial 16S rRNA genes: Dependence on initial PCR target diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.002>

XI. Anexos

Cuadro 12. Descripción de muestras colectadas por el CEMA-USAC

#	ID_N	Locación	Fecha	Medio	P/ C *	E	N
1	C1_17	Carbie	4/04/2017	lugol ácido	B	88.556666 7	- 16.0022222
2	C2_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.808888 9	- 16.0022222
3	C3_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5877778
4	C4_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.556666 7	- 16.0022222
5	C5_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5877778
6	C6_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	C	90.561944 4	- 14.5877778
7	C7_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.556666 7	- 16.0022222
8	C7_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.556666 7	- 16.0022222
9	C8_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.556666 7	- 16.0022222
10	C9_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.808888 9	- 16.0022222
11	C10_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.808888 9	- 16.0022222
12	C11_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5838889
13	C12_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5838889
14	C13_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5838889
15	C14_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	88.808888 9	- 16.0022222
16	C15_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	B	90.561944 4	- 14.5838889
17	C16_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	C	88.556666 7	- 16.0022222
18	C17_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	C	88.808888 9	- 16.0022222
19	C18_17	Caribe	4/04/2017	lugol ácido	C	- 88.447823	- 15.928869
20	P1_19	Pacífico	30/05/2019	lugol	C	90.796944 4	- 13.9258333
21	P2_21	Pacífico	abr-21	lugol	C	90.835277 8	- 13.9258333
22	P3_21	Pacífico	feb-21	lugol	C	90.835277 8	- 13.9258333
23	P4_21	Pacífico	ene-21	lugol	C	90.835277 8	- 13.9258333

#	ID_N	Locación	Fecha	Medio	P/ C *	E	N
2						90.457222	-
4	P5_21	Pacífico	28/07/2021	lugol	C	2	13.8496944
2						90.791111	-
5	P6_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	C	1	13.9441667
2						90.777580	-
6	P7_18P	Pacífico	dic-18	agua	C	0	13.9028620
2						90.835277	-
7	P8_21	Pacífico	mar-21	lugol	C	8	13.9258333
2						90.835277	-
8	P9_19	Pacífico	30/05/2019	lugol	C	8	13.9258333
2						90.791111	-
9	P10_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	C	1	13.8897222
3						90.835277	-
0	P11_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	C	8	13.9258333
3						90.777580	-
1	P7_18L	Pacífico	dic-18	lugol	C	0	13.9028620
3						90.777580	-
2	P7_18E	Pacífico	dic-18	Alcohol 95%	C	0	13.9028620
3						90.796944	-
3	P12_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	C	4	13.9258333
3						90.791111	-
4	P13_19	Pacífico	30/05/2019	lugol	C	1	13.9441667
3						90.724444	-
5	P14_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	C	4	13.9286111
3						90.724444	-
6	P15_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	C	4	13.8419444

Cuadro 13. Cebadores utilizados

No .	Nombre	5' - secuencia - 3'	bp producto
1	sxt007	ATGCTCAACATGGGAGTCATCC	750
2	sxt008	GGGTCCAGTAGATGTTGACGATG	
3	SxtA4166F	CATGGCTGCGGCGTCTTG	500
4	PyrosxtA4R680	CTAGATGGGGTACCACATAG	
5	Pcomp370F	AAATTACCCAATCCTGACACT	1200
6	Pcomp1530R	CTGATGACTCAGGCTTACT	
7	18SF08	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	1780
8	R0ITS	CCTTGTTACGACTTCTCCTTCTC	
9	REL18S1F	GTT GCG GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA	313
10	REL18S1R	AAC AAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT GAC	
11	EK82f	GAAACTGCGAATGGCTC	~100
12	Proto5r	GACGGGCGGTGTGTAC	

Cuadro 14. Muestras de prueba preparadas para selección de protocolos de extracción

#	ID_V	ID_N	Locación	Fecha	Medio	Código
1	C3P_0 7	C1_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	P1
2	KF_1	C2_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
3	EL_01	C3_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
4	C3P_0 3	C4_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
5	EL_02	C5_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	P2
6	EL_P	C6_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
7	C3P_0 2	C7_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
8	C3P_0 2	C7_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
9	C3P_0 6	C8_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	P3
10	KF_06	C9_1 7	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
11	KF_02	C10_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
12	El_05	C11_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
13	El_03	C12_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	P4
14	El_04	C13_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
15	KF_04	C14_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
16	El_06	C15_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
17	C3P_P	C16_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	P5
18	KF_09 _P	C17_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
19	P37M_ P	C18_ 17	Caribe	4/04/201 7	lugol ácido	
20	BZG_F	P1_1 9	Pacífico	30/05/20 19	lugol	
21	AO_T X	P2_2 1	Pacífico	abr-21	lugol	P6
22	AO_T X	P3_2 1	Pacífico	feb-21	lugol	
23	AO_T X	P4_2 1	Pacífico	ene-21	lugol	
24	AO350 7	P5_2 1	Pacífico	28/07/20 21	lugol	

#	ID_V	ID_N	Locación	Fecha	Medio	Código
2	BRC_3	P6_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	P7
2	PQ_02	P7_18P	Pacífico	dic-18	agua	
2	AO_TX	P8_21	Pacífico	mar-21	lugol	
2	BTX_8F	P9_19	Pacífico	30/05/2019	lugol	
2	AO2507	P10_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	
3	BTX_03	P11_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	P8
3	PQ_031	P7_18L	Pacífico	dic-18	lugol	
3	PQ_032	P7_18E	Pacífico	dic-18	Alcohol 95%	
3	BZG_33	P12_19	Pacífico	27/03/2019	lugol	P9
3	BRC_4F	P13_19	Pacífico	30/05/2019	lugol	
3	AO1507	P14_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	
3	AO4507	P15_21	Pacífico	28/07/2021	formalina	
6						

Cuadro 15. Cuantificación de ADN para pruebas de protocolos

Protocolo	Código	ADN [ng/uL]	A260/280	A260/230
A	P2	4.2	5.29	-2.55
	P4	4.1	9.164	9.79
	B	3.9	3.8	-1.48
B	P3	5.2	1.01	1.15
	P5	2.6	1.19	0.73
	P8	2.1	1.28	0.39
	B	1.7	1.07	0.94
C	P6	-1.3	1.73	-0.86
	P6.1	7.3	1.45	0.23
	P6.2	4	1.45	0.16
	P9	-0.7	2.21	3.86
	P9.1	26	0.95	0.915
	P9.2	0.4	0.82	0.06
	P9.3	2.1	1.2	0.28
	B.1	1.4	1.1	0.48
B.2	-0.5	-3.33	-0.18	

Protocolo	Codigo	ADN [ng/uL]	A260/280	A260/230
D	P1.1	2.6	31.45	0.66
	P7.1	3.8	3.94	6.84
	B.1	3.2	15.29	0.14
	P7.2	14	1.71	0.86
	P1.2	2.9	14.59	0.55
	B.2	2.4	42.78	-0.64

Se realizó la prueba del protocolo C con acetato de amonio y acetato de sodio, se observó que las muestras con acetato de amonio tuvieron el mejor rendimiento (verde).

Cuadro 16. Descripción y cuantificación de ADN para todas las muestras

#	TIPO	ID_N	Locación	Fecha	Medio	Lugar	ADN	A260/280	A260/230
1	CEMA	C1_17	Carbie	2017	lugola	B	3.5	1.17	0.17
2	CEMA	C2_17	Caribe	2017	lugola	B	17.8	1.26	0.86
3	CEMA	C3_17	Caribe	2017	lugola	B	2.3	1.17	0.18
4	CEMA	C4_17	Caribe	2017	lugola	B	1.4	1.1	0.59
5	CEMA	C5_17	Caribe	2017	lugola	B	8.6	1.3	0.45
6	CEMA	C6_17	Caribe	2017	lugola	C	21	1.37	0.6
7	CEMA	C7_17	Caribe	2017	lugola	B	5	1.03	0.6
8	CEMA	C7_17	Caribe	2017	lugola	B	4.5	1.27	0.37
9	CEMA	C8_17	Caribe	2017	lugola	B	6.9	1.29	1.75
10	CEMA	C9_17	Caribe	2017	lugola	B	2.3	1.02	0.45
11	CEMA	C10_17	Caribe	2017	lugola	B	2.1	0.94	0.32
12	CEMA	C11_17	Caribe	2017	lugola	B	3.3	1.39	0.37
13	CEMA	C12_17	Caribe	2017	lugola	B	2.7	1.04	0.45
14	CEMA	C13_17	Caribe	2017	lugola	B	4.3	1.25	0.2
15	CEMA	C14_17	Caribe	2017	lugola	B	1.7	1.35	0.27
16	CEMA	C15_17	Caribe	2017	lugola	B	0.5	0.5	0.98
17	CEMA	C16_17	Caribe	2017	lugola	C	1.7	1.05	0.13
18	CEMA	C17_17	Caribe	2017	lugola	C	1.4	1.05	0.2
19	CEMA	C18_17	Caribe	2017	lugola	C	1.5	1.35	0.25

#	TIPO	ID_N	Locación	Fec ha	Medio	Lugar	AD N	A260/280	A260/230
20	CEMA	P1_19	Pacifico	2019	lugol	C	9.2	1.37	0.4
21	CEMA	P2_21	Pacifico	2021	lugol	C	3.9	1.66	0.73
22	CEMA	P3_21	Pacifico	2021	lugol	C	1.8	1.72	0.23
23	CEMA	P4_21	Pacifico	2021	lugol	C	3.4	1.24	0.3
24	CEMA	P5_21	Pacifico	2021	lugol	C	2.2	1.3	0.35
25	CEMA	P6_19	Pacifico	2019	lugol	C	1.5	1.07	0.2
26	CEMA	P7_18P	Pacifico	2018	lugol	C	13.9	1.88	0.79
27	CEMA	P8_21	Pacifico	2021	lugol	C	16.3	1.71	0.65
28	CEMA	P9_19	Pacifico	2019	lugol	C	11.5	1.98	2.32
29	CEMA	P10_21	Pacifico	2021	formalina	C	14.2	1.6	0.49
30	CEMA	P11_19	Pacifico	2019	lugol	C	2.4	1.24	0.24
31	CEMA	P7_18L	Pacifico	2018	lugol	C	7.4	1.36	0.4
32	CEMA	P7_18E	Pacifico	2018	etanol	C	8.1	1.4	0.38
33	CEMA	P12_19	Pacifico	2019	lugol	C	9.7	1.36	0.66
34	CEMA	P13_19	Pacifico	2019	lugol	C	19.4	1.39	0.56
35	CEMA	P14_21	Pacifico	2021	formalina	C	9.4	1.42	0.29
36	CEMA	P15_21	Pacifico	2021	formalina	C	11.4	1.35	0.43
37	LAGO	AF1.1	Amatitlan	2020	lugol	C	2	2.06	0.22
38	LAGO	AF1.2	Amatitlan	2020	lugol	C	1.7	1.75	0.1
39	LAGO	AF1.3	Amatitlan	2020	lugol	C	0.4	1.32	0.04
40	LAGO	AF1.4	Amatitlan	2020	lugol	C	0.7	1.19	0.05
41	LAGO	AF1.5	Amatitlan	2020	lugol	C	1.1	1.98	0.09
42	LAGO	AF2.1	Amatitlan	2020	lugol	C	9.7	2.13	0.51
43	LAGO	AF2.2	Amatitlan	2020	lugol	C	6.9	2.14	1.34
44	LAGO	AF2.3	Amatitlan	2020	lugol	C	7.8	1.92	0.96
45	LAGO	AF2.4	Amatitlan	2020	lugol	C	3.8	1.64	0.48

#	TIPO	ID_N	Locación	Fec ha	Medio	Lugar	AD N	A260/280	A260/230
47	FRESCAS	1.1F	Pacifico	2022	agua	C	29	2.04	1.1
48	FRESCAS	1F2	Pacifico	2022	agua	C	13.5	1.4	0.5
49	FRESCAS	1.2F	Pacifico	2022	agua	C	11.4	1.78	0.93
50	FRESCAS	1F3	Pacifico	2022	agua	C	4.8	1.58	0.26
51	FRESCAS	1.3F	Pacifico	2022	agua	C	2.1	1.35	0.46
52	FRESCAS	1F4	Pacifico	2022	agua	C	10.6	1.47	0.3
53	FRESCAS	1.4F	Pacifico	2022	agua	C	13.9	1.68	0.26
54	FRESCAS	2F1	Pacifico	2022	agua	C	9	2	1.54
55	FRESCAS	2.1F	Pacifico	2022	agua	C	7.8	2.25	0.86
56	FRESCAS	2F2	Pacifico	2022	agua	C	4.2	2.27	0.36
57	FRESCAS	2.2F	Pacifico	2022	agua	C	11.2	1.35	0.26
58	FRESCAS	3F1	Pacifico	2022	agua	C	1.3	4.64	0.62
59	FRESCAS	3.1F	Pacifico	2022	agua	C	10.89	1.75	0.3
60	FRESCAS	3F2	Pacifico	2022	agua	C	13.3	1.45	0.28
61	FRESCAS	3.2F	Pacifico	2022	agua	C	1.6	1.65	0.09
62	FRESCAS	3F3	Pacifico	2022	agua	C	3.3	1.3	0.77
63	FRESCAS	3.3F	Pacifico	2022	agua	C	1.3	1.1	0.19
64	FRESCAS	3F4	Pacifico	2022	agua	C	2	1.3	0.3
65	FRESCAS	3.4F	Pacifico	2022	agua	C	2.5	1.86	0.35
66	FRESCAS	5F1	Pacifico	2022	agua	C	0.9	1.48	0.28
67	FRESCAS	5.1F	Pacifico	2022	agua	C	2.3	1	0.52
68	FRESCAS	5F2	Pacifico	2022	agua	C	3.5	1.19	0.26
69	FRESCAS	5.2F	Pacifico	2022	agua	C	2.1	1.35	0.27

Cuadro 17. Conteo de células de dinoflagelados observados en las alícuotas de distintas muestras

ID_N	Celulas 100ul	D1 mL	1uL	Observaciones
C1_1 7	15	150	0.15	diatomeas, cianobacterias
C2_1 7	57	570	0.57	<i>Gymnodinium</i> sp., <i>Pyrodinium</i> sp.
C3_1 7	25	250	0.25	
C10_ 17	44	440	0.44	
C16_ 17	10	100	0.1	
P1_1 9	9	90	0.09	
P2_2 1	22	220	0.22	
P4_1	19	190	0.19	
ID_N	Celulas 100ul	D1 mL	1uL	Observaciones
P5_2 1	105	1050	1.05	
P6_1 9	60	600	0.6	diatomeas y tintínidos
P7_1 8P	249	2490	2.49	<i>P. bahamense</i>
P8_2 1	28	280	0.28	
P9_1 9	43	430	0.43	<i>Alexandrium</i> sp., <i>Pyrodinium</i> sp.
P10_ 21	17	170	0.17	
P11_ 19	27	270	0.27	
P7_1 8L	205	2050	2.05	
P7_1 8E	209	2090	2.09	
P11_ 19	40	400	0.4	<i>Tripos</i> spp., <i>Pyrodinium</i> sp., <i>Dinophysis</i> sp.
P12_ 19	20	200	0.2	<i>Tripos</i> spp., <i>Proceratium</i> sp.
1F1	20	200	0.2	
2F1	14	140	0.14	
3F3	35	350	0.35	
5F1	17	170	0.17	

Se realizó el cálculo de células contabilizadas en una alícuota de 100µL para 1mL y densidad de células por 1µL. En las muestras del florecimiento reportado en 2018 (P7_18 P, E y L) se observó la mayor cantidad de dinoflagelados y todos estos de la especie *P. bahamense*. Se

observaron muestras de todos los tipos, sin embargo, en las muestras colectadas del lago no se observaron dinoflagelados, sino solo diatomeas y cianobacterias.

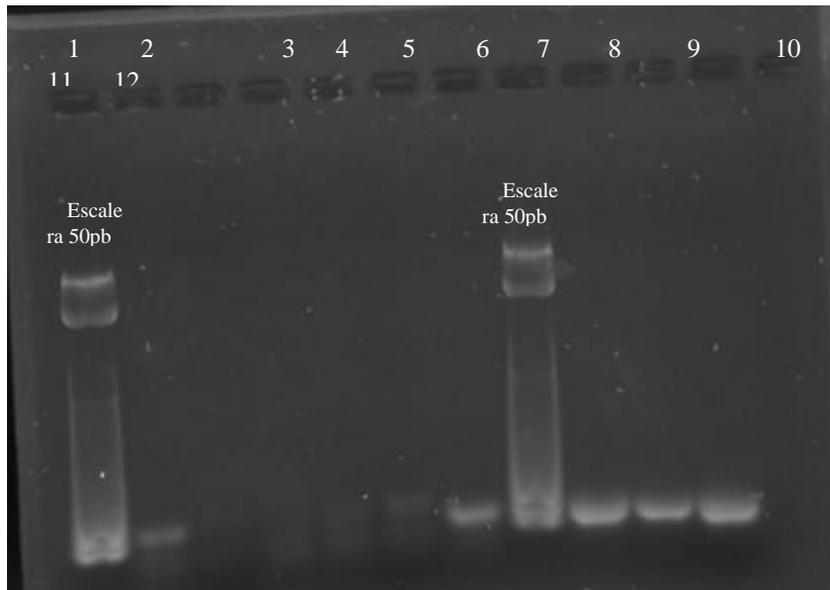


Figura 27. Producto de PCR para ADN orientado a *P. bahamense*.

Gel de agarosa al 1% de reacción de PCR para cebadores orientados a *Pyrodinium bahamense*. No se observó amplificación en ninguna de las muestras. Se observan las dos escaleras de 50pb en los pozos 1 y 9, además se observa una pequeña amplificación a alrededor de 100pb, este tamaño de banda no coincide con los productos esperados (Cuadro 13) por lo que se clasificó como negativa.

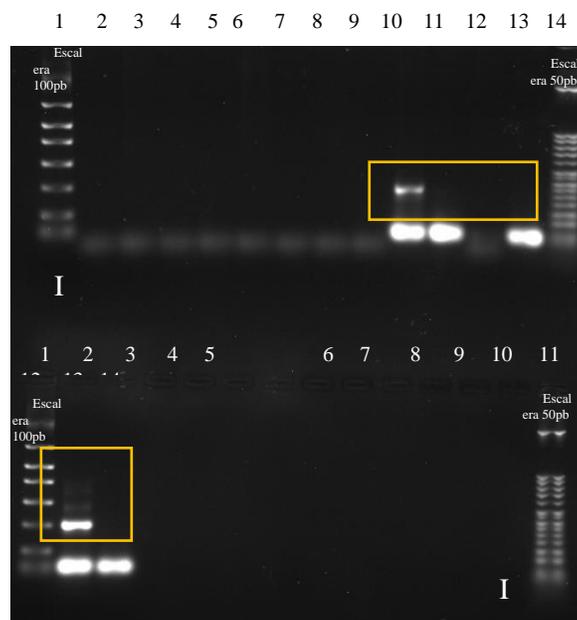


Figura 28. Producto de PCR para ADN orientado a dinoflagelados

Gel de agarosa al 1% de reacción de PCR para cebadores orientados a dinoflagelados en muestras frescas. Se observa amplificación de cinco muestras en los pozos (I.10, 11 y 13) siendo 11 y 13 muy tenues, en II se observa amplificación escalonada en el pozo 2 y muy tenue en el pozo 3.

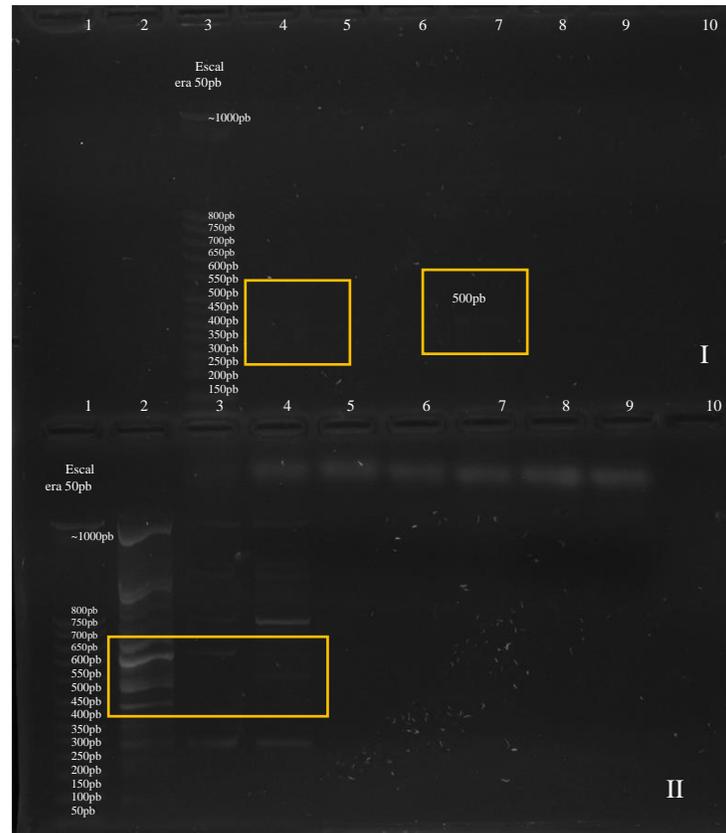


Figura 29. Productos de PCR para el gen SXT con cebadores combinados

Gel de agarosa 1% en el que se realizó la combinación de cebadores de saxitoxina universal y orientados a el dominio sxta4- en este se observa la amplificación de cinco muestras, la mayoría de estas ADN escalonado, además este gel corrió durante más tiempo del necesario por lo que se observa parte del producto de arriba (I) en los pozos de abajo (II). La amplificación se observa de una sola banda muy tenue en I pozos 4 y 7 a la altura de ~450-500pb. Abajo (II), se observa en pozos 2,3 y 4 una amplificación escalonada con bandas más fuertes en ~400pb, 500pb, 600pb y ~750pb. Esto además coincide con el PRC in silico realizado (Figura 32).

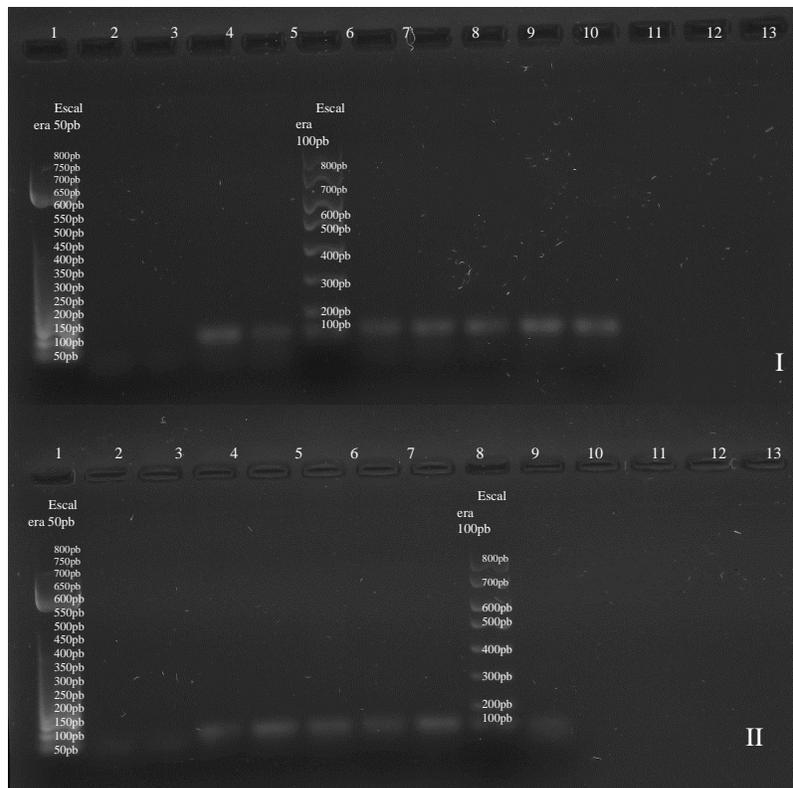


Figura 30. Productos de PCR para cebadores orientados a SXT en muestras frescas (marzo 2022) y muestras del FAN de mayo 2022.

Se observa una ligera amplificación en I, pozos 4, 5, 7-11, de un tamaño de ~100pb. En los pozos 1 y 6 se observan las escaleras. En II se observan también amplificaciones en pozos 4-8 y 19 en el mismo tamaño que las anteriores. También se observa que las escaleras no tienen bandas claras en los tamaños, especialmente la escalera de 50pb por lo que no se puede dilucidar exactamente el tamaño de la banda. Debido al tamaño de la banda demasiado pequeño que el esperado (Cuadro 13) se tomó como un resultado negativo para la amplificación.

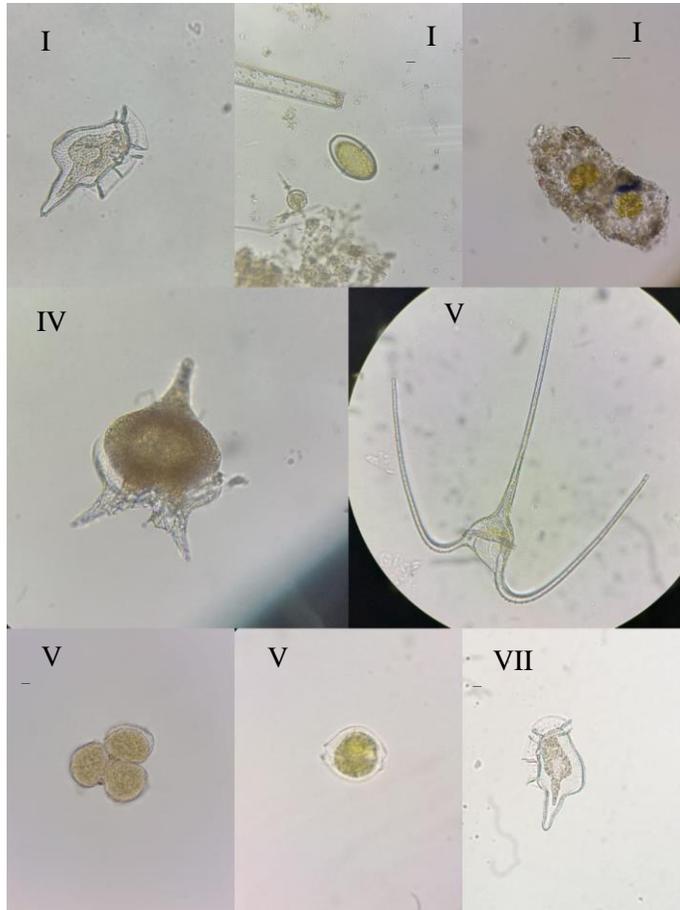


Figura 31. Distintos dinoflagelados observados por microscopía en las muestras analizadas. 40x.

Se observan distintos dinoflagelados potencialmente tóxicos y otros no tóxicos observados en varias muestras. Se pueden en potencialmente tóxicos *Dinophysis acuminata*. en I y VIII, se observa *Proceratium oceanicum* en IV, *Alexandrium* sp. VII, se observa *P. bahamense* oculto por un cúmulo de residuos de la muestra tomada en el FAN de mayo 2022 III y especies no identificada en II y VI.

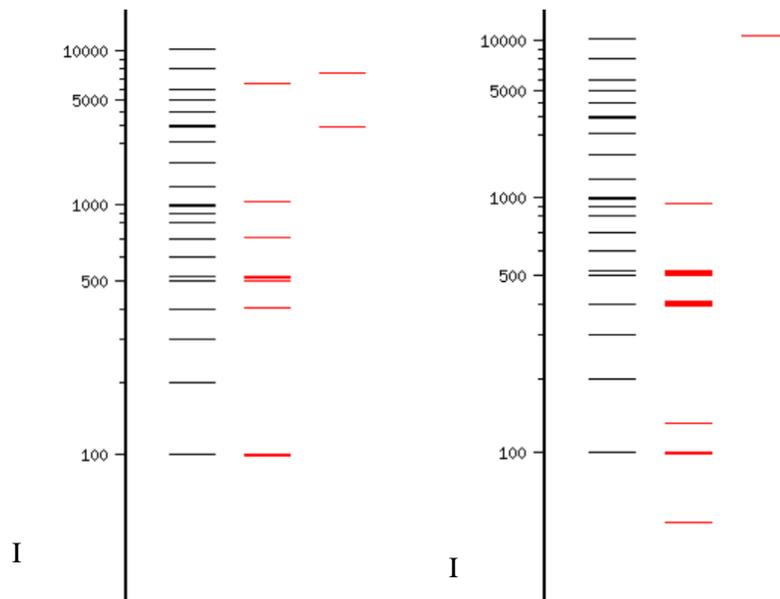


Figura 32. Ensayo de PCR in silico realizado para cebadores orientados al gen SXT combinados.

Se utilizaron los cebadores en pares de 3 1-3 en (I) y 2-4 (II) (Cuadro 13). Se puede observar la escalera en color negro a la izquierda y las bandas de amplificación en rojo a la derecha. Se observan bandas en casi toda la escalera, pero aquellas con mayor intensidad se observan en 500pb y 100pb para ambos ensayos. Estos ensayos se realizaron utilizando secuencias del genoma de *P. bahamense* encontradas en el GeneBank de NCBI.

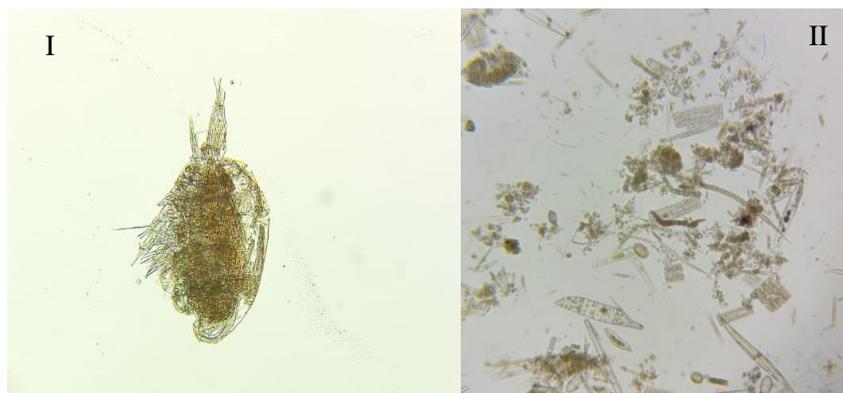


Figura 33. Organismos planctónicos observados por microscopía óptica en distintas muestras con magnificación 100.

Se observa un copépodo en I y diversas especies de diatomeas y dinoflagelados en II.