

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Estacionalidad, morfología y potencial tóxico de
Pseudo-nitzschia spp. de la Zona de las Grandes Islas y Alto
golfo de California**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
Presenta:

Viridiana Margarita Nava Ruiz

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Viridiana Margarita Nava Ruiz

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. M. Del Pilar Sánchez Saavedra

Dr. David Alberto Rivas Camargo



Dr. Jorge Adrián Rosales Casión
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Viridiana Margarita Nava Ruiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Ecología Marina.

Estacionalidad, morfología y potencial tóxico de *Pseudo-nitzschia* spp. de la zona de las Grandes Islas y Alto golfo de California

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

Algunas especies del género *Pseudo-nitzschia* tienen la capacidad de producir ácido domoico (AD) que es una potente neurotoxina responsable de la intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP por sus siglas en inglés). En el golfo de California, *Pseudo-nitzschia* es un componente común del fitoplancton. Sin embargo, son pocos los estudios en esta región sobre la diversidad, variación temporal y potencial tóxico de sus especies. Especialmente no existe información en la Zona de las Grandes Islas (ZGI) y el Alto Golfo de California (AGC) donde las condiciones ambientales pueden favorecer la acumulación de especies de *Pseudo-nitzschia*. Por lo tanto, en este estudio se estableció un monitoreo en ZGI y AGC durante agosto a noviembre de 2016 y de enero a mayo 2017 para caracterizar la comunidad fitoplanctónica en estas áreas. Asimismo, en la ZGI se tomaron perfiles verticales de salinidad y temperatura; se cuantificaron los nutrientes inorgánicos, pigmentos fotosintéticos y AD en material particulado. Se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) para caracterizar las relaciones entre parámetros ambientales y parámetros biológicos y se establecieron cepas de *Pseudo-nitzschia* para determinar su potencial tóxico. La identificación de las especies de *Pseudo-nitzschia* se realizó de acuerdo a su morfología, evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) además de análisis filogenéticos basados en la amplificación de las regiones ITS y LSU del ADN ribosomal (ADNr). En la ZGI la temperatura del agua, la abundancia del fitoplancton y la de *Pseudo-nitzschia* se caracterizaron por presentar diferencias estacionales que se identificaron como de verano, invierno y un mes de transición. En el AGC no se registró un patrón estacional claro. Se registraron 7 morfotipos de *Pseudo-nitzschia* para la ZGI (*Pseudo-nitzschia* sp.1., *P. cf. delicatissima*, *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf. pungens*, *Pseudo-nitzschia* sp.6 y *Pseudo-nitzschia* sp.2.) y 3 para el AGC (*Pseudo-nitzschia* sp.1, *P. cf. delicatissima* y *Pseudo-nitzschia* sp.6). En la ZGI, la mayor abundancia y diversidad de *Pseudo-nitzschia* se registró en verano y mes de transición ($>1.5 \times 10^5$ cel L⁻¹). El ACP indicó que el 30% de la varianza en la abundancia de *Pseudo-nitzschia* durante el verano puede ser explicada por la salinidad y la temperatura. Se detectaron concentraciones de AD en material particulado entre 0.02 y 87.79 ngAD L⁻¹ durante el verano y el mes de transición. Se registró una correlación alta ($r=0.92$) entre la concentración de AD y la abundancia de *P. cf. pungens*. No se comprobó la producción de AD en las cepas establecidas. Este es el primer reporte de AD en muestras de fitoplancton para el norte del golfo de California y también se reporta por primera vez la presencia de *P. cf. delicatissima* y *P. multistriata* dentro del golfo de California.

Palabras clave: *Pseudo-nitzschia*, ácido domoico, potencial tóxico, golfo de California.

Abstract of the thesis presented by **Viridiana Margarita Nava Ruiz** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Seasonality, morphology and toxic potential of *Pseudo-nitzschia* spp. of the Midriff Islands region and the Upper Gulf of California

Abstract approved by:

PhD. Ernesto García Mendoza
Thesis Director

Some species of genus *Pseudo-nitzschia* produce domoic acid (DA), a potent neurotoxin responsible for the amnesic shellfish poisoning (ASP). *Pseudo-nitzschia* is a common component of the phytoplankton community in the Gulf of California. However, there are few studies describing the diversity, seasonal variation and toxic potential of *Pseudo-nitzschia* in the region. Specifically, there is no information in the Midriff Islands region (MIR) and the Upper Gulf of California (UGC) where environmental conditions could promote the accumulation of *Pseudo-nitzschia* species. Therefore, in this study the phytoplankton community was characterized during a monitoring program in the MIR and UGC from August to October 2016 and January to May 2017. Temperature and salinity profiles in the water column were taken, inorganic nutrients, photosynthetic pigments, and particulate DA were quantified in the MIR. A principal components analysis (PCA) was applied to analyze the relationship between environmental and biological parameters. In addition, *Pseudo-nitzschia* strains were established and the production of DA was evaluated on these strains. *Pseudo-nitzschia* species were identified according to their morphology evaluated by scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. Also, the phylogenetic analysis was performed using the ITS and LSU regions of ribosomal DNA (rDNA). The variation in water temperature, phytoplankton, and *Pseudo-nitzschia* abundance were grouped in three season periods in the MIR: summer, winter and a transition month. There was not a clear seasonal pattern in the Upper Gulf of California. Seven *Pseudo-nitzschia* morphotypes were registered (*Pseudo-nitzschia* sp.1., *P. cf. delicatissima*, *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf. pungens*, *Pseudo-nitzschia* sp.6 y *Pseudo-nitzschia* sp.2.) in the Midriff Islands region and three (*Pseudo-nitzschia* sp.1, *P. cf. delicatissima* y *Pseudo-nitzschia* sp.6) in the Upper Gulf of California. The highest *Pseudo-nitzschia* abundance and diversity were present during summer and transition month ($>1.5 \times 10^5$ cell L⁻¹). PCA indicated that 30% of the variance of *Pseudo-nitzschia* abundance in summer could be explained by salinity and temperature. A concentration between 0.02 and 87.79 ng AD L⁻¹ of particulate DA was detected in summer and in the transition month. *P. cf. pungens* abundance and AD concentration were strongly correlated ($r=0.92$). DA was not detected in the cultivated strains. This is the first report of the presence of DA in the Northern Gulf of California. Also, *P. cf. delicatissima* and *P. multistriata* were reported for the first time for the Gulf of California

Keywords: *Pseudo-nitzschia*, domoic acid, toxic potential, Gulf of California.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi padre y mi mejor amigo

Juan Nava y
Sergio Escobar
Los extrañaré siempre.

A la fortaleza y valentía de mi madre y de mi hija

María Elena Ruiz y
Nicté May
Son mi fuerza, mi orgullo y las mejores maestras. Las amo.

Al apoyo incondicional de

Mis hermanos, cuñados y sobrinos

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de maestría (becario 586973) a través del Programa Nacional del Posgrados de Calidad (PNPC), la cual me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al posgrado de Ecología Marina del CICESE por la beca de movilidad para la asistencia a congresos.

A la Red Temática sobre Florecimientos Algales Nocivos del CONACYT (Red FAN) por las becas de movilidad otorgadas para la asistencia a cursos y congresos.

A la beca recibida para la continuación de mi investigación otorgada como parte del proyecto FORDECYT No. M0037-2015-02-260040.

A mi director de tesis *Dr. Ernesto García Mendoza*, gracias por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por darme la libertad y confianza para realizar mi tesis. Sobre todo, muchas gracias por su comprensión y apoyo cuando más la necesité. Quedo muy complacida de haber trabajado con usted.

A comité de tesis, los doctores *David Rivas Camargo* y *Pilar Sánchez Saavedra* por sus comentarios y correcciones para mejorar mi trabajo.

A *Gustavo Cárdenas* del Programa de Monitorización Acústica de la Vaquita de la Coordinación de Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) por las muestras de fitoplancton otorgadas para la realización de este trabajo.

A los doctores *Sonia Quijano* y *Aramis Olivos* de la Universidad de Colima por su ayuda en el análisis de datos filogenéticos y en el análisis de muestras de nutrientes.

Al *Dr. David Uriel Hernández Becerril* del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por su ayuda en el análisis de muestras en TEM y por su apoyo en la identificación taxonómica de mis especímenes.

Al Ing. *Luis Gradilla* de Ciencias de la Tierra del CICESE por su ayuda en el análisis de muestras en SEM.

A los integrantes del laboratorio de FICOTOX del CICESE (*M.C. Jennifer Medina*, *M.C. Yaireb A. Sánchez*, *M.C. Ramón Murillo* y *M.C. Axel Rosas*) por su apoyo en el análisis de muestras de pigmentos y ácido domoico.

A la *M.C. Patricia Paredes* del posgrado de Ciencias de la Vida por su apoyo en la parte de biología molecular, sobretodo gracias por brindarme tu amistad y por hacer más amena mi estancia en Ensenada.

Al *Dr. Helmut Maske*, *Dr. Ricardo Cruz*, *M.C. César Almeida* del laboratorio de Microbios Marinos del CICESE por su guía y por dejarme hacer uso de sus equipos e instalaciones.

A mi equipo de muestro: *M.C. Consuelo Díaz*, *M.C. Aldo Rodríguez*, *Mariana Dorantes*, *M.C. Ramón Murillo* y a todas aquellas personas que me acompañaron de manera aleatoria.

A los *M.C. Francisco Castañeda* y *M.C. José Manuel Pulido* por las clases de estadística y biología molecular.

A la Quím. Daniela Ortega del CICY por su dirección para la toma y procesamiento de las muestras de nutrientes.

A mis compañeros de generación por el aprendizaje, los consejos y la ayuda que siempre me brindaron.

A mis amigos Chelo, Leni, Gina, Cinthya, Adolfo, Gabriel, Selene, Aldo y Blanca gracias por la hermandad, por su compañía, por su ayuda y por todos los buenos momentos. La maestría fue mucho más divertida a su lado.

A mis amigos de siempre y los mejores: Sergio, Daniela, Yun, Cinthya, Ely, Alex, Sergio Q., Yino y Dama. Gracias infinitas por TODO, por estar ahí en los buenos y en los peores momentos a pesar de la distancia, gracias por darme la seguridad de saber que siempre estarán ahí para mi y para Nicté. Los quiero.

A la familia May por dejarme ser parte de ustedes, por las palabras de aliento y por su optimismo.

Todo aquel que te brinda paz, te regala su compañía y te da soporte emocional merece ser reconocido, gracias Iván por ser tan buen perro (por favor alguien que se lo lea).

A José, gracias por regalarme a los mejores compañeros de vida (Iván y Nicté).

A mi hija. Conocí muchos sentimientos, pero el más sincero lo conocí el día que naciste. Gracias por enseñarme ese sentimiento que no tiene nombre, gracias Nicté por luchar desde el primer día, gracias por tanta felicidad. Te amo.

A mis padres por enseñarme a ser perseverante y al resto de mi familia por seguir adelante a pesar de la pérdida, por mantenerse unidos, por respetar mis decisiones y por apoyarme siempre. Son lo más importante para mi. Los amo, sepan que son parte de mis logros y de mi persona, sin ustedes no sería la mujer que soy.

¡Gracias a todas las personas que no mencioné y que son parte de mi vida, gracias por seguirme en este camino!

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xiii

Capítulo 1. Introducción

1.1 Diatomeas productoras de ácido domoico: género <i>Pseudo-nitzschia</i>	1
1.2 <i>Pseudo-nitzschia</i> y AD en las costas de México	3
1.3 Factores asociados a los florecimientos de <i>Pseudo-nitzschia</i>	6
1.4 Justificación	8
1.5 Hipótesis	9
1.5.1 Objetivo general	9
1.5.2 Objetivos específicos.....	9

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio	10
2.1.1 Zona de las Grandes Islas (ZGI)	12
2.1.2 Alto Golfo de California (AGC)	12
2.2 Toma de muestras	13
2.2.1 Zona de las Grandes Islas (ZGI)	13
2.2.2 Alto golfo de California (AGC)	15
2.3 Análisis de muestras	16
2.3.1 Concentración de nutrientes inorgánicos	16
2.3.2 Concentración de pigmentos fotosintéticos	16
2.3.3 Análisis de la comunidad fitoplanctónica	17
2.3.4 Concentración de ácido domoico en material particulado (pAD)	18
2.3.5 Cultivo de cepas	18
2.3.6 Caracterización e identificación morfológica de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	19
2.3.7 Identificación molecular	20

2.3.8 Determinación del potencial tóxico de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.....	21
2.3.9 Procesamiento de datos y análisis estadísticos	21

Capítulo 3. Resultados

3.1 Parámetros ambientales: temperatura	22
3.1.2 Parámetros ambientales: salinidad	25
3.2 Concentración de nutrientes inorgánicos	28
3.2.1 Nitratos y nitritos (NO ₃ +NO ₂)	28
3.2.2 Amonio (NH ₄)	28
3.2.3 Fosfatos (PO ₄)	29
3.2.4 Silicatos (SiO ₂)	30
3.3 Concentración de pigmentos fotosintéticos: Chl <i>a</i>	34
3.3.1 Concentración de otros pigmentos fotosintéticos	36
3.3.2 Quimiotaxonomía: Distribución de los grupos fitoplanctónicos con base en los pigmentos fotosintéticos registrados	37
3.4 Análisis de la comunidad fitoplanctónica	38
3.4.1 Comunidad fitoplanctónica: Zona de las Grandes Islas	38
3.4.2 Variación estacional de la abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. de la Zona de las Grandes Islas	40
3.4.3 Relación entre la abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. y parámetros ambientales en la ZGI	46
3.5 Concentración de Ácido Domoico en material particulado (pAD) en la ZGI	48
3.5.1 Ácido domoico en material particulado y abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. en la ZGI	49
3.6 Comunidad fitoplanctónica: Alto Golfo de California	50
3.6.1 Variación estacional de la abundancia y diversidad morfológica de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	50
3.7 Caracterización e identificación morfológica de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	53
3.8 Identificación molecular de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	61

Capítulo 4. Discusión

4.1 Variables ambientales en la Zona de las Grandes Islas (ZGI): temperatura y salinidad	64
4.2 Variables ambientales en la ZGI: nutrientes inorgánicos	65
4.3 Biomasa y abundancia fitoplanctónica: ZGI y AGC	66
4.4 Estacionalidad y potencial tóxico de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	69
4.5 Morfología y filogenia de <i>Pseudo-nitzschia</i>	73

Capítulo 5. Conclusiones	75
Literatura citada	77
Anexos	85
Anexo 1	85
Anexo 2	86
Anexo 3	87
Anexo 4	89
Anexo 5	90
Anexo 6	91
Anexo 7	94
Anexo 8	96
Anexo 9	97
Anexo 10	98

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Distribución de especies de <i>Pseudo-nitzschia</i> en las costas noroeste de México. Se presentan los registros de la presencia de AD en muestras de fitoplancton y mortandades de organismos marinos probablemente asociadas a esta toxina.	5
Figura 2. (A) Ubicación de las zonas de estudio en el golfo de California. (B) Estaciones de muestreo en Zona de las Grandes Islas y (C) Alto Golfo de California.	11
Figura 3. (A-B) Características estructurales visibles con microscopía de luz (ML). (C-D) Microscopía electrónica de transmisión (MET). Los círculos muestran el traslape de las células (formación de cadenas), las elipses sólidas muestran las estrías, las elipses punteadas las interestrías, las cabezas de las flechas los poroides, las flechas sólidas la separación entre fíbulas y las punteadas las fíbulas. Imagen tomada de Amato et al., 2007.	19
Figura 4. Distribución superficial de la temperatura en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición..	23
Figura 5. Distribución vertical de la temperatura en los sitios de muestro de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.	24
Figura 6. Distribución superficial de la salinidad en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.	26
Figura 7. Distribución vertical de la salinidad en los sitios de muestro de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.	27
Figura 8. Distribución superficial de la concentración de NO_3+NO_2 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	30
Figura 9. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de NO_3+NO_2 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	31
Figura 10. Distribución superficial de la concentración de NH_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	31
Figura 11. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de NH_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	32
Figura 12. Distribución superficial de la concentración de PO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	32

Figura 13.	Distribución en la base de la termoclina de la concentración de PO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	33
Figura 14.	Distribución superficial de la concentración de SiO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	33
Figura 15.	Distribución en la base de la termoclina de la concentración de SiO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	34
Figura 16.	Distribución superficial de la concentración de Chl a en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	35
Figura 17.	Distribución en la base de la termoclina de la concentración de Chl a en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.	36
Figura 18.	Contribución relativa de los pigmentos marcadores de los principales grupos de fitoplancton al total de la clorofila a (Chl a T) en (A) superficie, (B) base de la termoclina en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. Diatomeas (Fuc), euglenofitas (Chl b), dinoflagelados (Per), criptofitas (Allo) y prochlorofitas (DvChl a).	38
Figura 19.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en superficie para de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	40
Figura 20.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.	41
Figura 21.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. en superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	43
Figura 22.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.	44
Figura 23.	Variación espacial y temporal de los morfotipos de <i>Pseudo-nitzschia</i> presentes en la superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	45
Figura 24.	Variación espacial y temporal de los morfotipos de <i>Pseudo-nitzschia</i> presentes en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	46
Figura 25.	Resultados del análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre la abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. y variables ambientales en la Zona de las Grandes Islas. El grupo 1 (G1) representa datos de las estaciones E1 a E7 0m del	

	25-sep y 23-oct-2016; (G2) representa datos de las estaciones E2 aE5 base de la termoclina del 25-sep y23-oct-2016; (G3) E1 a E7 0m y base de la termoclina del 08-mar y 16-may-2017.	47
Figura 26.	Concentración de ácido domoico en material particulado (ρ AD) para la ZGI (A) superficie y (B) base de la termoclina.	48
Figura 27.	(A) Regresión lineal entre la concentración de ácido domoico en material particulado (ρ AD) y la abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. septiembre y octubre; (B) Regresión lineal PAD vs AT <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>pungens</i>	49
Figura 28.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en superficie para el Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	51
Figura 29.	Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. en el Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	52
Figura 30.	Variación espacial y temporal de los morfotipos de <i>Pseudo-nitzschia</i> presentes en la superficie para el Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.	53
Figura 31.	Imágenes de microscopía de luz (ML) de los morfotipos y cepas aisladas de <i>Pseudo-nitzschia</i> en la Zona de las Grandes Islas y Alto Golfo de California. (A) <i>P.</i> cf. <i>delitissima</i> (cepa Pn2BLA y morfotipo Pn2); (B) <i>P.</i> cf. <i>pungens</i> (cepa Pn8BLA y morfotipo Pn5); (C) <i>P. multistriata</i> (cepas Pn1 y Pn5BLA, morfotipo Pn4); (D) <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.1 (morfotipo Pn1); (E) <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.6 (morfotipo Pn6); (G) <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.2 (morfotipo Pn7) (H) <i>P. americana</i> (cepa Pn6, morfotipo Pn3)..	54
Figura 32.	(A) <i>Pseudo-nitzschia americana</i> en ML (A) Células epífitas en <i>Stephanophixys</i> sp. (B) Células solitarias, se muestran dos cloroplastos en cada ápice (C-D) Frústulas en vista valvar en SEM (escala de la barra= 2 μ m) (C) Valva completa (D) Ápice celular, la flecha señala el patrón de estrías (escala de la barra= 1 μ m).	55
Figura 33.	(A) <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> en ML. (B) Células en vista valvar mostrando la formación de cadenas en SEM (escala de la barra=2 μ m) (C) Parte media de la valva mostrando la ausencia de nódulo central y patrón de estrías en SEM (escala de la barra=1 μ m) (D) Frústula completa en SEM (escala de la barra=2 μ m) (E) Ápices valvares mostrando el traslape celular (escala de la barra=1 μ m).	56
Figura 34.	(A) <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>delicatissima</i> en ML (B) Frústula completa en SEM (escala de la barra=10 μ m) (C) Fíbulas, estrías y líneas de poroides (escala de la barra=2 μ m) (D) Ápice valvar (escala de la barra=2 μ m).	57
Figura 35.	(A) <i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>pungens</i> en TEM (escala de la barra=20 μ m) (B) Frústula completa en SEM (escala de la barra=10 μ m) (C) Fíbulas y poroides (escala de la barra=1 μ m).	58
Figura 36.	Árbol filogenético de las secuencias del marcador ITS del ADNr enraizado con el grupo externo <i>Fragilariopsis nana</i> . El árbol fue construido con los valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de máxima verosimilitud (ML). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. La estrella indica las cepas obtenidas en este estudio.	62

Figura 37.	Árbol filogenético de las secuencias del marcador LSU del ADNr enraizado con el grupo externo <i>Nitzschia navis-varingica</i> . El árbol fue construido con los valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de máxima verosimilitud (ML). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. La estrella indica las cepas obtenidas en este estudio.	63
Figura 38.	Distribución de especies de <i>Pseudo-nitzschia</i> en el golfo de California. (DAP) Registros de envenenamiento por ácido domoico, (pAD) Registros de ácido domoico en material particulado. En negritas se señalan a las especies reportadas con potencial tóxico.	72
Figura 39.	Estructura química del ácido domoico, ácido kaínico y glutamato.	85
Figura 40.	Variación espacio-temporal de la temperatura en la base de la termoclina para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.	89
Figura 41.	Variación espacio-temporal de la salinidad en la base de la termoclina para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) Periodo de verano; (D-F) Periodo de invierno; (G) mes de transición.	90
Figura 42.	Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton en superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	94
Figura 43.	Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	95
Figura 44.	Especies fitoplanctónicas más abundantes en ambas zonas de estudio. (A-B) <i>Chaetoceros</i> spp.; (C) <i>Coscinodiscus</i> sp.; (D) <i>Trichodesmium</i> sp.; (E) <i>Ditylum</i> sp. ; (F) <i>Stephanophixys</i> sp.; (G) <i>Navicula</i> sp.; (G) Rafidofita; (H) Euglenofita; (I) <i>Protooperidinium</i> sp.; (J) <i>Prorocentrum</i> sp.; (K) <i>Dynophysis</i> sp. (L) <i>Ceratium</i> sp.; (M) <i>Protooperidinium</i> sp.; (N) <i>Prorocentrum</i> sp.; (Ñ) <i>Phalacroma</i> sp.	94
Figura 45.	Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton del Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.	98

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Especies de <i>Pseudo-nitzschia</i> con potencial tóxico reportadas en costas mexicanas.	3
Tabla 2. Posición geográfica de las estaciones de muestreo ubicadas en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California.	13
Tabla 3. Posición geográfica de los sitios de muestreo ubicados en el Alto Golfo de California, golfo de California.	15
Tabla 4. Información morfológica de las cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. de la Zona de las Grandes Islas ($n=30$; promedio \pm DS). $n/v=$ características no visibles con SEM.	59
Tabla 5. Profundidades de muestreo en la base de la termoclina por sitio y por temporada, en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California.	86
Tabla 6. Lista de secuencias de ITS y LSU ADNr de <i>Pseudo-nitzschia</i> usadas en los análisis filogenéticos. En negritas se señalan a las cepas obtenidas en este estudio.	87
Tabla 7. Concentración máxima y promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de verano. Clorofila c3 (Chl c3), clorofila c2 (Chl c2), peridininina (Per), 19'-butanoiloxifucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), diatoxantina (Diat), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).	91
Tabla 8. Concentración máxima y promedio de de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de invierno. Clorofila c3 (Chl c3), clorofila c2 (Chl c2), peridininina (Per), 19'-butanoiloxifucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), diatoxantina (Diat), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).	92
Tabla 9. Concentración máxima y promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de transición. Clorofila c3 (Chl c3), clorofila c2 (Chl c2), peridininina (Per), 19'-butanoiloxifucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).	93
Tabla 10. Matriz de entrada (Rotación Varimax) de los componentes principales. En negritas se señalan las entradas con correlaciones > 0.70 . (CP) componente principal.	97

Capítulo 1. Introducción

Uno de los grupos de microalgas más importantes dentro del fitoplancton marino son las diatomeas que contribuyen con la mayor parte de la fijación de carbono en el océano. Las diatomeas son responsables del 40 al 45% de la producción primaria en el océano (Bates y Trainer, 2006), además intervienen en la exportación vertical de materia orgánica desde capas superiores del océano hacia el sedimento. Este grupo de microalgas también juega un rol importante en los ciclos biogeoquímicos del carbono (C) y de otros elementos como nitrógeno (N), fósforo (P), hierro (Fe) y sílice (Si) (Sarhou et al., 2005).

Debido a que poseen mecanismos de supervivencia y estrategias de crecimiento eficientes, las diatomeas tienden a dominar dentro del fitoplancton en zonas de surgencia y regiones costeras o en sitios con altas concentraciones de nutrientes (Armbrust, 2009). Aunque la mayoría de las diatomeas no tienen un carácter nocivo, algunas especies pueden causar daños al ambiente y a otros organismos, ya sea por daños mecánicos al sistema respiratorio de peces, por disminuir la concentración de oxígeno en el medio o por su capacidad de producir ficotoxinas (Bates y Trainer, 2006).

Las ficotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por distintos grupos de fitoplancton como cianobacterias, dinoflagelados, diatomeas y otros (Santiago, 2011). La primera especie de diatomea reportada como productora de ficotoxinas fue *Nitzschia pungens* cf. *multiseries* (= *Pseudo-nitzschia multiseries*) (Bates et al., 1989). La toxina producida se identificó como ácido domoico (AD) (Bird et al., 1988, Bates et al., 1998). El AD es una potente neurotoxina responsable de la intoxicación amnésica por consumo de mariscos en humanos o ASP (por sus siglas en inglés) y en fauna marina de la intoxicación por ácido domoico o DAP (por sus siglas en inglés) (Terseleer et al., 2013). El mecanismo de acción del AD se describe en el Anexo 1.

1.1 Diatomeas productoras de ácido domoico: género *Pseudo-nitzschia*

El AD fue aislado por primera vez en la macroalga *Chondria armata* (Rhodophyta) y más tarde fue encontrado en otras macroalgas pertenecientes a la familia Rhodomelaceae (*Alsidium corallinu*, *C. baileyana*, *Amansia glomerata*, *Digenea simplex* y *Vidalia obtusiloba*) (Bates, 1989; Sato et al., 1996). Posteriormente, se descubrió la producción de esta toxina por diatomeas después de un evento de

intoxicación aguda en seres humanos donde tres personas perdieron la vida. Este fue el primer evento, ocurrió en Canadá en el año de 1987 y es el único caso reconocido de ASP causado por el consumo de mejillones (*Mytilus edulis*) que acumularon el AD del fitoplancton. La especie de diatomea productora de AD fue identificada como *N. pungens* f. *multiseries* (= *P. multiseries*) (Bates et al., 1989; Zabaglo, 2016). Posteriormente, en 1991 se reportó el primer caso de DAP en fauna marina donde se registraron mortandades de pelicanos pardos (*Pelecanus occidentalis*) y de cormoranes de Brandt (*Phalacrocorax penicillatus*) en la bahía de Monterey, California (E.U.) y se identificó a *P. australis* como la especie productora de AD (Work et al., 1993).

No sólo especies del género *Pseudo-nitzschia* producen AD, otras diatomeas pennadas capaces de sintetizar AD son *Nitzschia navis-varinginica* y *N. bizertensis* (Kotaki et al., 2000; Lundholm et al., 2000; Smida et al., 2014). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han realizado sobre *Pseudo-nitzschia* debido a las pérdidas económicas por cierre de pesquerías y daños ecológicos (mortandades masivas de fauna marina) ocasionados por eventos tóxicos asociados a este género. Los florecimientos algales nocivos (FAN) de especies de *Pseudo-nitzschia* son recurrentes en zonas costeras de todos los continentes (Terseleer et al., 2013).

Pseudo-nitzschia es considerado un género cosmopolita debido a su amplia distribución geográfica (Hasle, 2002); sin embargo, ciertas especies o asociaciones de especies tienden a dominar en diferentes regiones del mundo (Bates et al., 1998). A nivel mundial, se han descrito 49 especies de *Pseudo-nitzschia*, en 25 de éstas se ha confirmado la producción de ácido domoico: *P. abrensis*, *P. australis*, *P. batesiana*, *P. brasiliana*, *P. caciantha*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. fukuyoi*, *P. galaxiae*, *P. granii*, *P. hasleana*, *P. kodamae*, *P. lundholmiae*, *P. multiseries*, *P. multistriata*, *P. obtusa*, *P. plurisecta*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. seriata*, *P. simulans*, *P. subfraudolenta*, *P. subpacificae*, *P. hallegraeffii* y *P. turgidula* (Teng et al., 2015; Teng et al., 2016; Li et al., 2017, Lundholm, 2018, Ajani et al., 2018).

Los FAN de especies de *Pseudo-nitzschia* han sido reportados de manera recurrente en sistemas de surgencias (Trainer et al., 2012). Entre las áreas más impactadas por estos florecimientos se encuentran la parte sur de la Columbia Británica (Canadá) y las zonas costeras del norte del estado de Washington y las costas centrales de California en Estados Unidos (Lewitus et al., 2012) donde las especies responsables de la acumulación de AD son: *P. pseudodelicatissima*, *P. multiseries*, *P. pungens* y *P. australis* (Trainer et al., 2012).

1.2 *Pseudo-nitzschia* y AD en las costas de México

En México se han registrado 21 especies de *Pseudo-nitzschia* de las cuales 10 tienen potencial tóxico (Trainer et al., 2012). Seis especies potencialmente productoras de AD se han registrado en las costas del Pacífico, ocho en el golfo de México y cuatro en el golfo de California (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Pseudo-nitzschia* con potencial tóxico reportadas en costas mexicanas.

Especie	Sitio	Referencias
<i>P. australis</i>	Pacífico	1
<i>P. brasiliana</i>	Pacífico, Golfo de California, Golfo de México	2, 3, 5, 9
<i>P. fraudolenta</i>	Pacífico	4, 6
<i>P. pungens</i>	Pacífico, Golfo de California, Golfo de México	4, 6, 7, 9
<i>P. calliantha</i>	Golfo de México	9
<i>P. cuspidata</i>	Golfo de México	9
<i>P. galaxiae</i>	Golfo de México	10
<i>P. pseudodelicatissima</i>	Golfo de México, Golfo de California	4,6,7,8,9
<i>P. subfraudolenta</i>	Pacífico, Golfo de California	4,8
<i>P. delicatissima</i>	Pacífico, Golfo de México	2,9

(1) García-Mendoza et al., 2009; (2) Quijano-Scheggia et al., 2011; (3) Lundholm et al. 2002; (4) Gómez-Aguirre et al., 2004; (5) Gárate-Lizárraga et al., 2013; (6) Gárate-Lizárraga et al., 2007; (7) Hernández-Becerril, 1998; (8) Sierra-Beltrán et al., 2005; (9) Parsons et al., 2012; (10) Lundholm y Moestrup, 2002.

La primera asociación entre la presencia de ácido domoico y la muerte de fauna marina en México ocurrió en 1996 en la parte sur de la Península de Baja California, donde se reportó la muerte de 150 pelicanos pardos (*Pelecanus occidentalis*) causada probablemente por consumo de macarelas (*Scomber japonicus*) contaminadas con AD (Sierra-Beltrán et al., 1997). Sin embargo, no se identificó a la especie de *Pseudo-nitzschia* productora de AD durante este evento. Posteriormente, en el año 2002 se registró la muerte de 87 lobos marinos (*Zalophus californianus*) al norte de Baja California y se asoció a DAP (Hernández-Becerril et al., 2007). No se realizaron mediciones de esta toxina en los organismos afectados para corroborar este supuesto. En el 2007 un FAN fue registrado en Bahía Todos Santos, también al norte de Baja California. Este evento se relacionó a procesos de surgencia y se detectó una concentración máxima de AD de 0.86 $\mu\text{g AD L}^{-1}$ en muestras de plancton, estas concentraciones estuvieron asociadas a la presencia de *P. australis* (García-Mendoza et al., 2009). Posteriormente, se aislaron dos cepas de esta especie de la región y se caracterizó la producción de AD en diferentes condiciones de cultivo (Santiago-Morales y García-Mendoza, 2011). Los trabajos realizados por García-Mendoza et al. (2009) y Santiago-Morales y García-

Mendoza (2011) son las únicas investigaciones sobre la presencia y potencial tóxico de *P. australis* en México (Fig. 1).

En el golfo de California (GC), *Pseudo-nitzschia* es un componente común del fitoplancton (Moreno et al., 1996) y sus florecimientos, al igual que en las costas del Pacífico, se han vinculado a eventos de surgencia o aumentos en la concentración de nutrientes. Hasta el año de 2013, a lo largo del GC se registraron 7 especies de *Pseudo-nitzschia* (*P. brasiliana*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. americana*, *P. seriata*, *P. subfraudolenta*) de las cuales al menos cuatro están reportadas en la literatura como productoras de AD (Hernández-Becerril, 1998; Sierra-Beltrán et al., 1997; Sierra-Beltrán et al., 2005; Lundholm et al., 2002; Gárate-Lizárraga, 2007; Gárate-Lizárraga et al., 2013) (Tabla 1, Fig. 1).

En el interior del GC existen solamente dos reportes de florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia* con potencial tóxico, así como intoxicación de aves y fauna marina por AD. La primera asociación de muertes de fauna marina ocasionadas por AD ocurrió en 1997 en la región del Alto Golfo de California (Fig.1); sin embargo, no se pudo identificar a la especie de *Pseudo-nitzschia* relacionada con la producción de AD (SEMARNAT-PROFEPA, 1997). En la región sur del golfo, en la Bahía de la Paz (Baja California Sur) Gárate-Lizárraga et al. (2007) registraron a inicios del periodo de verano un florecimiento mixto de *P. fraudolenta*, *P. pungens* y algunas especies del complejo *P. pseudodelicatissima* (Fig. 1). Estas especies son reconocidas como productoras de AD y durante este florecimiento se detectaron concentraciones bajas de AD en muestras de red (24-52 ng AD filtro⁻¹). No se aislaron cepas durante este florecimiento por lo que no se identificó a la especie que produjo el AD detectado en las muestras de fitoplancton.

Otro reporte de la presencia de especies con potencial tóxico es el de Gárate-Lizárraga et al. (2013). Estos autores reportaron una proliferación de *P. brasiliana* y *P. cf. pseudodelicatissima* durante condiciones de verano en el estero Santa Cruz (Sonora) ubicado en parte norte del GC (Fig. 2). Se registraron abundancias para ambas especies de hasta 160×10^3 cel L⁻¹. En este estudio no se realizó la cuantificación de AD y no se obtuvieron aislados celulares que se permitieran identificar la capacidad de las especies para sintetizar AD.

Otra especie identificada como productora de AD reportada dentro del GC es *P. pungens*. Gárate-Lizárraga et al. (2007) y Hernández-Becerril (1998) reportan la presencia de esta especie y describen algunas de sus características morfométricas, pero en estos trabajos no se estudió su capacidad de producir AD.

Los reportes de la presencia de especies de *Pseudo-nitzschia* con potencial tóxico en las costas del Pacífico mexicano y en el golfo de California, aunado a la detección de AD y su probable asociación con epizootias, sugieren que existe incidencia de los florecimientos de este género con potencial nocivo. Sin embargo, se conoce poco sobre la ecología y fisiología de las especies potencialmente nocivas de estas regiones. En particular, en el golfo de California no se conoce qué especie(s) de *Pseudo-nitzschia* tiene(n) la capacidad de producir AD y probablemente estuvo relacionada con eventos de mortandades masivas de organismos marinos ocurridos en esta región.

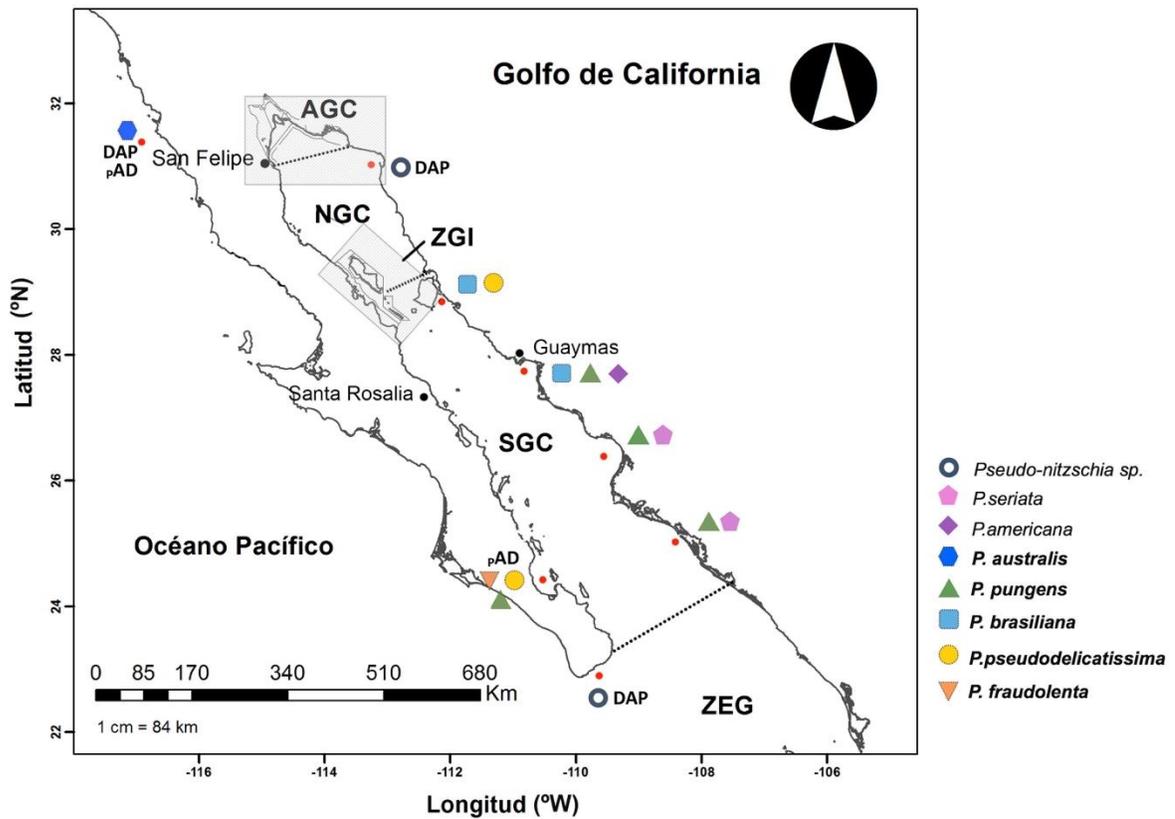


Figura 1. Distribución de especies de *Pseudo-nitzschia* en las costas de noroeste de México. Se presentan los registros de la presencia de AD en muestras de fitoplancton y mortandades de organismos marinos probablemente asociadas a esta toxina. (**NGC**) Norte del golfo de California; (**ZGI**) Zona de las Grandes Islas; (**SGC**) sur del golfo de California; (**ZEG**) Zona de entrada golfo de California. (**DAP**) Registros de envenenamiento por ácido domoico, (**pAD**) Registros de ácido domoico en material particulado. En negritas se señalan a las especies reportadas con potencial tóxico.

1.3 Factores asociados a los florecimientos de *Pseudo-nitzschia*

Los florecimientos de *Pseudo-nitzschia* están generalmente asociados a condiciones físicas de turbulencia y aporte de nutrientes por ríos, eventos de surgencia y enriquecimiento antropogénico (Liefer et al., 2013). Sin embargo, además de los nutrientes otros factores ambientales como la salinidad, la temperatura, el pH o el fotoperiodo también están relacionados al crecimiento y distribución de algunas especies de *Pseudo-nitzschia* y a su capacidad para producir AD (Bates et al., 1998).

Una característica del género *Pseudo-nitzschia* es que está presente comúnmente en zonas costeras o estuarinas. Algunas especies de *Pseudo-nitzschia* son eurihalinas (Bates et al., 1998; Bates y Trainer, 2006) ya que crecen en intervalos de salinidad amplios. Por ejemplo, *P. multiseriis* de Nueva Escocia, Canadá, puede crecer en salinidades entre 30 a 45 (Jackson et al., 1992) y entre 0 a 36 para algunas cepas aisladas cerca del río Misisipi (Dorch et al., 1997).

También se ha observado que los florecimientos de algunas especies de *Pseudo-nitzschia* siguen un patrón estacional en el que la temperatura juega un rol importante. Por ejemplo, *P. multiseriis* tiene un intervalo óptimo de crecimiento entre los 2 a 28°C, por lo que presenta una distribución cosmopolita. Asimismo, se ha observado que su crecimiento, fotosíntesis y producción de AD dependen de la temperatura. En varias regiones de América del norte, *P. multiseriis* parece tener afinidad por aguas frías ya que sus florecimientos han sido registrados en Canadá, Texas y en el Pacífico mexicano principalmente durante invierno y otoño, o bien durante periodos en los que la temperatura del agua disminuye (Villac et al., 1993; Ochoa et al., 1996). También se ha observado que la temperatura tiene un papel importante en la sucesión de especies de *Pseudo-nitzschia*. En la Bahía Galveston, Texas, se observó el dominio de *P. multiseriis* durante el invierno y al aumentar la temperatura esta especie desaparece y *P. pungens* es la especie dominante durante el verano (Bates et al., 1998).

Además de la asociación que hace Bates et al. (1998) entre la variación de la temperatura y la estacionalidad de *P. multiseriis* y *P. pungens*, Fryxell et al. (1990) y Taylor et al. (1994) también señalan que el grado de mezcla de la columna de agua es un factor que determina la dominancia de una especie sobre la otra. La mezcla vigorosa puede favorecer a *P. multiseriis*, mientras que *P. pungens* es más abundante en condiciones de estratificación. Estudios realizados en condiciones de cultivo han demostrado que la limitación por silicatos o fosfatos y un exceso de nitrógeno están relacionadas con la producción de AD (Bates, et al., 1998). Por ejemplo, en el norte del golfo de México, los florecimientos de

Pseudo-nitzschia spp. y las concentraciones de AD están asociados a las descargas del Río Mississippi que incrementan la concentración de nitrógeno y en consecuencia la disminución en la proporción Si:N (Dortch et al., 1997). No obstante, es importante señalar que no todas las especies de *Pseudo-nitzschia* son capaces de producir AD y las especies que lo sintetizan no son capaces de hacerlo todo el tiempo (Bates, et al., 1998).

El movimiento de *Pseudo-nitzschia*, al ser es una diatomea planctónica depende en gran medida de las características físicas del océano e inclusive los rasgos topográficos del ambiente (cordilleras, umbrales, etc.) mismas que influyen sobre la presencia de esta especie de diatomea en ciertas regiones (Bates y Trainer, 2006). Son muchos los factores que podrían explicar los florecimientos algales de *Pseudo-nitzschia* y su producción de AD en el medio ambiente. Las poblaciones naturales de especies de *Pseudo-nitzschia* presentan respuestas diferentes a características ambientales distintas, lo cual sugiere una sucesión temporal de especies o bien, especificidad regional (Trainer et al., 2012).

1.4 Justificación

En el GC se han identificado y reportado distintas especies del género *Pseudo-nitzschia* (Moreno et al., 1996; Hernández-Becerril, 1998; Sierra-Beltrán et al., 2005; Lundholm et al., 2002; Gárate-Lizárraga, 2007; Gárate-Lizárraga et al., 2013). Estos trabajos son reportes puntuales sobre la presencia y abundancia de las especies identificadas por sus características morfológicas y no existen estudios que confirmen su capacidad para sintetizar AD. Además, al igual que en otras costas de México (Pacífico y golfo de México), en el GC se sabe poco sobre la variabilidad temporal de las poblaciones de *Pseudo-nitzschia* y su relación con los factores ambientales.

Por otra parte, la identificación de las especies de *Pseudo-nitzschia* del GC se ha basado en características morfológicas estructurales y ultraestructurales, mientras que el empleo de técnicas moleculares no se ha aplicado. El uso de estas herramientas es necesario para la identificación de especies crípticas, sobre todo cuando co-ocurren dos especies con potencial tóxico.

La información sobre la composición de especies de *Pseudo-nitzschia*, la variación de su abundancia y su capacidad para producir AD es necesaria para comprender la dinámica poblacional de las especies de *Pseudo-nitzschia* en la Zona de las Grandes Islas y Alto Golfo de California. Caracterizar la dinámica

problacional de especies de *Pseudo-nitzschia* junto con las condiciones ambientales de la región permitirá identificar las condiciones oceanográficas relacionadas a su acumulación, especialmente la de las especies con potencial tóxico. Esta información en conjunto es necesaria para establecer el monitoreo de FAN de *Pseudo-nitzschia* en el GC, particularmente en zonas donde se desarrollan actividades relacionadas a la extracción de moluscos bivalvos destinados al consumo humano.

1.5 Hipótesis

Las condiciones ambientales presentes en la Zona de las Grandes Islas y Alto golfo de California favorecen la presencia y acumulación de especies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente productoras de ácido domoico.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

- Caracterizar la distribución temporal, morfología y potencial tóxico de las especies de *Pseudo-nitzschia* spp. presentes en la zona de las Grandes Islas y Alto golfo de California.

1.6.2. Objetivos específicos

- Analizar los cambios en la composición de especies de *Pseudo-nitzschia* spp. y condiciones ambientales en el periodo de agosto 2016 a mayo 2017.
- Establecer cepas de especies de *Pseudo-nitzschia* aisladas de la zona de las Grandes Islas.
- Evaluar la presencia de AD en material particulado y capacidad de producción de AD de las cepas de *Pseudo-nitzschia* spp. aisladas de la Zona de Grandes Islas y Alto golfo de California.
- Identificar morfológica y molecularmente a las cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas de la zona de las Grandes islas y Alto golfo de California.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio

El golfo de California (GC) es una cuenca considerada como un mar marginal conectado al océano Pacífico. Esta delimitado al oeste por la península de Baja California y al este por las costas de los estados de Sonora y Sinaloa. Se localiza entre los 23° y 32° N y 107° y 115° O y tiene una longitud de 1400 km y una amplitud de aproximadamente 200 km (Bray y Robles, 1991).

Hidrográficamente, el GC es muy dinámico debido a las corrientes de marea, eventos de surgencia, el forzamiento del viento y el calentamiento solar (Soto-Mardones *et al.*, 1999; Hidalgo-González y Alvarez-Borrego, 2001). Los eventos de surgencia ocurren durante condiciones de invierno en la costa oriental cuando hay vientos predominantes del noreste. Por otro lado, en la costa de Baja California, estos eventos ocurren con vientos del suroeste en condiciones de verano y se presenta un periodo de transición durante los meses de junio y noviembre (Alvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991).

Existen dos condiciones climáticas marcadas en GC: invierno de latitud media (diciembre a mayo) y verano subtropical (julio a octubre). La precipitación es variable dentro del golfo, de manera general en el lado oriental la precipitación es mayor que en la parte occidental y en la parte norte la precipitación anual es menor a 100 mm, mientras que el sureste del golfo la precipitación es aproximadamente de 1000 mm al año (Alvarez-Borrego, 2002; CONANP, 2014).

El GC se divide en cinco provincias de acuerdo a su batimetría (Lavín y Marinone, 2003): **1)** La zona de entrada (ZEG), con comunicación abierta con el océano Pacífico; **2)** sur del golfo de California (SGC) que abarca desde el interior de la boca del golfo hasta el sur de las Grandes Islas; **3)** Zona de las Grandes Islas (ZGI) caracterizada por tener canales estrechos con profundidades máximas entre los 300 y 600 m; **4)** el norte del golfo de California (NGC) que tiene las características de la plataforma marina y **5)** el Alto Golfo de California (AGC) provincia ubicada al norte de los 31°N y es la parte más somera del GC con profundidades <30 m (Fig. 2A).

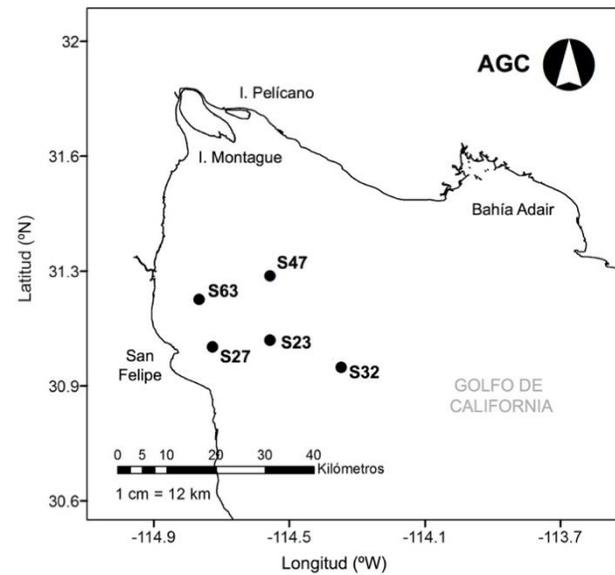
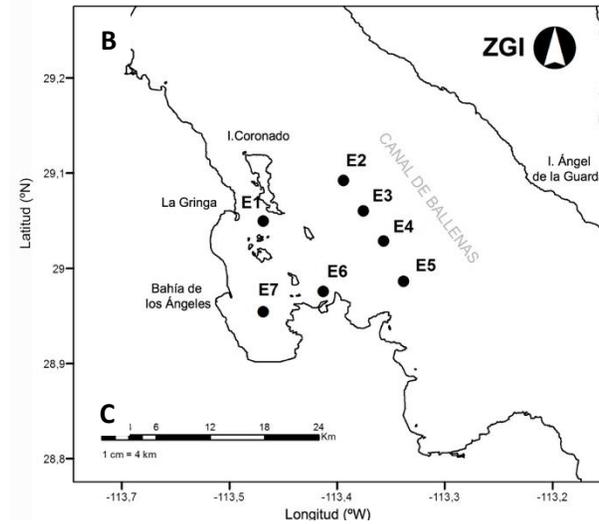
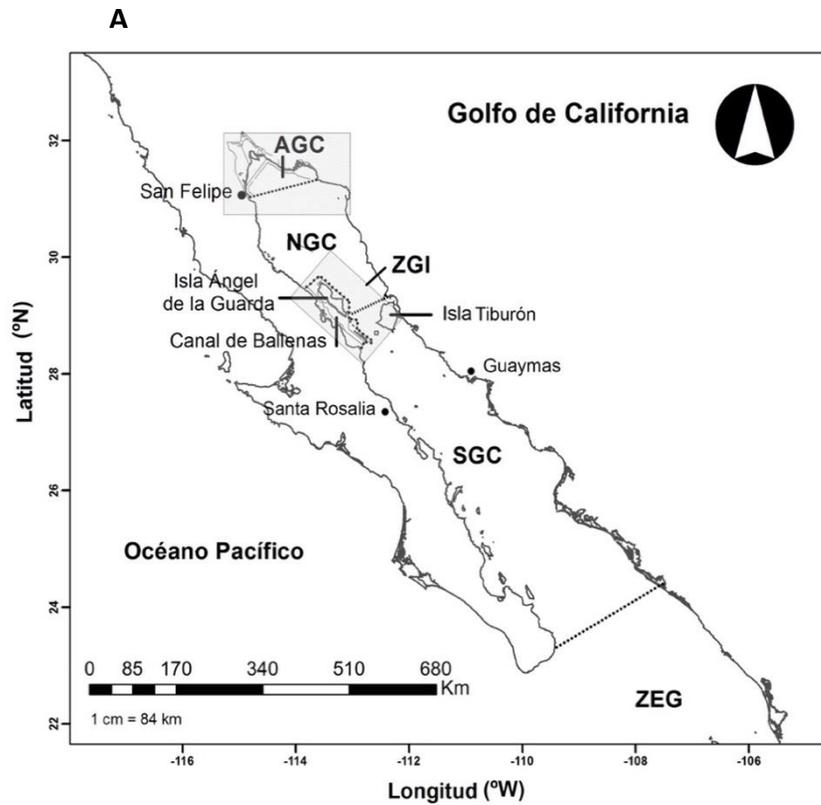


Figura 2. (A) Ubicación de las zonas de estudio en el golfo de California. (B) Estaciones de muestreo en Zona de las Grandes Islas y (C) Alto Golfo de California. (AGC) Alto Golfo de California, (NGC) Norte del golfo de California, (ZGI) Zona de las Grandes Islas, (SGC) sur del golfo de California.

2.1.1 Zona de las Grandes Islas (ZGI)

La ZGI se ubica en la porción de la costa oriental de la Península de Baja California, frente al municipio de Ensenada entre los 28° 20'0'' y 20° 40' 0''N y 112° 40'0'' y 114° 20'0''W (Fig. 2B) (SEMARNAT-CONANP, 2014). El Canal de Ballenas (CB) es resultado de un complejo de fallas geológicas con algunas regiones que alcanzan una profundidad de ~1600 m, su batimetría es irregular y tiene como característica una cordillera submarina que separa al canal de la región central del GC. El agua en el Canal de Ballenas es resultado de la mezcla de aguas superficiales y aguas ricas en nutrientes provenientes de la base de la cordillera (~450 m de profundidad) (Álvarez-Borrego, 2007). Dentro de esta región la intensa mezcla de corrientes y las altas tasas de disipación de la energía proveniente de las mareas son productos de la presencia de cañones submarinos de más de 1 km de profundidad, donde el agua circula a gran velocidad con cada cambio de marea. Por lo tanto, la mezcla generada entre la Isla San Lorenzo y San Esteban es producto de las mareas que mezcla la columna de agua hasta los 500 m de profundidad produciendo un transporte neto de aguas más frías y ricas en nutrientes hacia la superficie, presentándose una condición ecológica similar a la de una surgencia constante (Álvarez-Borrego, 2007, Álvarez-Borrego, 2010). En consecuencia, dentro de la ZGI se encuentran las concentraciones más altas de nutrientes y de CO₂, así como las temperaturas superficiales más bajas de todo el GC (Álvarez-Borrego, 2010).

En la parte de la Bahía de los Ángeles, las corrientes de marea no son muy grandes debido a la amplitud de la boca de la bahía y la batimetría del sitio, de manera que la circulación en la bahía está principalmente asociada a las variaciones temporales del viento que determinan la distribución de los nutrientes a lo largo del año (Amador-Buenrostro et al., 1991).

2.1.2 Alto Golfo de California (AGC)

El Alto Golfo de California se ubica entre los 31° 00' y 32° 10'N y entre los 113° 30' y 115° 15'W. Limita con los municipios de Puerto Peñasco y San Luis Río Colorado en Sonora y de Mexicali en Baja California (Fig. 2C) (SEMARNAT-CONANP, 2007). El AGC es una cuenca de evaporación somera (< 30m de profundidad) con fuerte mezcla de marea que mantiene el agua mezclada verticalmente. Durante las mareas de primavera (mareas muertas), se presentan intervalos de marea de hasta 6.5 m con corrientes de marea de aproximadamente 0 a 5 m s⁻¹ (Alvarez-Borrego, 2010; Lavin y Marinone, 2003). Antes de que el río Colorado fuera represado, el AGC era un ambiente estuarino, por lo menos durante el máximo caudal del

río; en la actualidad el AGC tiene un comportamiento antiestuarino durante todo el año (Lavin y Marinone, 2003).

En el AGC las corrientes de marea son importantes en el transporte de los sedimentos. Aunque la mayor resuspensión de sedimentos ocurre durante las mareas de primavera, el ligero movimiento de rotación de las corrientes de marea también juega un rol importante en la resuspensión de los sedimentos (Alvarez y Jones, 2002).

2.2 Toma de muestras

2.2.1 Zona de las Grandes Islas (ZGI)

Para determinar las variaciones espacio-temporal de la comunidad de fitoplancton y de *Pseudo-nitzschia* spp., se estableció un programa de monitoreo mensual que abarcó de los meses de agosto a noviembre de 2016 y de enero a mayo del 2017 (excepto el mes de abril), en siete estaciones de muestreo: tres ubicadas en la zona de costa (E1, E6 y E7) y cuatro dentro del Canal de Ballenas (E3, E2, E4 y E5) (Tabla 2, Fig. 2B).

Tabla 2. Posición geográfica de las estaciones de muestreo ubicadas en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California.

Estación	Latitud (N)	Longitud (W)
E1	29° 1' 32.08"	113° 32' 17.52"
E2	29° 4' 9.45"	113° 26' 57.60"
E3	29° 2' 14.74"	113° 25' 46.68"
E4	29° 0' 19.96"	113° 24' 37.19"
E5	28° 58' 25.07"	113° 23' 35.08"
E6	28° 57' 42.95"	113° 27' 54.88"
E7	28° 56' 14.60"	113° 31' 2.76"

En cada estación se realizaron perfiles verticales de temperatura y salinidad con un perfilador hidrográfico (CTD) modelo YSI CastAway. La profundidad de los lances varió en función de la profundidad del punto de muestreo, la cual se determinó con una sonda portátil de profundidad (Speedtech Instruments), con un

intervalo de medición de 0.6 a 79 m. Adicionalmente, en cada sitio se tomaron muestras discretas de agua con una botella muestreadora tipo Niskin de 5 L en dos profundidades: superficie y base de la termoclina. La profundidad de la base de la termoclina de cada estación se estimó a partir de los datos obtenidos *in situ* con el CTD. Cuando no se identificó una termoclina marcada, se tomó la muestra a una profundidad estándar de 15 m (Anexo 2). Para la determinación de nutrientes inorgánicos (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SiO_2) se filtraron 25 mL de agua de mar con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro y una apertura de poro de $0.7 \mu\text{m}$. Las muestras fueron congeladas (-20°C) hasta su procesamiento en el Centro Universitario de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad de Colima.

Para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos y ácido domoico en material particulado (pAD) se filtraron 1000 mL y 600 mL de agua, respectivamente. Para ambos casos se usaron filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro, $0.7 \mu\text{m}$ de apertura de poro, utilizando bomba de vacío. Los filtros fueron almacenados a -80°C en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio de FICOTOX del CICESE.

Para el análisis de la comunidad de fitoplancton se tomaron submuestras de 250 mL en botellas de plástico color ámbar, las muestras fueron fijadas con una solución lugol-acetato (1% concentración final). Finalmente, en cada estación se realizó un arrastre vertical a 20 m de profundidad con una red para fitoplancton con luz de malla de $40 \mu\text{m}$. Las muestras se almacenaron en botellas color ámbar de 250 mL y se transportaron en refrigeración para mantener a las células de *Pseudo-nitzschia* spp. vivas. El aislamiento de las células se realizó en la Sub-Estación de Bahía de los Ángeles (SEBLA) del CICESE bajo microscopio invertido (Olympus CK2) mediante micromanipulación con pipetas capilares. Las células aisladas se mantuvieron en condiciones de cultivo en microplacas de titulación de 96 pozos utilizando medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Posterior al aislamiento de células, las muestras de red fueron fijadas con lugol-acetato.

2.2.2. Alto golfo de California (AGC)

Las muestras para el análisis de la comunidad de fitoplancton del AGC fueron colectadas mensualmente en la superficie de la columna de agua por parte del personal del Programa de Monitorización Acústica de la Vaquita a cargo de la Coordinación de Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) en 5 estaciones de muestreo ubicadas dentro del área de protección de la vaquita marina (Tabla 3, Fig. 2C). El periodo de muestreo comprendió de agosto a

diciembre de 2016 y de marzo a mayo de 2017. La toma de las muestras en el AGC varió en función de la disponibilidad o del acceso a los diferentes sitios de muestreo por parte del personal a cargo. Las muestras tomadas fueron preservadas siguiendo la metodología empleada en la ZGI. Dada la naturaleza del muestreo, no fue posible obtener datos *in situ* sobre la hidrografía del lugar y no se logró establecer cepas de *Pseudo-nitzschia* spp. debido a la dificultad de obtener muestras con material vivo. Por lo tanto, para la región del AGC se presentan únicamente los promedios mensuales (por sitio de muestreo) de la abundancia total del fitoplancton (cel L^{-1}), la abundancia relativa de los principales grupos fitoplanctónicos (%), así como la variación temporal de la abundancia de la comunidad de *Pseudo-nitzschia* spp.

Tabla 3. Posición geográfica de los sitios de muestreo ubicados en el Alto Golfo de California, golfo de California.

Estación	Latitud (N)	Longitud (W)
E47	31° 18' 0''	114° 39' 35.99''
E63	31° 11' 60''	114° 45' 0''
E27	31° 3' 36''	114° 42' 35.99''
E23	31° 4' 48''	114° 32' 24''
E32	31° 0' 0''	114° 19' 47.99''

2.3 Análisis de muestras

2.3.1 Concentración de nutrientes inorgánicos

El análisis de nutrientes inorgánicos disueltos: Nitratos más Nitritos ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$); Amonio (NH_4), Fosfatos (PO_4^{3-}) y Silicatos (SiO_2) se llevó a cabo empleando técnicas colorimétricas mediante un autoanalizador de flujo segmentado (Skalar San Plus II) con una precisión de 0.01 Mm. Esto en base a las técnicas descritas por Solórzano (1969); Strickland y Parsons (1972); Grasshoff et al. (1983).

2.3.2 Concentración de pigmentos fotosintéticos

La extracción de los pigmentos fotosintéticos se realizó por disrupción mecánica de los filtros (Bead Beater, Biospec Inc.) en tubos para centrifuga de 2 mL agregando perlas de zirconia de 0.5 mm y 1 mL de acetona fría al 100%. Las muestras se homogeneizaron en tres rondas de 10 s a 500 rpm, con un periodo de

enfriamiento entre cada ronda. Posteriormente las muestras se almacenaron en condiciones de oscuridad por 24 h a -20 °C. Finalmente, para la limpieza del extracto las muestras fueron centrifugadas a 1300 rpm por 8 min a 4 °C con dos repeticiones. Previo a la inyección se adicionó acetato de tetrabutilamonio (TBAA) 28 mM a una proporción de 30 µL por cada 100 µL de muestra.

La cuantificación de los pigmentos se realizó siguiendo el protocolo de Van Heukelem y Thomas (2001) con modificaciones descritas en Almazán-Becerril y García-Mendoza (2008) mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), usando el equipo Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies) equipado con una columna fase reversa Eclipse XDB-C8 (150 X 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de poro 3.5 µm) y un detector de arreglo de diodos (DAD) programado para detectar 3 longitudes de onda (436, 450 y 475 nm). La temperatura de la columna fue de 60°C. El tiempo del análisis fue de 30 minutos y se realizó manteniendo un flujo constante de 1 mL min⁻¹. Para bombear la fase móvil se usó un gradiente binario con metanol: TBAA 28 mM a una proporción 70:30 (solución A) y metanol al 100% (solución B). El bombeo de dicha fase fue (Min, %B): 0 min, 5%; 22 min, 95%; 27 min, 95%; 30 min, 5%.

El sistema fue calibrado con 16 estándares de pigmentos (DHI Inc., Dinamarca): clorofila c3 (Chl c3), clorofila c2 (Chl c2), peridina (Per), 19'-but fucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β-caroteno (β-carot). Cada pigmento se identificó con base en su tiempo de retención y su concentración se determinó a partir del área debajo de cada pico. En el caso del β-caroteno, su concentración se calculó a partir del factor de la zeaxantina. Se estimó la contribución relativa de los pigmentos marcadores de los diferentes grupos de fitoplancton a la clorofila a total (Chl a T) mediante la proporción: pigmento marcador/Chl a T.

2.3.3 Análisis de la comunidad fitoplanctónica

Los conteos celulares se realizaron mediante el método Utermöl (Sournia, 1978). Las muestras fueron sedimentadas en torres de 10, 25, 55, 95 o 100 mL (según la abundancia celular de cada muestra) por un periodo de 24 h. El conteo se realizó analizando el fondo de la cámara de sedimentación hasta contar un mínimo de 400 células (sólo células con contenido celular) o la cámara completa si la muestra presentaba una baja abundancia. Se utilizó un microscopio invertido (Leica modelo DMIL Led) con objetivos 20X y 40X. La abundancia celular total (AT) se expresa como número de células por litro (cel L⁻¹) y la abundancia

relativa (AR) en porcentaje con respecto a la AT. La identificación de los grupos de fitoplancton se realizó según los criterios de Tomas (1997), Omura et al. (2012) y Moreno et al. (1996) a nivel de género en el caso de las diatomeas y a nivel de grupo para los otros grupos algales.

En el caso de *Pseudo-nitzschia*, debido a que no es posible realizar la identificación a nivel de especie por medio de microscopía óptica, se realizó una clasificación con base en las características morfológicas de las células. Al conjunto de células que compartían características morfológicas similares como la forma de la valva, traslape celular, eje apical (longitud) y eje transapical (ancho) fueron consideradas como morfotipos.

2.3.4 Concentración de ácido domoico en material particulado (pAD)

La extracción del pAD se realizó en condiciones de poca luz mediante disrupción mecánica de los filtros obtenidos en campo (Bead Beater, Biospec Inc.) en tubos para centrífuga de 2 mL agregando perlas de zirconia de 0.5 mm y 1 mL de metanol al 50%. Las muestras se homogeneizaron en dos rondas de 10 s a 500 rpm, con un periodo de enfriamiento entre cada ronda. Para la limpieza del extracto, las muestras se centrifugaron a 1300 rpm por 8 min a 4 °C con dos repeticiones. Previo a la inyección se adicionó ácido trifluoroacético (TFA), considerando una concentración final de 0.15%.

Se cuantificó el pAD en el sobrenadante de acuerdo al protocolo descrito por Mafra et al. (2009) por medio de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS) utilizando un equipo modelo Agilent 6470 (Agilent Technologies) con triple cuadrupolo con fuente de ionización electrospray y una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus-C18 (100 X 2.1 mm de diámetro interno, tamaño de poro 1.8 µm). El tiempo del análisis fue de 8 min y se realizó manteniendo un flujo constante de 0.25 mL min⁻¹ a una temperatura de 45 °C. La fase móvil fue agua+ácido fórmico (0.2%) como solución A y acetonitrilo+ácido (0.2 %) como solución B. El bombeo de dicha fase fue (Min, %B): 0 min, 10%; 4 min, 35%; 7.3 min, 35%; 8 min, 10%.

El sistema se calibró con una solución certificada de AD (National Research Council Canada). El límite de detección del método fue de 0.025 ng AD ml⁻¹ de extracto.

2.3.5 Cultivo de cepas

A partir de las células aisladas en campo en la ZGI se establecieron cultivos no axénicos clonales de *Pseudo-nitzschia* spp. utilizando medio de cultivo L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Los cultivos se conservaron a temperatura constante de 20 °C y una irradiancia de $\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Se verificó periódicamente el crecimiento de los organismos y se realizaron escalamientos hasta obtener cultivos en matraces Erlenmeyer en volúmenes de 250 mL.

2.3.6 Caracterización e identificación morfológica de *Pseudo-nitzschia* spp.

La caracterización morfométrica tanto de los morfotipos observados en campo, como de las cepas aisladas se realizó por medio de microscopía de luz (ML) (Fig. 3). Se registraron las medidas típicas como eje apical, eje transapical (μm), así como traslape celular analizando 30 especímenes ($n=30$) de cada morfotipo o cepa, utilizando un microscopio invertido (Leica DMI3000B) con objetivos 20X y 40X.

La caracterización ultraestructural de las frústulas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET) a partir de material libre de materia orgánica. La limpieza de diatomeas se realizó por oxidación de la materia orgánica siguiendo el método de H_2O_2 caliente (Taylor et al., 2007). Para el análisis en SEM, se colocaron gotas del material limpio en porta objetos y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 hrs. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO MA15 del departamento de Geología de Ciencias de la Tierra del CICESE. El montaje para TEM se realizó colocando gotas del material limpio sobre rejillas de cobre recubiertas con las resinas Formvar o Coloidon, se dejó secar la muestra a temperatura ambiente por 24 hrs (Tomas, 1997; Hasle y Fryxell, 1970) y posteriormente éstas fueron analizadas en la Facultad de Ciencias de la UNAM en un microscopio electrónico de transmisión.

El análisis morfo-taxonómico de las frústulas se realizó según los criterios descritos por Lundholm et al. (2003) y Lim et al. (2013). Se estimaron los siguientes caracteres ultraestructurales (Fig. 3): ancho de la célula (μm), número de fíbulas en 10 μm , número de estrías en 10 μm , número de poroides en 1 μm , ausencia o presencia de nódulo central.

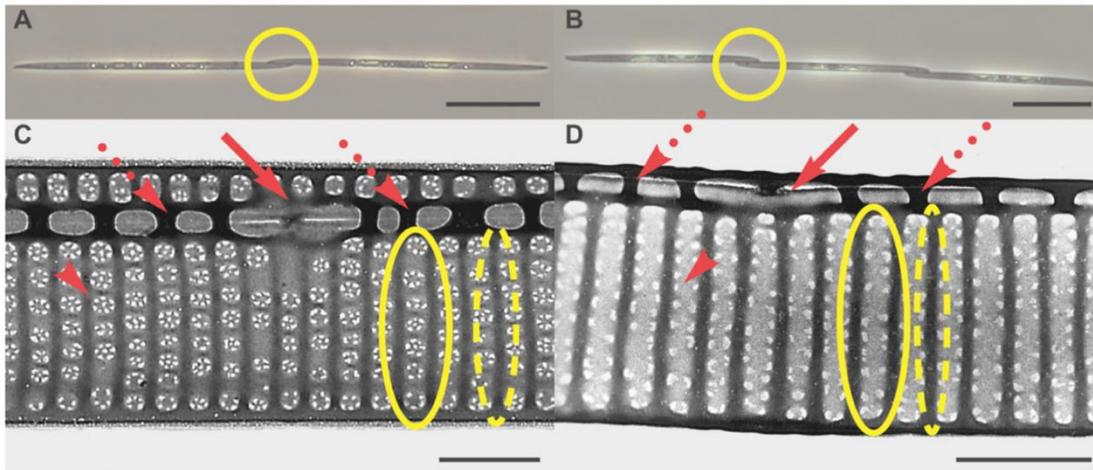


Figura 3. (A-B) Características estructurales visibles con microscopía de luz (ML). (C-D) Microscopía electrónica de transmisión (MET). Los círculos muestran el traslape de las células (formación de cadenas), las elipses sólidas muestran las estrías, las elipses punteadas las interestrías, las cabezas de las flechas los poroides, las flechas sólidas la separación entre fíbulas y las punteadas las fíbulas. Imagen tomada de Amato et al. (2007).

2.3.7 Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de 45 mL de cada cultivo. El material fue concentrado por medio de centrifugación (15 min a 2 500 rpm, -4°C), la extracción de ADN se realizó del pellet formado siguiendo el protocolo del kit DNeasy® Plant Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany). Una vez realizada la extracción, se cuantificó la concentración de ADN y se determinó su pureza (proporción 260nm/280 nm) mediante un espectrofotómetro (Nanodrop Mod.2000) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) 1X. Se cargaron 4 μL de ADN extraído y 1 μL de buffer de carga (azul de bromofenol + GelRed). El gel se corrió a 80V por 30 min y los resultados obtenidos se visualizaron con un fotodocumentador de luz UV.

Se amplificó la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS ADNr) que comprende el ITS1, 5.8S e ITS2 usando los primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990; Lim et al., 2012). El PCR se realizó con desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; seguido de 35 ciclos, cada ciclo a 94°C durante 35 s, 60°C durante 35 s y 72°C durante 1 min con una extensión final a 72°C durante 5 min (ESCO Swift MiniPro Thermal Cycler Modelo SWT-MIP-0.2-1). Las regiones D1-D3 de la subunidad grande del ribosoma (LSU

ADNr) se amplificaron usando los primers D1R-F y D3B-R más D2C (Lundholm et al., 2002), las condiciones del PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, finalmente 72 °C por 2 min. Ambas amplificaciones se realizaron utilizando el kit GoTaq DNA Polymerase. Los productos del PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Para los análisis filogenéticos (ITS y LSU ADNr) se alinearon las secuencias de las cepas de *Pseudo-nitzschia* obtenidas en este estudio con secuencias seleccionadas en NCBI Gen Bank (Anexo 3). Las secuencias fueron alineadas y editadas manualmente en el programa MEGA 6.0. En las alineaciones se incluyeron como grupos externos a *Cylindrotheca closterium* (ITS) y *Bacillaria paxillifer* (LSU). A partir de las alineaciones, se eligió un modelo óptimo para realizar el análisis de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) en Mega 6.0. El modelo general elegido fue el Kimura de dos parámetros con una distribución gamma (+G) para Pn5 y Pn1, y distribución gamma más sitios invariables (G+I) para Pn6. Se realizaron 1000 réplicas (*bootstrap*) en ML.

2.3.8 Determinación del potencial tóxico de cepas de *Pseudo-nitzschia* spp.

La cuantificación de la concentración de ácido domoico celular (AD_c) se realizó en una submuestra de 50 mL de cada cultivo de *Pseudo-nitzschia*. Las submuestras se filtraron con bomba de vacío utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro, los cuales se almacenaron a -80 °C en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio de FICOTOX del CICESE. La extracción y cuantificación de cAD se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado para el análisis de ácido domoico en material particulado (Apartado 2.3.3).

2.3.9 Procesamiento de datos y análisis estadísticos

Se usó el programa Ocean Data View (ODV) versión 4.7.10 y ArcGIS versión 10.4 para generar mapas de la distribución de las propiedades hidrográficas del área de estudio y mapas de la distribución de la abundancia fitoplanctónica, incluyendo a la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp.

Los análisis estadísticos (regresiones lineales simples) se realizaron mediante el software Statistica versión 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). El análisis multivariado se realizó usando el software R versión 1.0.153 que consistió en el análisis de componentes principales para caracterizar las relaciones entre los parámetros ambientales (temperatura, salinidad, $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, NH_4 , PO_4^{3-} y SiO_2) y los parámetros biológicos (abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. y concentración de pAD). Otros parámetros determinados en este estudio fueron graficados con Sigma Plot versión 11.0

Capítulo 3. Resultados

3.1 Parámetros ambientales: temperatura

Para el periodo de muestreo de agosto 2016 a mayo 2017 la temperatura del agua presentó un patrón estacional marcado. De agosto a octubre el intervalo de temperatura superficial fue de 24 a 29 °C, lo que se denomina como periodo de verano en este trabajo. En el periodo considerado como invierno, el intervalo de la temperatura superficial fue de 14 a 22 °C y se presentó durante los meses de noviembre 2016 a marzo 2017. Posterior al invierno, mayo del 2016 se consideró como un mes característico de un periodo de transición, ya que se observó un aumento en la temperatura del agua hasta alcanzar los 19 °C (Fig. 4).

El periodo de verano se caracterizó por presentar las mayores temperaturas superficiales de todo el muestreo. Durante el inicio de este periodo (agosto) las temperaturas máximas se presentaron en las estaciones cercanas a la costa (E1 y E6) con valores de aproximadamente 28 °C y un máximo de 29.4 °C (E7) (Fig. 4A). En agosto se observó una estratificación somera en las estaciones E7, E1 y E3 y una disminución en la temperatura a los 30 m de 4.5 °C en la E7, de 1.7.5 °C para la E1 y 2.1 °C para la E3, lo anterior con respecto a la temperatura en superficie. En las estaciones E2, E4, E5 y E6 se observó que la temperatura del agua disminuyó con la profundidad sin una capa de mezcla bien definida (Fig. 5A).

El resto del verano (septiembre y octubre) la temperatura superficial del agua disminuyó en comparación a agosto. Específicamente, en septiembre el intervalo de la temperatura superficial fue de 27 a 27.5 °C. Esta temperatura se matuvo en octubre a excepción de la estación E7 (25 °C) (Fig. 4B-C). Durante septiembre y octubre se perdió la estratificación observada durante agosto y la columna de agua permaneció mezclada en todas las estaciones (Fig. 5B-C) a excepción de las estaciones E3 y E4. En éstas, la capa de mezcla tuvo una profundida de 30 m y 20 m presentando una termoclina con una disminución de la temperatura de 2.3 y 1.7 °C respecto a la temperatura detectada en superficie (Fig. 5C).

Durante el invierno se registró una temperatura superficial máxima de 22.7 °C (E7) en noviembre y ésta disminuyó hasta alcanzar los 14.6 °C (E7) durante marzo (Fig. 4D-F). Al finalizar el invierno, en el mes de mayo la temperatura superficial del agua alcanzó los 19 °C, lo que se considera como la transición hacia las condiciones de verano (Fig. 4G). La estructura de la columna de agua fue variable durante el invierno, en noviembre se observaron termoclinas entre los 15 y 28 m de profundidad para las estaciones E4, E6 y E7 con variaciones de temperatura entre la superficie y los 30 m de hasta 2.8 °C (E7). En el resto de las

estaciones la columna de agua estuvo mezclada. Finalmente, en mayo además de presentarse un incremento de la temperatura superficial del agua hasta alcanzar 19°C, la columna de agua comenzó a estratificarse en la mayoría de las estaciones. Sin embargo, esta estratificación fue más marcada en las estaciones cercanas a la costa, donde la termoclina se presentó a los 20 m en la estaciones E7 y E1 y a 5 m en la E6. El cambio de la temperatura superficial con respecto a la profundidad máxima de muestreo fue de 2.1 °C para la estación E1 y hasta 3.1 °C en la E7 (Fig. 5D-G).

La variación espacio-temporal de la temperatura en la base de la termoclina se muestra en el Anexo 4.

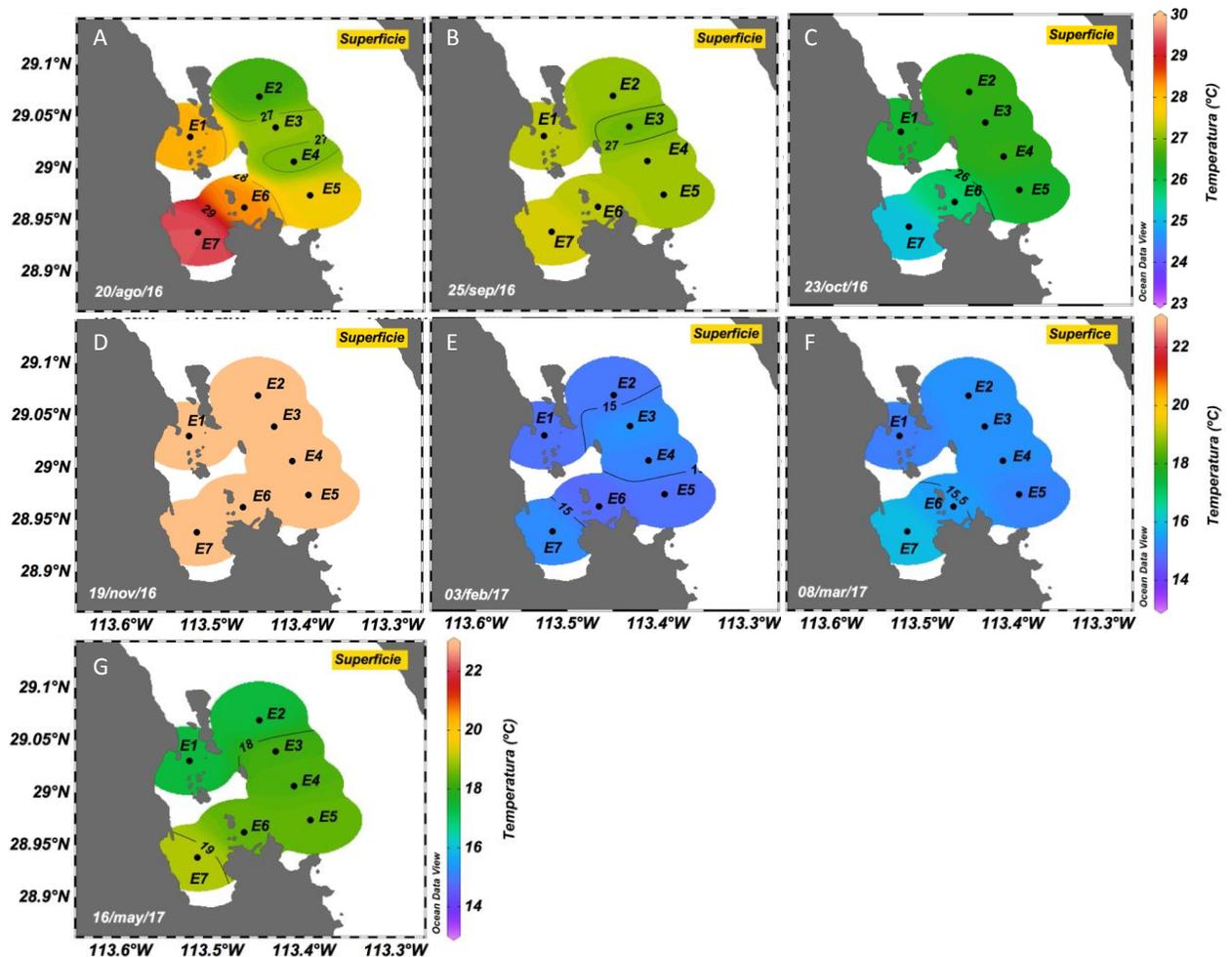


Figura 4. Distribución superficial de la temperatura en la zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.

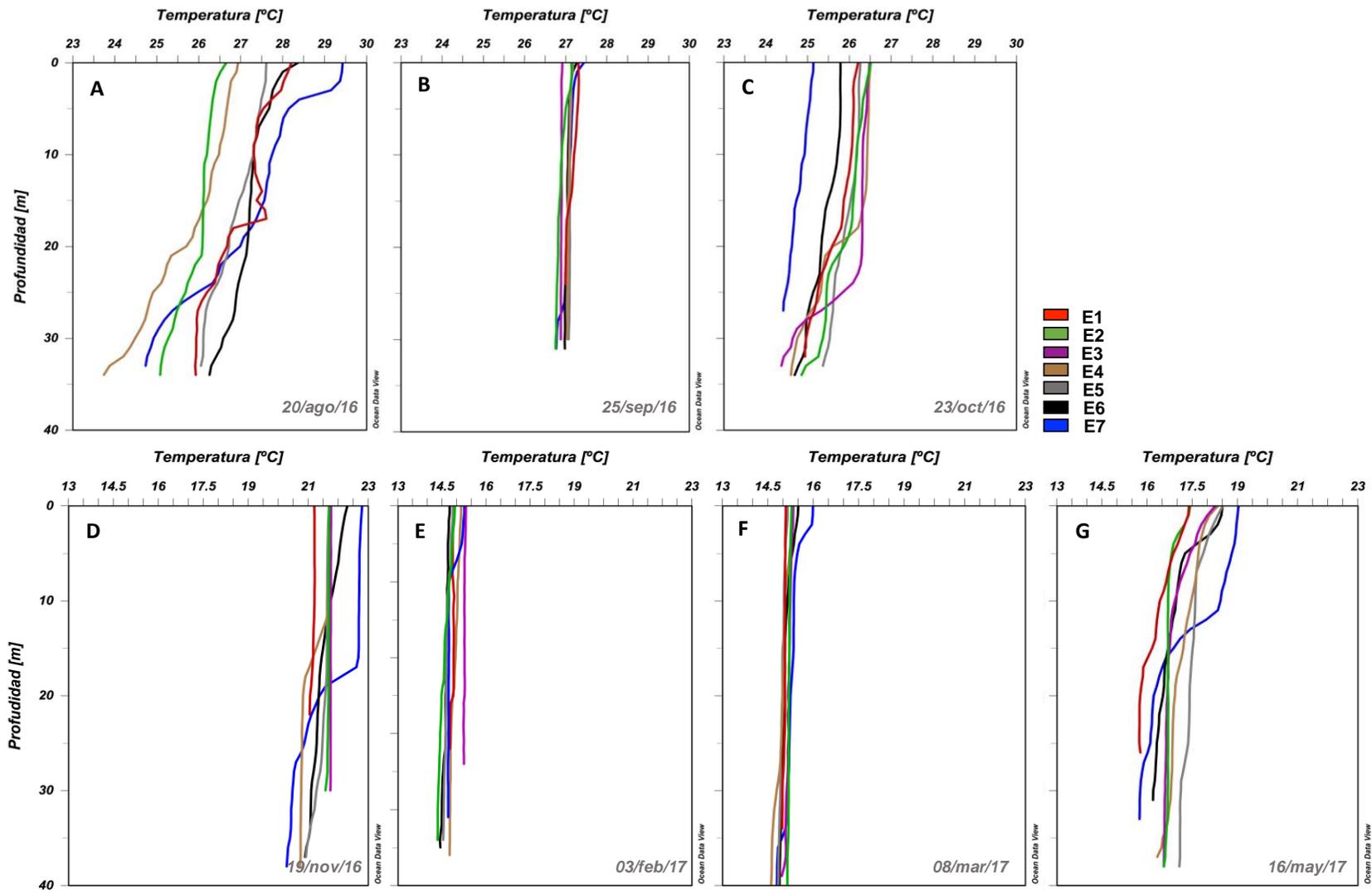


Figura 5. Distribución vertical de la temperatura en los sitios de muestro de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.

3.1.2 Parámetros ambientales: salinidad

Se registraron ligeras variaciones en la salinidad durante el periodo de muestreo. Al igual que en la temperatura se presentó un patrón estacional entre condiciones de verano con un intervalo de salinidad de 35.3 a 35.6 e invierno con un intervalo de 34.6 a 35.3.

En agosto, las estaciones con la salinidad más alta fueron las estaciones E1 y E7 ubicadas dentro de la bahía con valores de 35.5 y 35.6 ups, respectivamente. Este último valor fue el máximo registrado en este estudio. En agosto la salinidad más baja se detectó en el Canal de Ballenas (hasta 35.3). La salinidad en esta zona se incrementó en septiembre (hasta 35.4) y en octubre; al fin del periodo de verano éste incremento continuó hasta los 35.5. En contraste, en las estaciones ubicadas dentro de la bahía (E7) la salinidad disminuyó de 35.6 en agosto a 35.4 en octubre (Fig. 6 A-C).

En agosto y septiembre la columna estuvo mezclada y no se observaron variaciones de salinidad con la profundidad. Sin embargo, al finalizar el verano se observó una ligera estratificación dentro de los primeros 5 m de profundidad en las estaciones E7, E1 y E3 (Fig. 7 A-B).

El periodo de invierno se caracterizó por una disminución de la salinidad superficial de 35.3 a 34.6 de noviembre a marzo. Esta disminución se registró al interior de la bahía y en el Canal de Ballenas. Posteriormente, en mayo se observó un incremento de la salinidad hasta los 35 en todas las estaciones de muestreo (Fig. 6D-G). Al inicio del invierno (noviembre) la columna de agua estuvo mezclada, excepto en las estaciones costeras E6 y E7 donde se presentó una estratificación somera en los primeros 5 m y una diferencia de salinidad entre la superficie y los 30 m de profundidad de 0.12 y 0.23, respectivamente. De febrero a mayo prevalecieron las condiciones de mezcla en todas las estaciones de muestreo a excepción de la E1. En el mes de febrero se presentó una estratificación superficial en esta estación (<5 m) (Fig. 7D-G).

La variación espacio-temporal de la temperatura en la base de la termoclina se muestra en el Anexo 5.

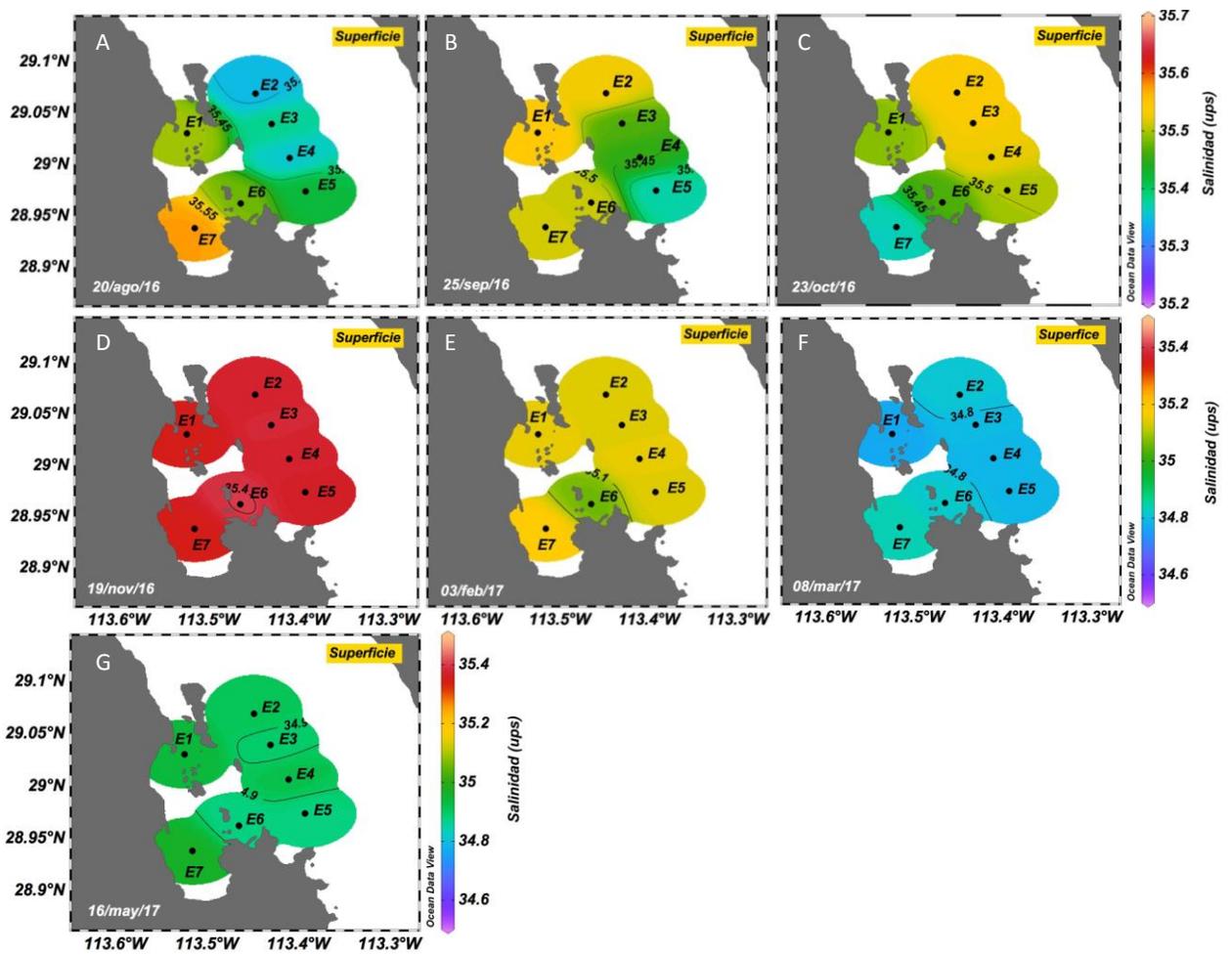


Figura 6. Distribución superficial de la salinidad en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.

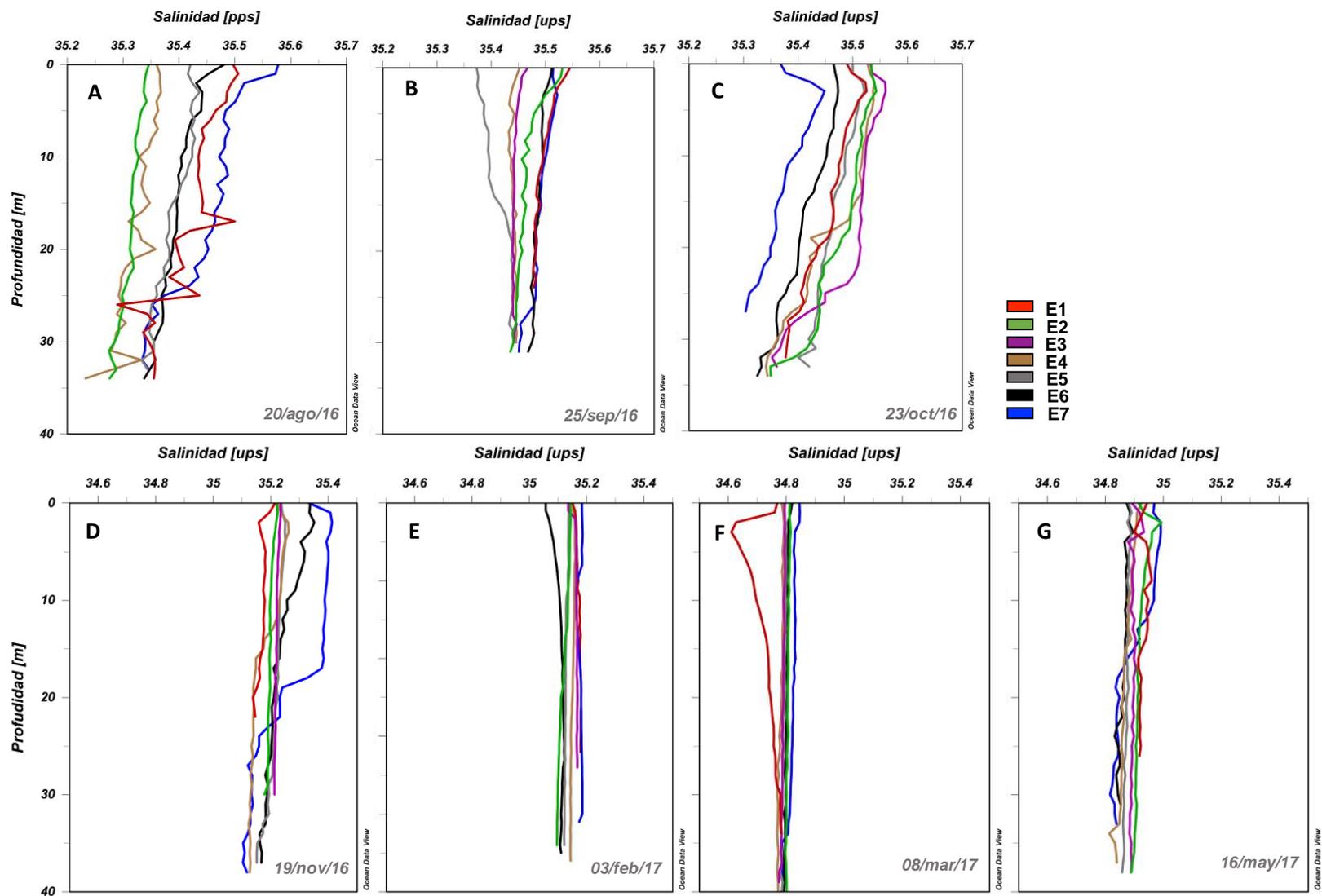


Figura 7. Distribución vertical de la salinidad en los sitios de muestro de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano; (D-F) periodo de invierno; (G) mes de transición.

3.2 Concentración de nutrientes inorgánicos

Para el análisis de la concentración de nutrientes se tomaron únicamente muestras en los meses de septiembre a noviembre del 2016 y de marzo y mayo del 2017. En general la concentración de nutrientes inorgánicos fue menor en la superficie que en la base de la termoclina.

3.2.1 Nitratos y nitritos ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$)

La concentración de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ en superficie en general presentó una distribución homogénea sin variaciones importantes entre temporadas de muestreo. En el verano las concentraciones en superficie fueron de 3.54 a 3.85 μM y de 3.34 a 4.16 μM en invierno. Este último valor fue la concentración máxima registrada en superficie. Existió una ligera disminución de la concentración durante los meses de septiembre a noviembre y posterior a este periodo se registró un incremento en meses siguientes. La mayor concentración de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ se registró en la estación costera E7 durante mayo mientras que la menor se pudo observar a inicio de invierno en la estación E1 (Fig. 8).

En profundidad (base de la termoclina y profundidad estándar), en contraste con la superficie, la distribución de los $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ fue heterogénea. Asimismo, la concentración de estos nutrientes fue mayor en la base de la termoclina que lo observado en la superficie. Se registraron concentraciones más altas de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ durante los meses de septiembre a octubre y éstas son menores en los meses de noviembre y mayo. En la base de la termoclina las estaciones dentro del Canal de Ballenas (E3-E5) y las estaciones costeras E6 y E7 presentaron una mayor concentración de nutrientes. Se registraron concentraciones mayores a los 5 μM de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ a finales del verano e inicios de invierno. En la estación E2 se registró la menor concentración (3.5 y 4.5 μM) de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ durante todo el periodo de muestreo (Fig. 9).

3.2.2 Amonio (NH_4)

De los análisis de la distribución superficial del amonio se observó que en septiembre se registró la concentración mínima de 0.04 μM . En los otros meses la concentración del amonio fue mayor con un máximo de 0.2 μM registrado en la estación costera E6. Por otra parte, la temporada de invierno

(noviembre y marzo) se caracterizó por presentar concentraciones de amonio menores con un intervalo de 0.01 y 0.08 μM . En mayo se presentó un ligero incremento en la concentración del amonio (0.1 μM) (Fig. 10).

En la base de la termoclina se presentó una mayor concentración de amonio respecto a la registrada en la superficie, pero con un mismo patrón estacional. Sin embargo, se detectó una distribución espacial heterogénea. En septiembre se registraron las concentraciones más altas de amonio en las estaciones E3 y E5 (0.15 y 0.12 μM , respectivamente). En octubre la concentración máxima de este nutriente se incrementa y se registró en las estaciones costeras E6 y E7 (0.25 μM). En invierno, las concentraciones de amonio son más bajas que en invierno y su distribución es más homogénea en el área de muestreo (~ 0.06 μM). En mayo la concentración del amonio aumenta ligeramente principalmente en las estaciones ubicadas en el Canal de Ballenas (Fig. 11).

3.2.3 Fosfatos (PO_4^{3-})

La concentración de fosfatos presentó una distribución superficial homogénea entre estaciones y poca variación entre las diferentes fechas de muestreo. A principios de verano se registraron las concentraciones de PO_4^{3-} más bajas (~ 0.5 μM), posteriormente en octubre se registraron concentraciones un poco más altas (hasta 0.8 μM). En el periodo de invierno (noviembre y marzo) se presentaron de nuevo concentraciones bajas y en mayo observó un pequeño incremento en la concentración de los fosfatos hasta alcanzar valores similares a los observados durante octubre (Fig. 12).

A diferencia de las concentraciones de fosfatos en superficie, en la base de la termoclina su distribución tanto espacial como temporal fue heterogénea. En septiembre, la concentración más alta de este nutriente se registró en dos estaciones ubicadas en el Canal de Ballenas (E3, 1.42 μM y E5, 1.29 μM). Después de este mes, se registraron valores menores en los meses posteriores y en marzo se registró una concentración de 0.77 μM . Al igual que otros nutrientes, durante mayo (mes de transición) la concentración de fosfatos es más alta y este aumento fue más evidente dentro del Canal de Ballenas (E5) (Fig. 13).

3.2.4 Silicatos (SiO_2)

La concentración promedio superficial de silicatos fue de aproximadamente $4 \mu\text{M}$ durante septiembre. Posteriormente, esta concentración es mayor en octubre en todas las estaciones de muestreo hasta alcanzar los $5 \mu\text{M}$. Los silicatos disminuyeron en los meses siguientes y en mayo presentaron un promedio de $4 \mu\text{M}$ (Fig. 14). En la base de la termoclina se observó el mismo patrón temporal registrado en la superficie. Sin embargo, se presentó una variación espacial marcada de la distribución de los silicatos. Las concentraciones más altas se registraron dentro del Canal de Ballenas, particularmente en la estación E5 ($4.74 \mu\text{M}$) (Fig. 15).

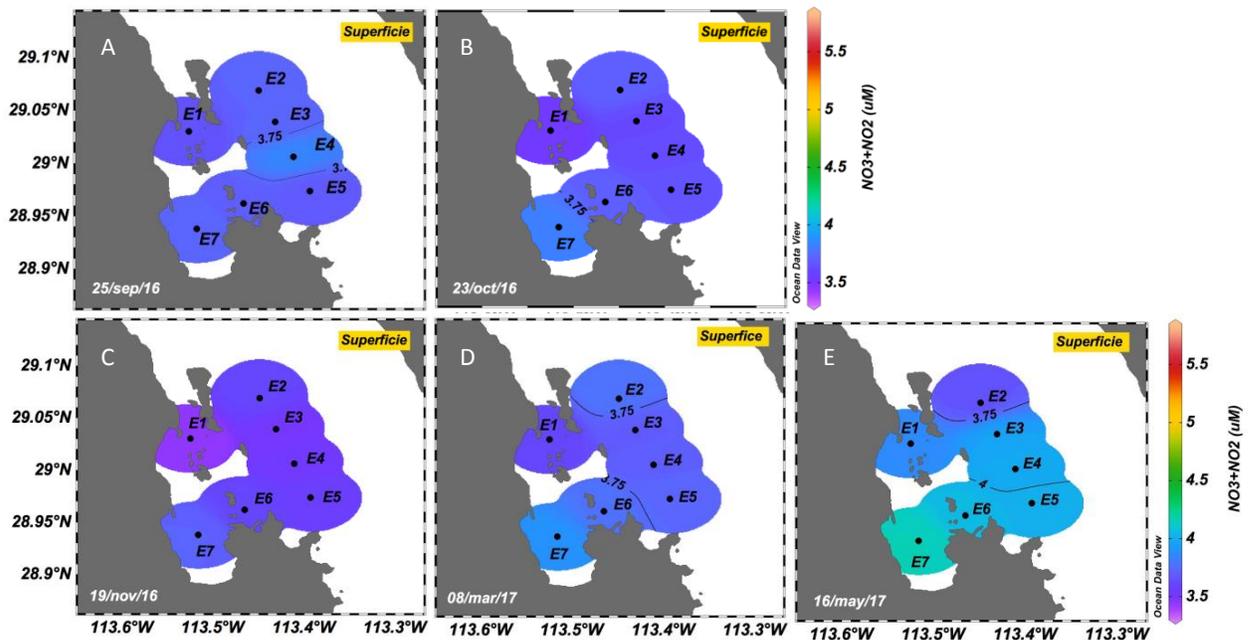


Figura 8. Distribución superficial de la concentración de NO_3+NO_2 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

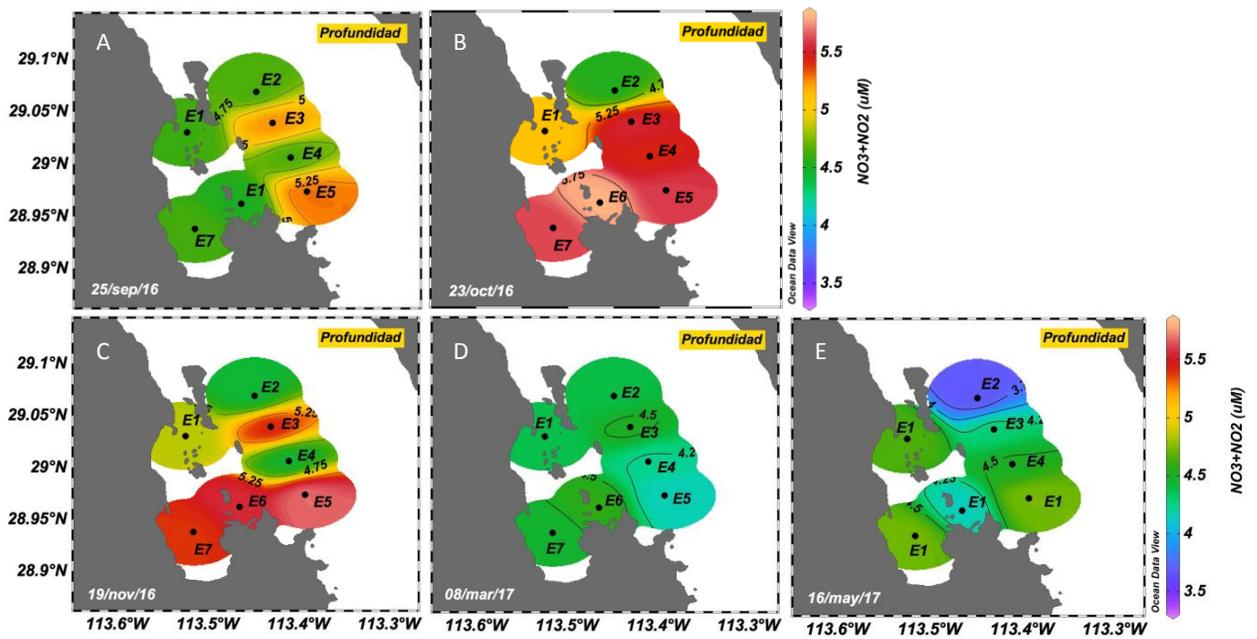


Figura 9. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de NO_3+NO_2 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

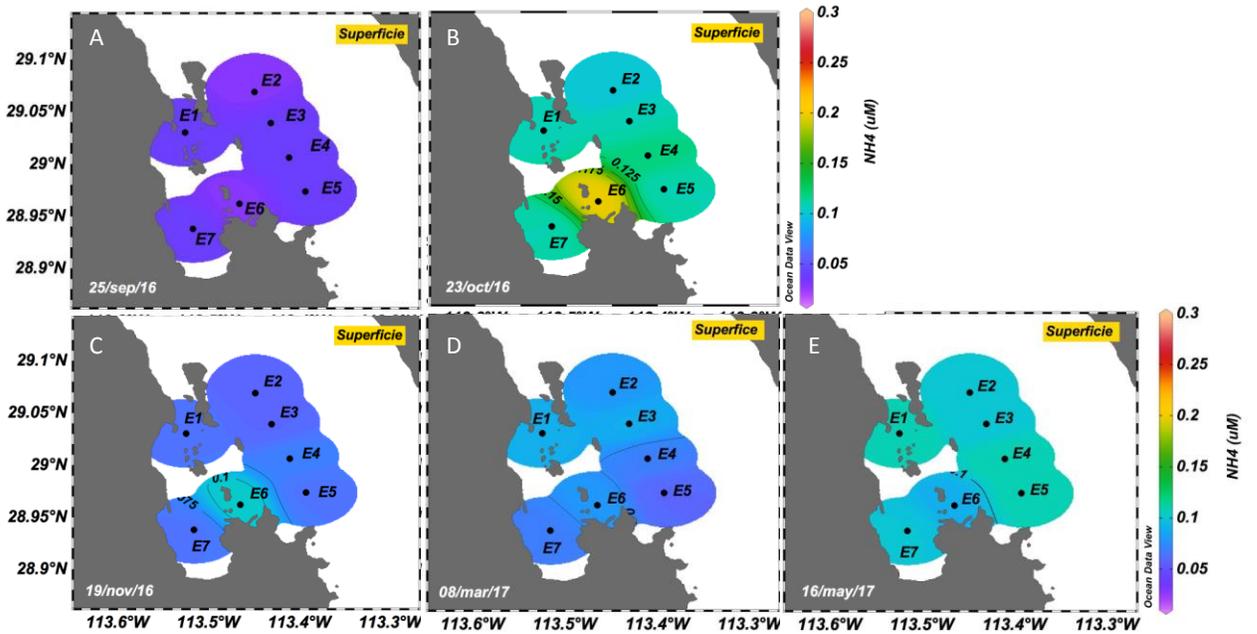


Figura 10. Distribución superficial de la concentración de NH_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

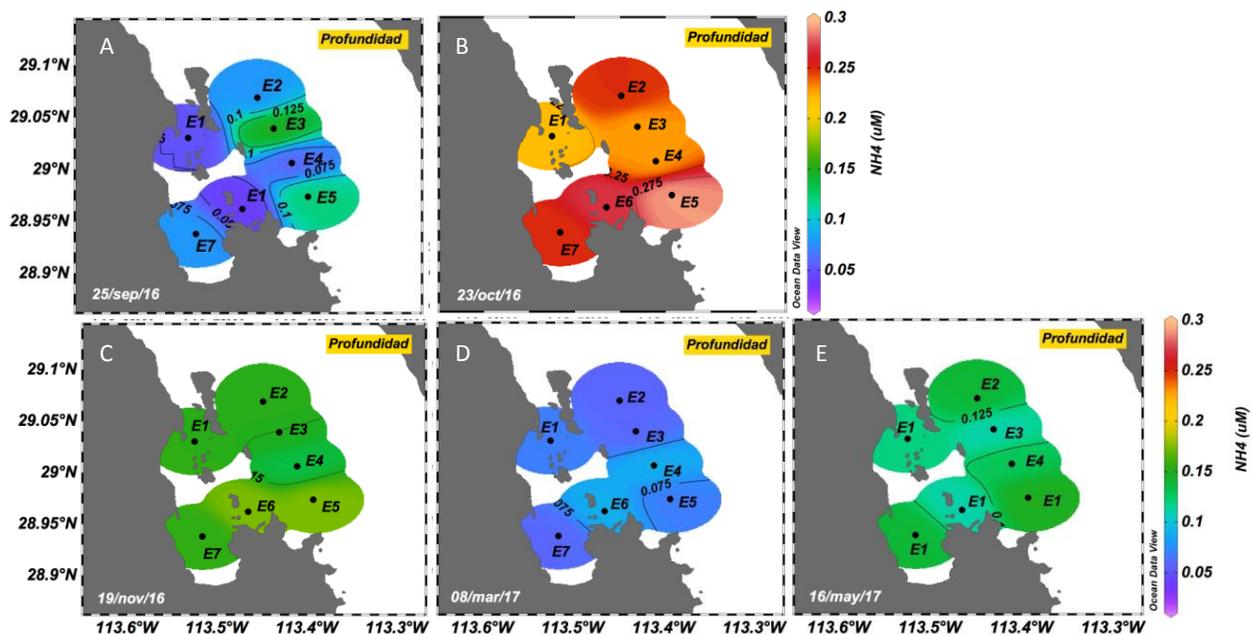


Figura 11. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de NH_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

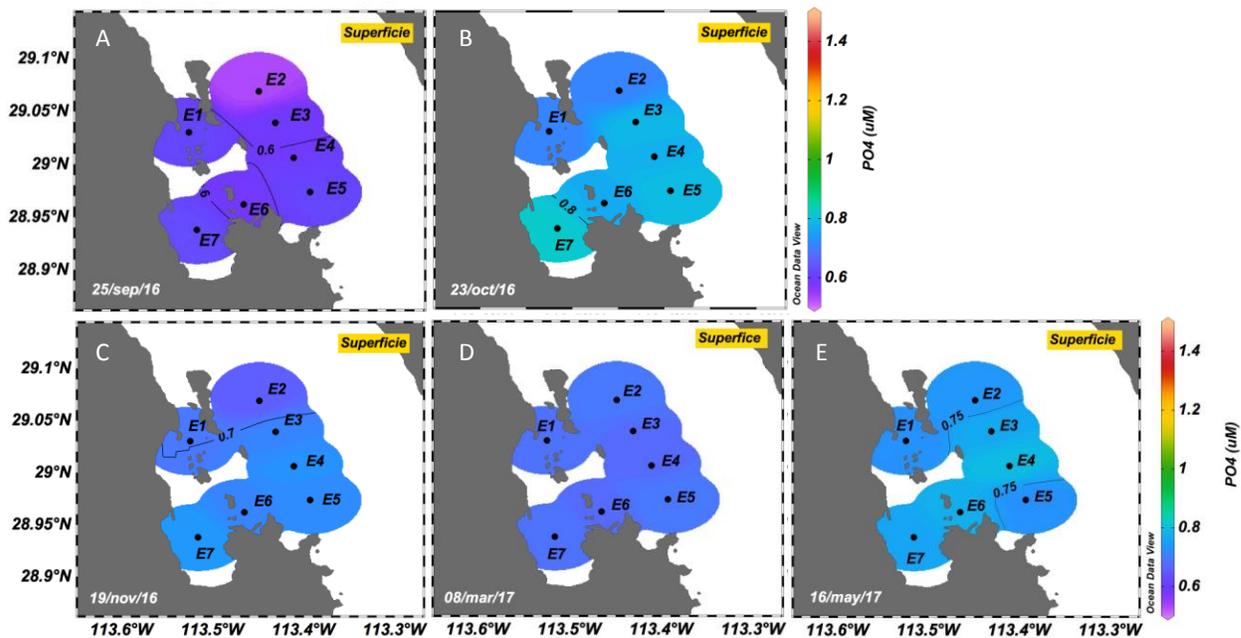


Figura 12. Distribución superficial de la concentración de PO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

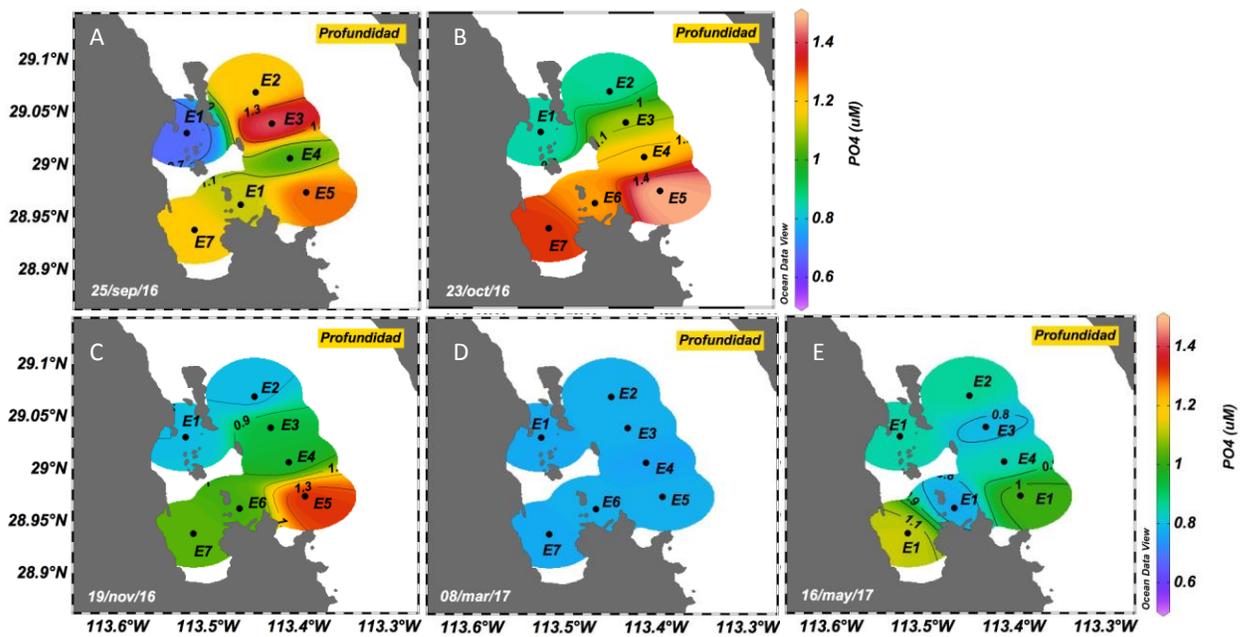


Figura 13. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de PO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

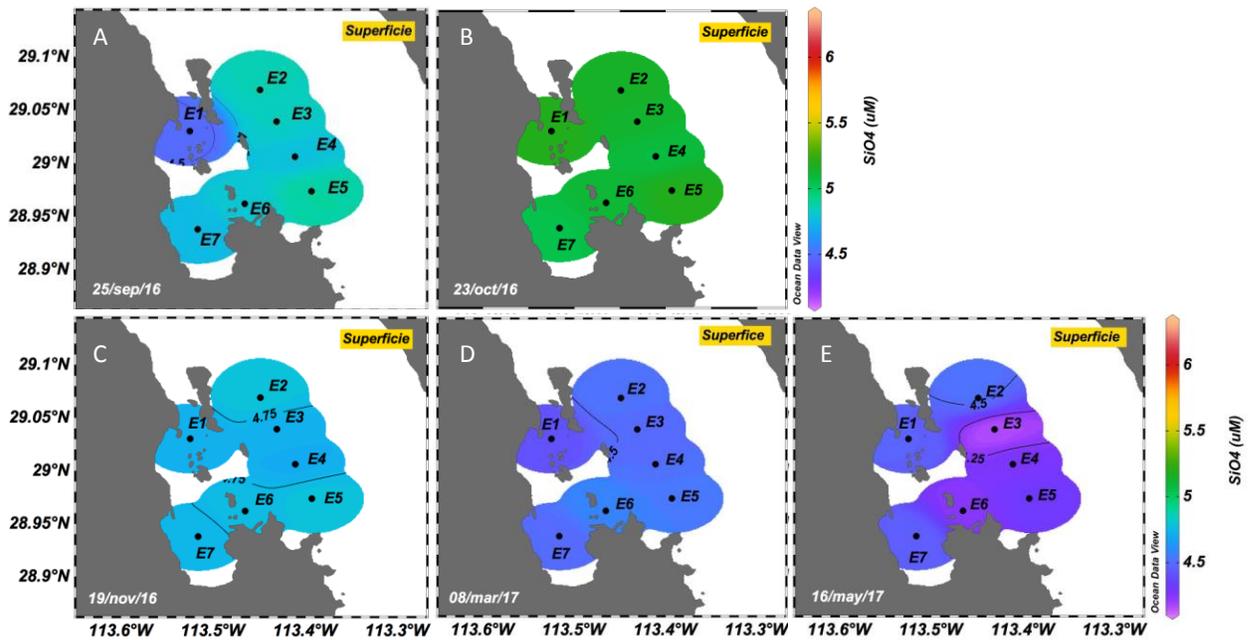


Figura 14. Distribución superficial de la concentración de SiO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

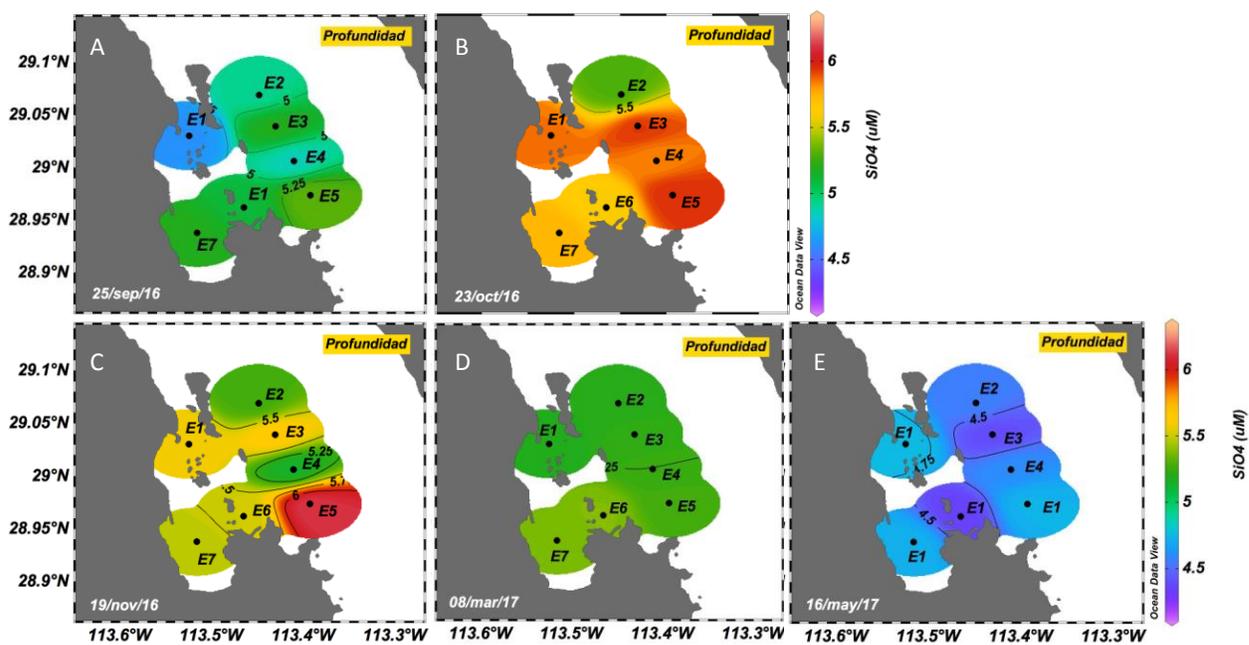


Figura 15. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de SiO_4 en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

3.3 Concentración de pigmentos fotosintéticos: Chl α

Se analizó el cambio espacio temporal de la concentración de la clorofila α (Chl α) como una aproximación de la biomasa fitoplanctónica, la cual se distribuyó heterogéneamente en la superficie y en la base de la termoclina. En superficie las concentraciones más altas de Chl α se registraron durante el periodo de verano. No se presentó un patrón homogéneo de la distribución de este pigmento durante este periodo y la acumulación espacial de biomasa fue variable para cada mes. Las concentraciones más altas se detectaron en la parte sur del interior de la bahía en la estación E7 en agosto y septiembre. En este último mes se presentó una concentración de hasta $4.2 \mu\text{g L}^{-1}$ y se detectó una concentración similar en la estación E4 del Canal de Ballenas. En octubre (final del verano) es en el único mes cuando en la estación al norte de la bahía (E1) se presentó una alta acumulación de Chl α respecto a las demás las estaciones con $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$. A inicios del periodo de invierno (noviembre), la biomasa fitoplanctónica fue homogénea dentro del Canal de Ballenas y se pudo observar que las mayores concentraciones de la biomasa se registraron en las estaciones costeras y la máxima en E7 ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$). En los meses de febrero y marzo la biomasa disminuyó y en general es homogénea en toda el área de muestreo, registrándose las menores concentraciones de

Chl *a* ($0.36 \mu\text{g L}^{-1}$) dentro del Canal de Ballenas. En el mes de transición se registró un incremento en la concentración de Chl *a*, alcanzando valores de hasta $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ en la E5 (Fig. 16).

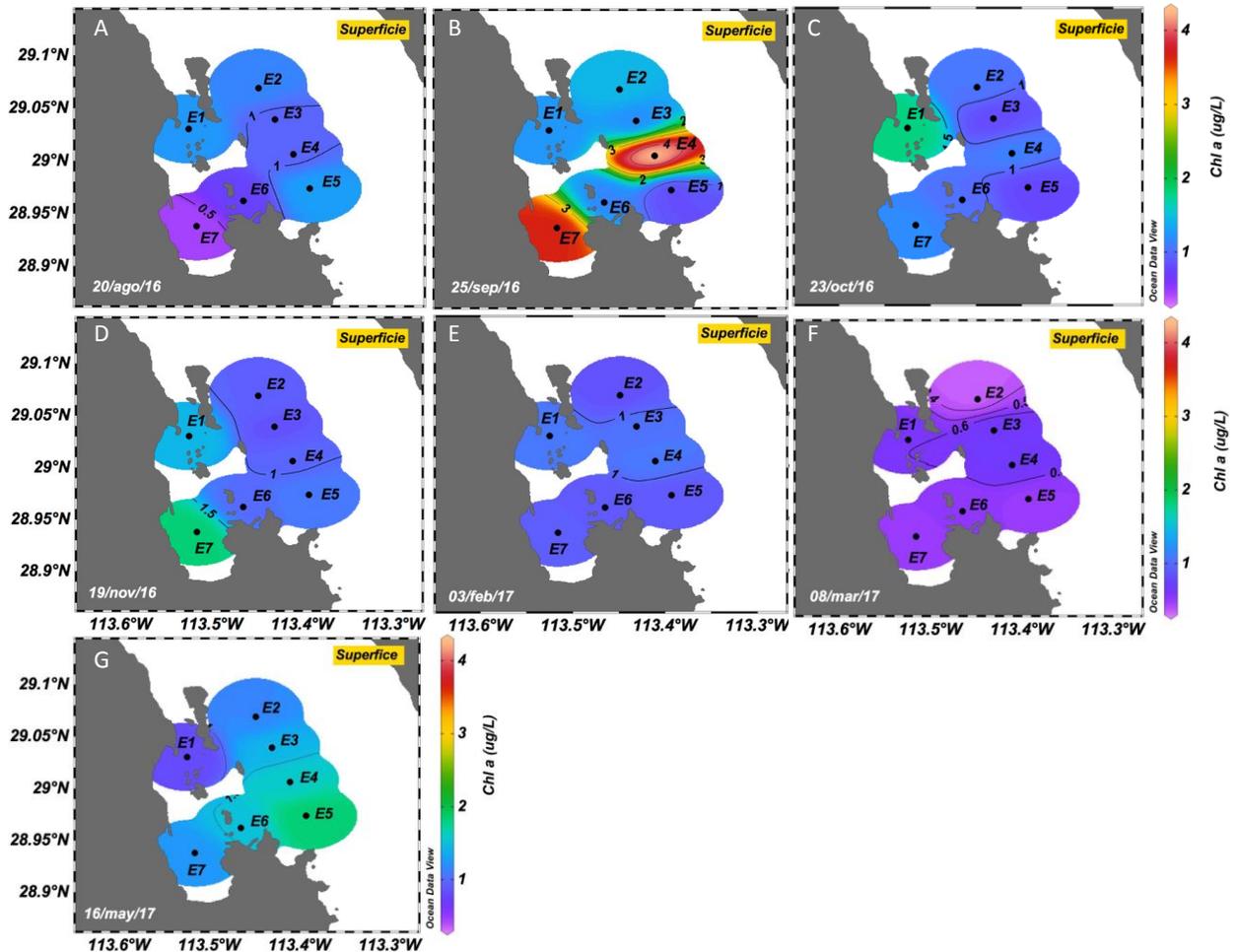


Figura 16. Distribución superficial de la concentración de Chl *a* en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

La distribución de la biomasa fitoplanctónica en la base de la termoclina fue diferente a lo observado en la superficie. En el periodo de verano, la mayor concentración de Chl *a* se presentó durante septiembre y octubre dentro de las estaciones E6, E4 y E7 con valores de Chl *a* de $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$, en contraste las menores concentraciones de Chl *a* para este periodo se registraron en agosto con valores de aproximadamente $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$. En los últimos meses del verano y los dos primeros meses de invierno la concentración de la biomasa fitoplanctónica fue similar dentro del Canal de Ballenas, con una concentración de Chl *a* de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Para invierno, se presentaron las concentraciones de Chl *a* más altas en las estaciones costeras E1 y E7 ubicadas dentro de la bahía con concentraciones similares a las registradas en condiciones de verano para la

superficie (hasta $4.0 \mu\text{g L}^{-1}$). En marzo se observa un ligero incremento en la biomasa del fitoplancton dentro del Canal de Ballenas, seguido por una disminución de la Chl *a* durante mayo en todas las estaciones de muestreo (Fig. 17).

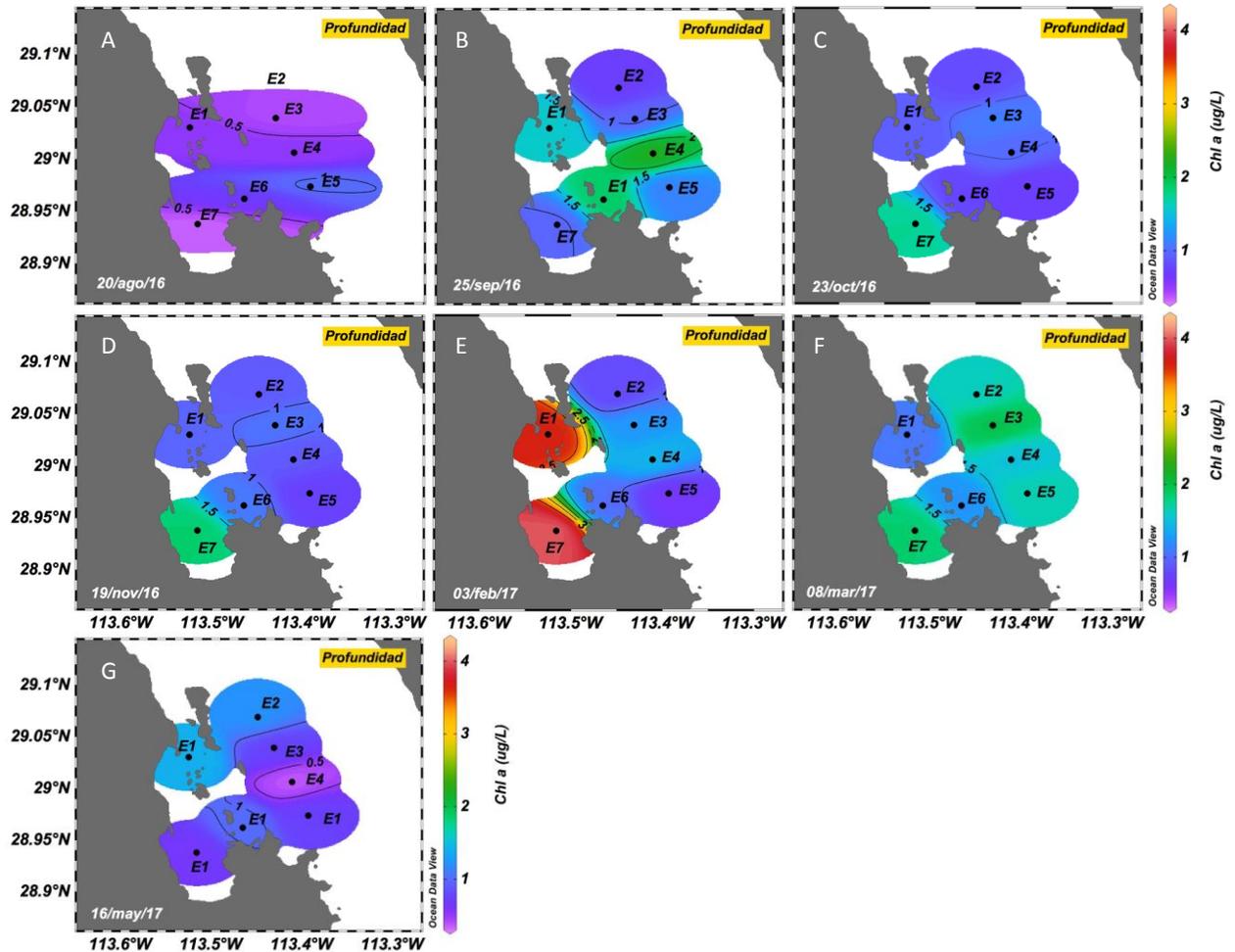


Figura 17. Distribución en la base de la termoclina de la concentración de Chl *a* en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-B) periodo de verano; (C-D) periodo de invierno; (E) mes de transición.

3.3.1 Concentración de otros pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos detectados en este estudio durante todo el periodo de muestreo y a todas las profundidades fueron: clorofila c_2 (Chl c_2), peridina (Per), 19'-butanoiloxifucocantina (19-But), fucoxantina (Fuc), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), zeaxantina (Zea), clorofila *b* (Chl *b*) y β -caroteno (β -caro). La concentración de dichos pigmentos se muestra en el Anexo 6.

Para la Zona de las Grandes Islas, los pigmentos con mayor concentración y presencia fueron la fucoxantina (pigmento presente en las diatomeas y otras cromofitas) y clorofila *b* (para euglenofitas). La concentración máxima de Fuc se observó durante el verano en la base de la termoclina ($1.65 \mu\text{g L}^{-1}$) y la menor concentración se encontró en la superficie durante el periodo de transición ($0.25 \mu\text{g L}^{-1}$). Este pigmento además de ser el más abundante también estuvo ampliamente distribuido tanto en el Canal de Ballenas como en las estaciones costeras. La concentración máxima de Chl *b*, el segundo pigmento más abundante en este estudio, se presentó durante el periodo de invierno en superficie ($0.41 \mu\text{g L}^{-1}$). La concentración mínima se detectó en el periodo de transición ($0.04 \mu\text{g L}^{-1}$) en la misma profundidad. El pigmento con menor concentración detectado durante este estudio fue la divinil clorofila *a* con concentraciones de hasta $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ (Anexo 6).

3.3.2 Quimiotaxonomía: Distribución de los grupos fitoplanctónicos con base en los pigmentos fotosintéticos registrados

En promedio, la contribución de los diferentes grupos de fitoplancton a la clorofila *a* total (Chl *a* T) en la Zona de las Grandes Islas se distribuyó de la siguiente manera: diatomeas (Fuc) 40%, euglenofitas (Chl *b*) 10%, dinoflagelados (Per) 5%, criptofitas (Allo) 5%, prasinofitas (Pras) 2%, cianofitas (Zea) 4% y prochlorofitas (DvChl *a*) 1.5%. El porcentaje restante se distribuyó entre otros pigmentos minoritarios.

Para este estudio, el grupo de las diatomeas (Fuc) tuvo el mayor aporte a la Chl *a* T, su contribución varió entre el 50% y 70% tanto en la capa superficial como en la base de la termoclina durante el verano. Posterior a este periodo, la contribución de este grupo disminuyó aportando del 20% al 40%, hasta finalmente alcanzar una contribución cercana al 10% durante el mes de transición.

Otros grupos del fitoplancton tuvieron una menor contribución a la Chl *a* T. En el caso de los dinoflagelados (Per) se registró que el máximo aporte a la Chl *a* T ocurrió durante el periodo de transición, alcanzando hasta el 20% en la capa superficial principalmente dentro de las estaciones costeras. Por su parte la contribución de las criptofitas (Allo) al total de la clorofila fue variable respecto al tiempo. Durante el verano la contribución de este grupo fue menor al 1%, sin embargo, el aporte de su pigmento marcador aumenta durante el invierno, alcanzando su máximo aporte en el periodo de transición (hasta 10%).

En este estudio, el aporte del picoplancton ($<2 \mu\text{m}$) o de las prochlorofitas a la Chl *a* T tanto en superficie

como en la base de la termoclina, fue de alrededor del 1%. La presencia de su pigmento marcador (Dv Chl a) se presentó principalmente en invierno y mes de transición en ambas profundidades (Fig. 18).

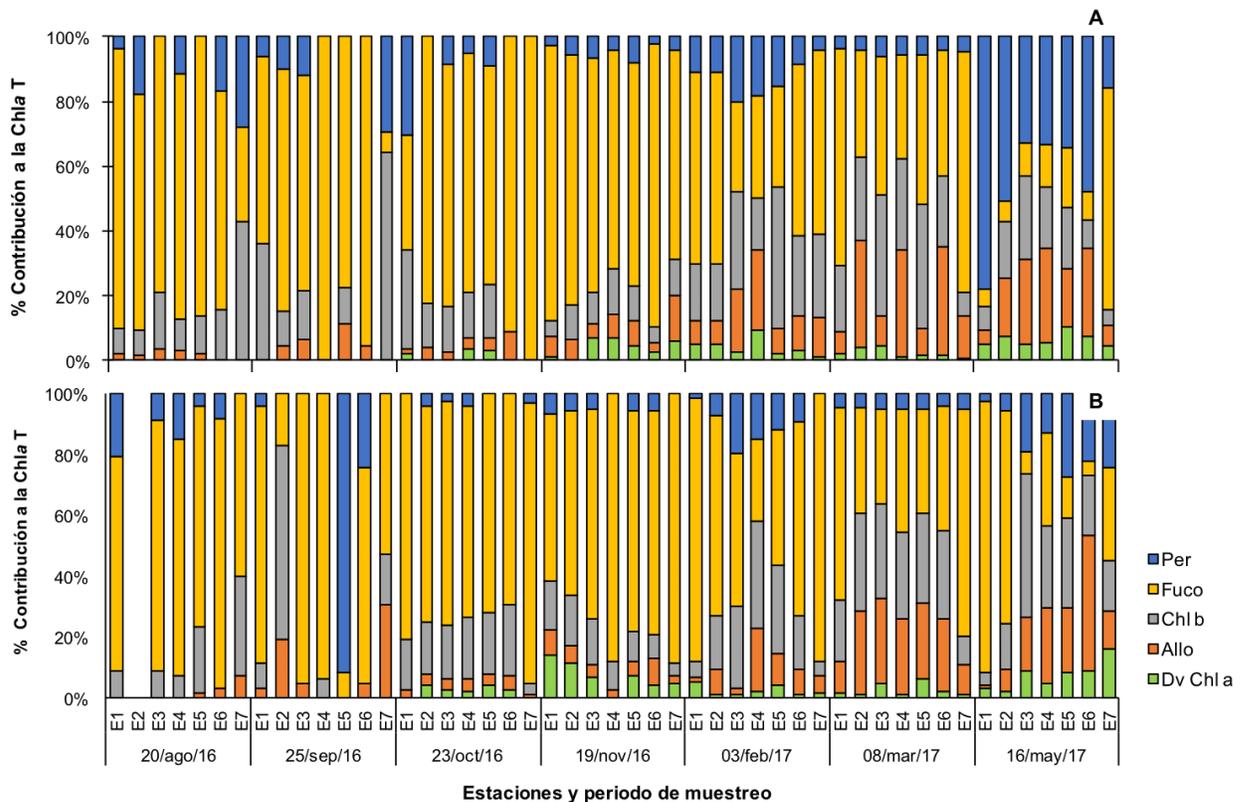


Figura 18. Contribución relativa de los pigmentos marcadores de los principales grupos de fitoplancton al total de la clorofila a (Chl a T) en (A) superficie y (B) base de la termoclina en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. Diatomeas (Fuc), euglenofitas (Chl b), dinoflagelados (Per), criptofitas (Allo) y prochlorofitas (DvChl a).

3.4 Análisis de la comunidad fitoplanctónica

3.4.1 Comunidad fitoplanctónica: Zona de las Grandes Islas

Se observó una clara variación estacional en la abundancia total (AT) del fitoplancton. El verano se caracterizó por altas abundancias de fitoplancton de entre 1×10^4 y 1.48×10^6 cel L^{-1} . En este periodo se registraron AT superiores al millón de cel L^{-1} tanto en la superficie como en la base de la termoclina en las estaciones E4 y E7 en el mes de septiembre (Fig. 19A-C y 20A-C).

El invierno se caracterizó por la disminución en la concentración de células de fitoplancton en ambas profundidades y en todas las estaciones de muestreo. La AT más baja del fitoplancton en este estudio se presentó en este periodo con registros en superficie de 7.70×10^2 cel L⁻¹ para el mes de febrero dentro del Canal de Ballenas (E5). En el mes de marzo (fin del invierno) la abundancia del fitoplancton fue más alta alcanzando una AT de 2.0×10^5 cel L⁻¹ en superficie (E7) (Fig. 19D-F y 20D-F). Mayo, mes de transición hacia las condiciones de verano, se caracterizó por un aumento en la AT del fitoplancton con abundancia celular de 1.29 a 2.6×10^6 cel L⁻¹ en tres estaciones ubicadas dentro del Canal de Ballenas (E4, E3, E6) y en la estación costera E7 ubicada dentro de la bahía (Fig. 19G y 20G).

La abundancia relativa de los distintos grupos de fitoplancton evaluada mediante microscopía concuerda con los resultados obtenidos mediante quimiotaxonomía. Las diatomeas (Bacillariophyta) fue el grupo de fitoplancton dominante tanto en superficie como en la base de la termoclina. El aporte de este grupo a la abundancia del fitoplancton fue de entre el 40 y 99% durante todo el periodo de estudio. En verano, la abundancia relativa (AR) de las diatomeas en superficie y base de la termoclina fue entre 50% y el 96%, el porcentaje restante (entre 4% y 50%) corresponde a los dinoflagelados (Dinophyta), mientras que otros grupos algales (Euglenophyta, Cryptophyta y Silicoflagelados) representaron <1% de la AT (Anexo 7).

En condiciones de invierno se registró una mayor diversidad de grupos fitoplanctónicos en ambas profundidades. Las cianobacterias (poco abundantes en verano) representaron hasta el 43% de la abundancia total en febrero, mientras que las euglenofitas contribuyeron entre 11 y 35%, la criptofitas el 14% y silicoflagelados alrededor del 6% (Anexo 7).

Pasado el invierno, en el mes de transición las diatomeas dominan de nuevo la comunidad fitoplanctónica, representando más del 90% a la abundancia total del fitoplancton (Anexo 7). En el Anexo 8 se muestran los géneros más abundantes de cada grupo fitoplanctónico para la ZGI.

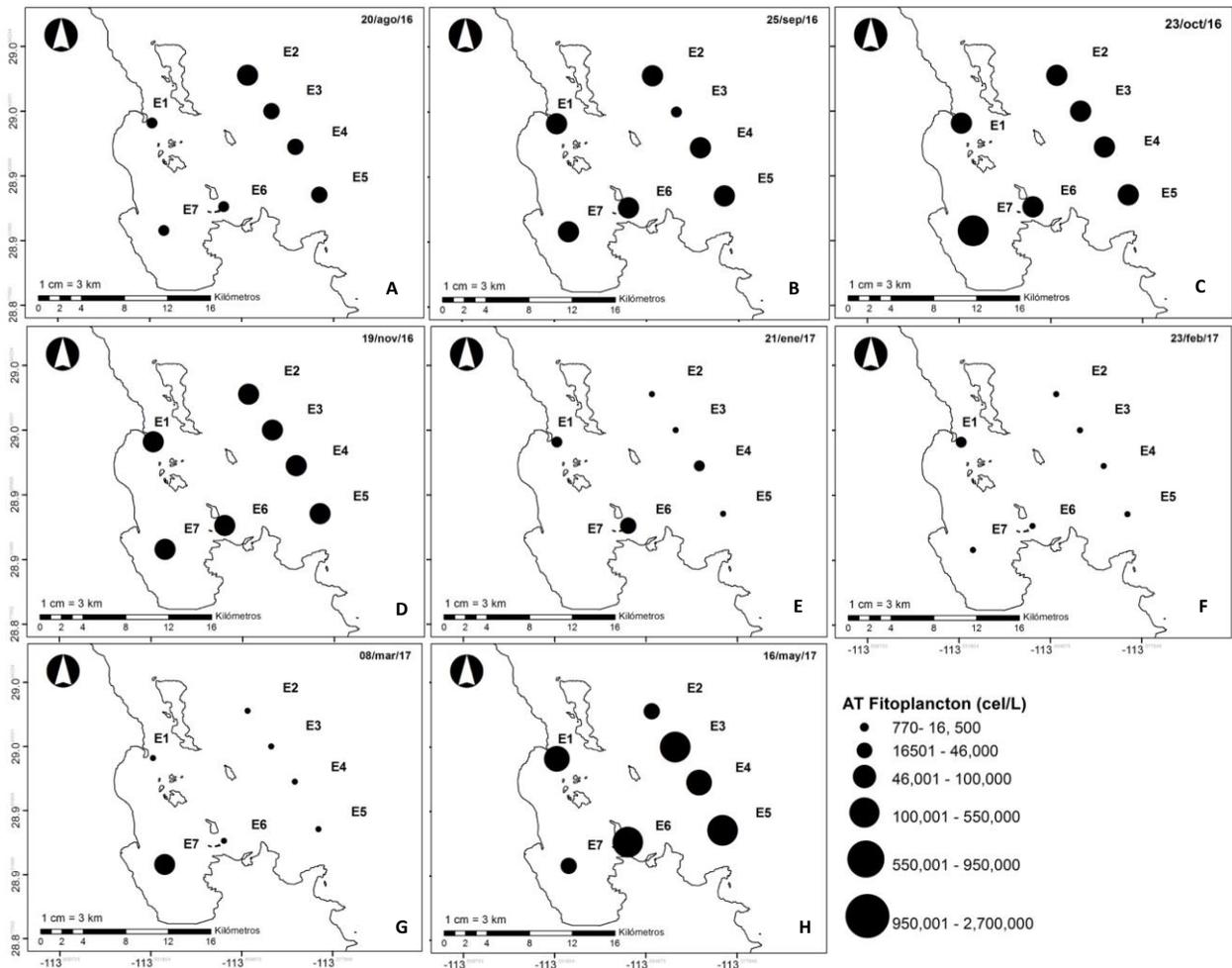


Figura 19. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en superficie para de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

3.4.2 Variación estacional de la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. de la Zona de las Grandes Islas

El género *Pseudo-nitzschia* estuvo presente en todas las muestras analizadas dentro de la Zona de las Grandes Islas, con un intervalo de abundancia celular de 1.8 a 3.12×10^5 cel L⁻¹. La abundancia de esta diatomea fue diferente en los tres periodos estacionales.

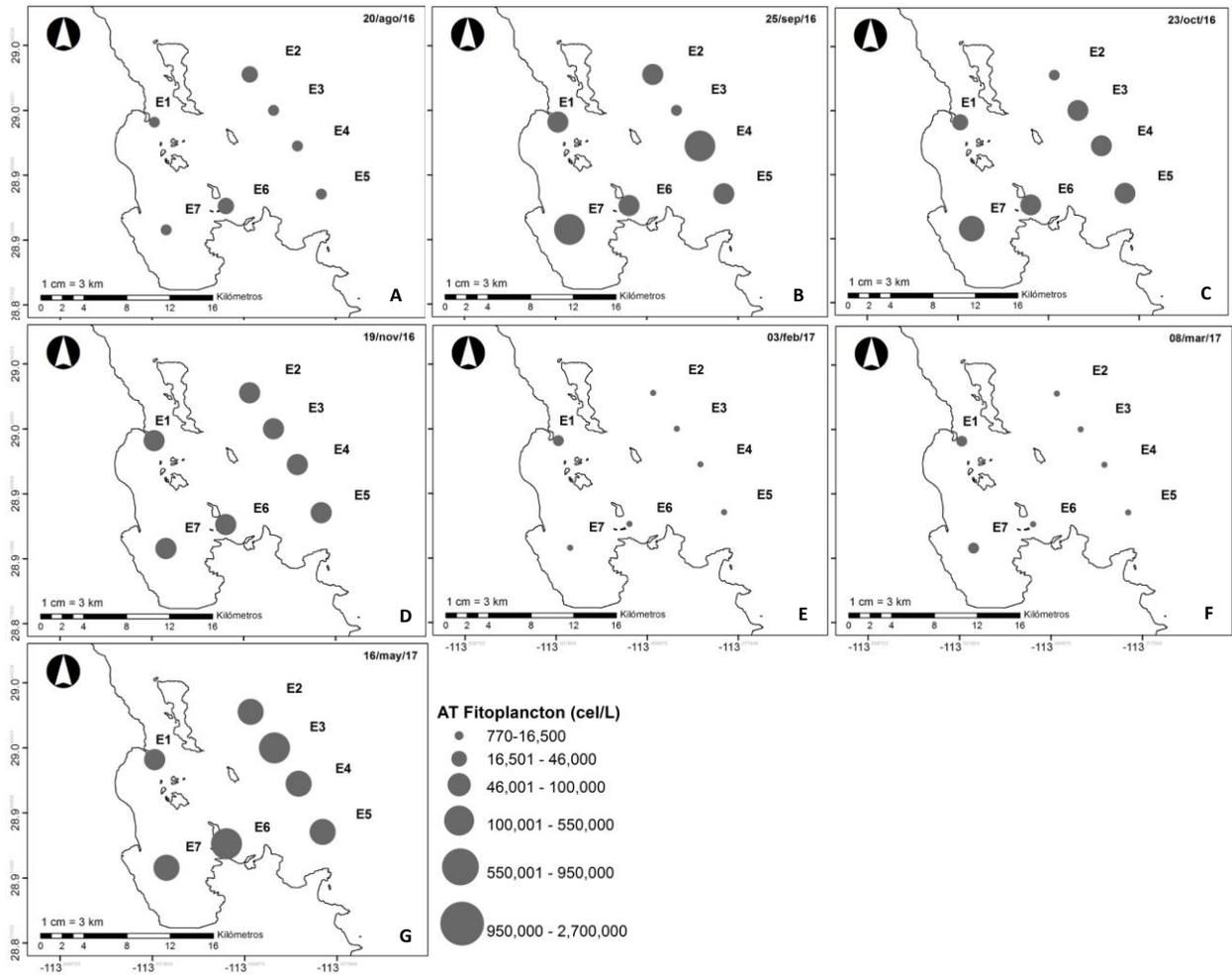


Figura 20. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.

En el verano, *Pseudo-nitzschia* alcanzó la mayor abundancia en la base de la termoclina ($> 1.5 \times 10^5$ cel L⁻¹) en las estaciones E4 y E7 durante septiembre y en la E7 en el mes de agosto en superficie (Fig. 21A-C y 22A-C). Posteriormente, en condiciones de invierno la abundancia celular de *Pseudo-nitzschia* disminuyó notablemente presentándose abundancias menores a 1×10^3 cel L⁻¹ en la mayoría de las estaciones y en ambas profundidades. Finalmente, en mayo la abundancia se incrementó en todas las estaciones de muestreo, tanto en superficie como en la base de la termoclina, alcanzando una abundancia mayor a las 1.5×10^5 cel L⁻¹ en la E5 ubicada dentro del Canal de Ballenas (superficie) y en la E7 cerca de la costa (base de la termoclina) (Fig. 21D-G y 22D-G).

El género *Pseudo-nitzschia* representó entre el 15 al 30% de la abundancia total de las diatomeas durante el verano, del 2 al 5% en invierno y del 5 al 10% durante mayo. Las mayores abundancias relativas de este género en relación al grupo de las diatomeas se registraron en las estaciones costeras (E1, E6 y E7). Asimismo, se observaron diferencias en la abundancia total (cel L⁻¹) y abundancia relativa (%) de *Pseudo-nitzschia* con la profundidad de muestreo, presentándose en la base de la termoclina una mayor abundancia de este género especialmente durante el verano.

Se identificaron al menos 7 morfotipos de *Pseudo-nitzschia* y de acuerdo a sus características se clasificaron como: *Pseudo-nitzschia* sp.1., *P. cf. delicatissima*, *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf pungens*, *Pseudo-nitzschia* sp.6 y *Pseudo-nitzschia* sp.2. La abundancia y distribución de estas especies fue variable respecto al tiempo. En el verano se registraron los 7 morfotipos de *Pseudo-nitzschia*. La mayor diversidad se observó en agosto tanto en la superficie como en la base de la termoclina. En este mes, *Pseudo-nitzschia* sp.1 y *P. cf pungens* presentaron la mayor contribución a la abundancia total del género *Pseudo-nitzschia* y se registraron en todas las estaciones en ambas profundidades.

Pseudo-nitzschia sp.1 representó en promedio el 30% a la AR del género y alcanzó una abundancia de 2.0 x 10⁵ cel L⁻¹ en la superficie dentro de la zona de costa (E7). *P. cf pungens* representó aproximadamente un 40% a la AR de *Pseudo-nitzschia* y fue más abundante en la base de la termoclina con una abundancia de 1.4 x 10⁵ cel L⁻¹ en la estación E4 en el Canal de Ballenas. El resto de las especies de *Pseudo-nitzschia* estuvieron presentes en concentraciones menores (<50 cel L⁻¹) y *P. americana* fue una especie rara que sólo se registró en agosto, en la superficie y en estaciones ubicadas dentro del Canal de Ballenas (E3 y E5) en bajas concentraciones (<10 cel L⁻¹) (Fig. 23A-C y Fig. 24A-C)

En invierno, la composición de la comunidad de *Pseudo-nitzschia* fue diferente a lo observado durante el verano. En noviembre se presentó una alta diversidad del género, encontrándose los 7 morfotipos en ambas profundidades, este mes *P. americana* y *P. cf. delicatissima* que fueron raras durante verano, estuvieron más representadas en todas las estaciones, alcanzando abundancias de 6.3 x 10³ y 1.6 x 10⁴ cel L⁻¹, respectivamente. En meses posteriores la diversidad de *Pseudo-nitzschia* disminuye considerablemente presentándose pocas especies y por lo tanto representan un porcentaje alto de la abundancia total *Pseudo-nitzschia*. Durante enero, en superficie *P. americana* y *P. cf. pungens* fueron las especies mayormente representadas en todas las estaciones de muestreo.

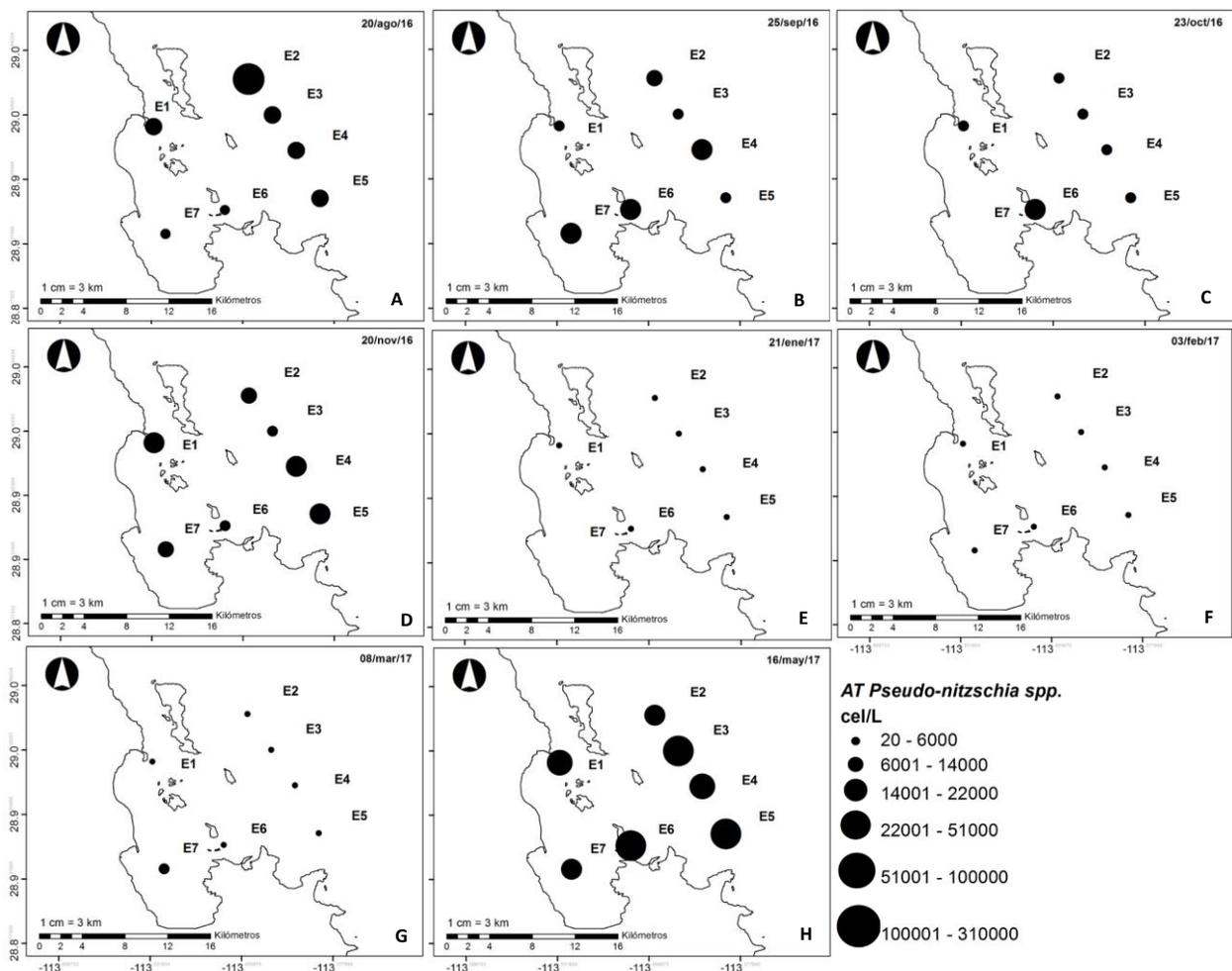


Figura 21. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de *Pseudo-nitzschia* spp. en superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

En febrero y marzo la comunidad de *Pseudo-nitzschia* fue dominada por *P. americana* con una abundancia máxima de 5.8×10^3 cel L⁻¹. Esta especie llegó a representar casi el 100% del género, mientras que *P. cf. pungens* que fue muy abundante durante verano comenzó a presentarse con abundancias menores a 200 cel L⁻¹ y especies raras como *Pseudo-nitzschia* sp.6 se registraron en superficie en estaciones costeras (E1, <100 cel L⁻¹) (Fig. 23D-G y 24D-F).

Finalmente, en el mes de transición (mayo) la diversidad de *Pseudo-nitzschia* se incrementó. La abundancia de *Pseudo-nitzschia* sp.1 y *P. cf. pungens* aumentó incrementando a un 30% y 15% su representación en el género, respectivamente (Fig. 29H y 30G). En este mes, *Pseudo-nitzschia* sp.6 se registró en todas las

estaciones y en ambas profundidades, llegando a representar en promedio el 15% de AT de *Pseudo-nitzschia*. La representación de esta especie en otros meses anteriores fue mucho más baja. *P. multistrata* y *Pseudo-nitzschia* sp.2 fueron especies poco comunes y se presentaron en bajas abundancias.

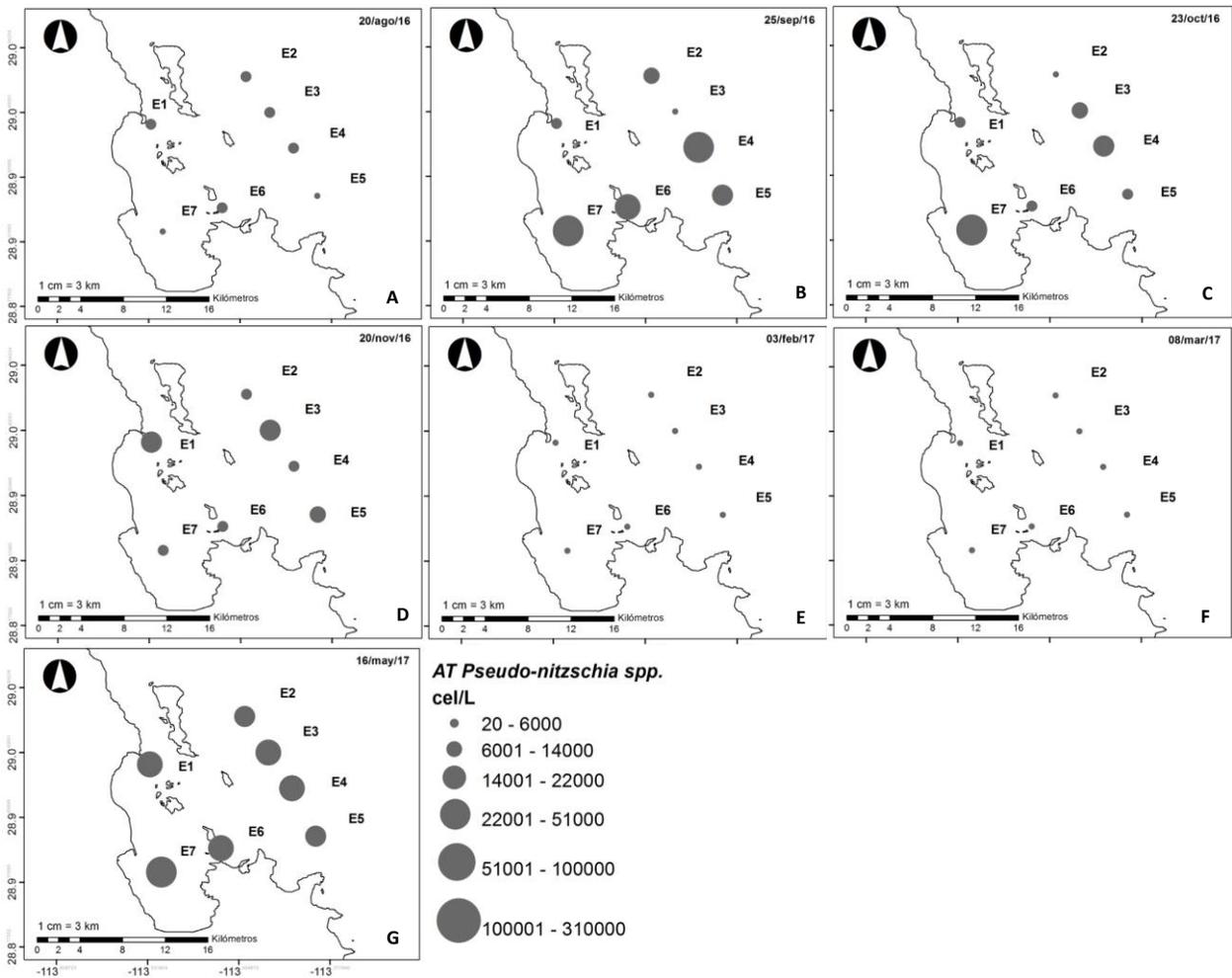


Figura 22. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de *Pseudo-nitzschia* spp. en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.

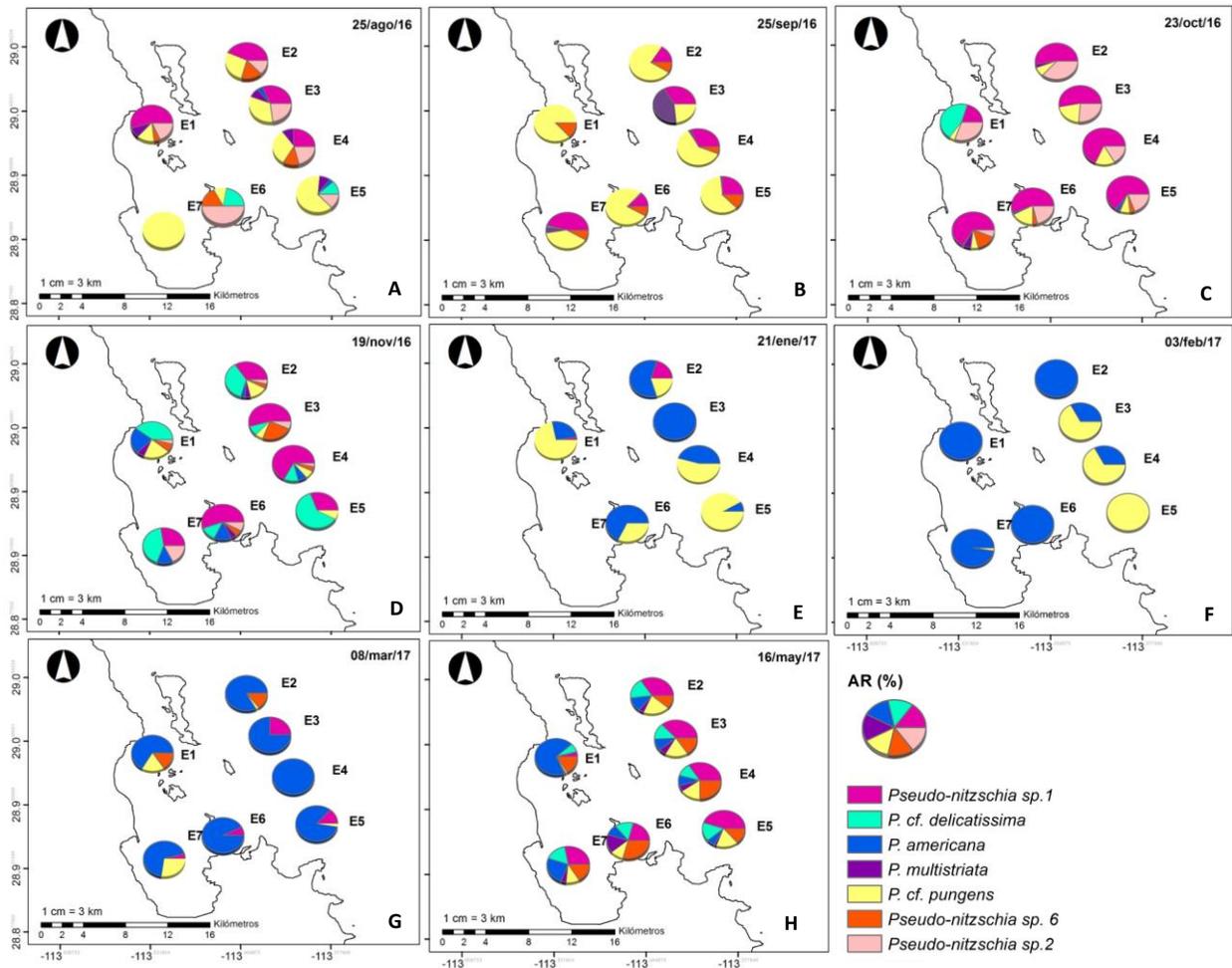


Figura 23. Variación espacial y temporal de los morfotipos de *Pseudo-nitzschia* presentes en la superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

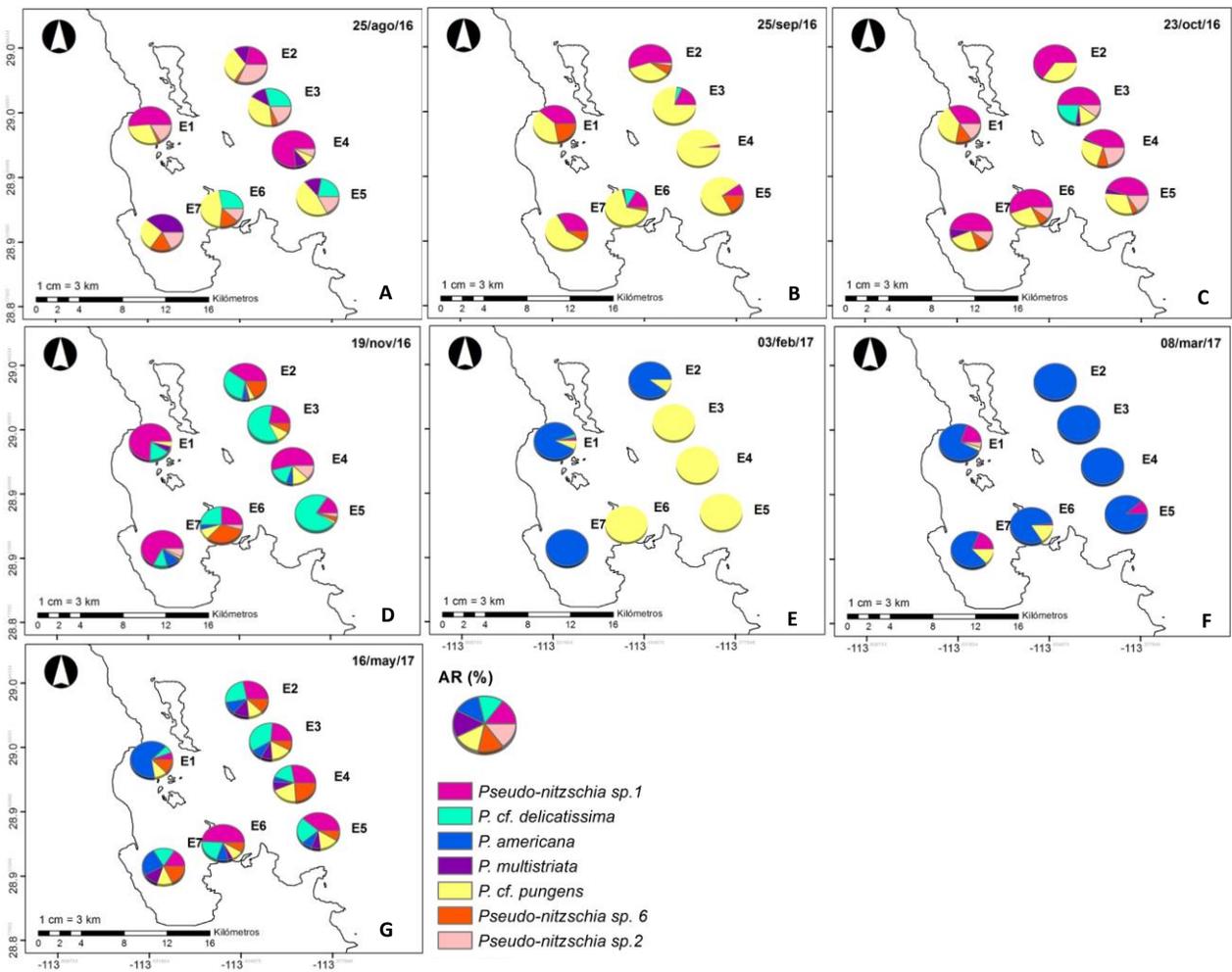


Figura 24. Variación espacial y temporal de los morfotipos de *Pseudo-nitzschia* presentes en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

3.4.3 Relación entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. y parámetros ambientales en la ZGI

El análisis de componentes principales (ACP) indica que en la base de la termoclina las concentraciones de nutrientes fueron las variables ambientales que estuvieron relacionadas a las mayores abundancias celulares de la comunidad de *Pseudo-nitzschia*, mientras que en la superficie dicha abundancia se relacionó con la temperatura. El ACP generó cinco Eigenvalores, los dos primeros explicaron el 82% de la varianza del conjunto de datos. El componente 1 (CP1) representó el 52.5% de la varianza total y corresponde principalmente a la concentración de nutrientes inorgánicos: Nitratos más Nitritos ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), Amonio (NH_4), Fosfatos (PO_4^{3-}) y Silicatos (SiO_2) (Anexo 9). La dispersión de los puntos observada

sobre el CP1 estuvo relacionada con el incremento en las concentraciones de NH_4 , PO_4^{3-} y SiO_2 registrado al finalizar el verano e inicios de invierno en la base de la termoclina. Este incremento estuvo correlacionado positivamente con la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. en la misma profundidad principalmente en las estaciones ubicadas dentro del Canal de Ballenas (Grupo 2) (Fig.25).

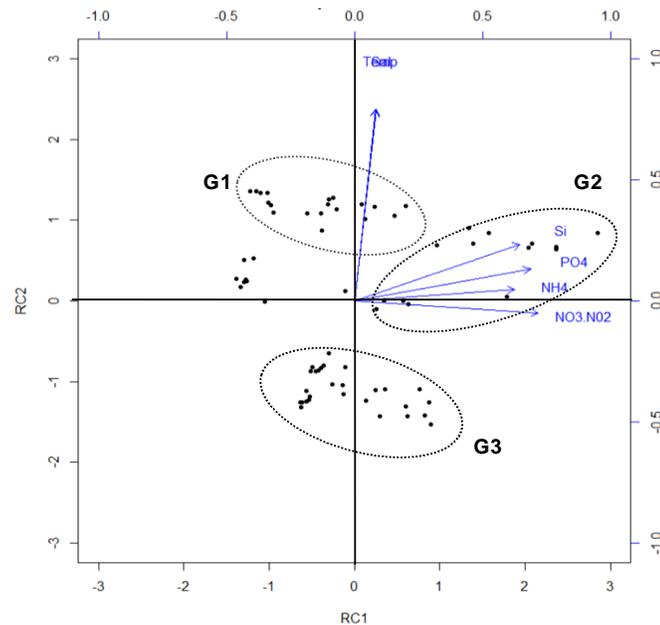


Figura 25. Resultados del análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. y variables ambientales en la Zona de las Grandes Islas. El grupo 1 (**G1**) representa datos de las estaciones E1 a E7 0m del 25-sep y 23-oct-2016; (**G2**) representa datos de las estaciones E2 a E5 base de la termoclina del 25-sep y 23-oct-2016; (**G3**) E1 a E7 0m y base de la termoclina del 08-mar y 16-may-2017.

El segundo componente (CP2) representó el 29.5% de la varianza y se relacionó al aumento en la temperatura y la salinidad (Anexo 8). Sobre este componente se observó una correlación positiva entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. y la temperatura en la capa superficial de la columna de agua durante el verano (Grupo 1). Al finalizar el invierno y durante el periodo de transición la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. en superficie tuvo una correlación negativa con el CP2 y una correlación positiva con el CP1 en la base de la termoclina (Grupo 3) (Fig. 25).

3.5 Concentración de Ácido Domoico en material particulado (pAD) en la ZGI

Se detectó ácido domoico en material particulado (pAD) en bajas concentraciones únicamente en los meses de verano y posteriormente durante el mes de transición. En esos meses se presentaron abundancias de *Pseudo-nitzschia* spp. superiores a las 1.0×10^5 cel L⁻¹. La concentración de pAD fue diferente entre las estaciones de muestreo y en la profundidad lo que está relacionado a la AT de *Pseudo-nitzschia*.

En superficie se detectaron concentraciones de pAD entre 0.02 y 87.79 ng AD L⁻¹. Las concentraciones máximas en septiembre se registraron en la E4 ubicada dentro del Canal de Ballenas (27.39 ng AD L⁻¹) y en la E7 ubicada cerca de la zona costera (22.35 ng AD L⁻¹). Al finalizar el verano (octubre), la concentración de pAD fue menor en la mayoría de las estaciones con concentraciones menores a 1 ng AD L⁻¹. En la estación E7 se detectaron 87.79 ng AD L⁻¹, el valor máximo de pAD par este mes. Finalmente, durante mes de transición se detectó también pAD con un valor máximo de 3.72 ng AD L⁻¹ en la E5 (Fig. 26).

En la base de la termoclina el intervalo de pAD fue de 0.39 a 88.50 AD L⁻¹. En el verano la concentración de pAD fue mayor a la encontrada en la capa superficial, con concentraciones máximas de 88.50 y 53.20 ng AD L⁻¹ para las estaciones E4 y E7, respectivamente. En octubre, la concentración máxima de pAD se presentó en la estación costera E7 (24.06 ng AD L⁻¹) y en el resto de las estaciones el pAD fue de aproximadamente 1 ng AD L⁻¹. Para el mes de transición la concentración mínima y máxima fueron de 0.60 (E2) y 1.27 (E5) ng AD L⁻¹, respectivamente (Fig. 26).

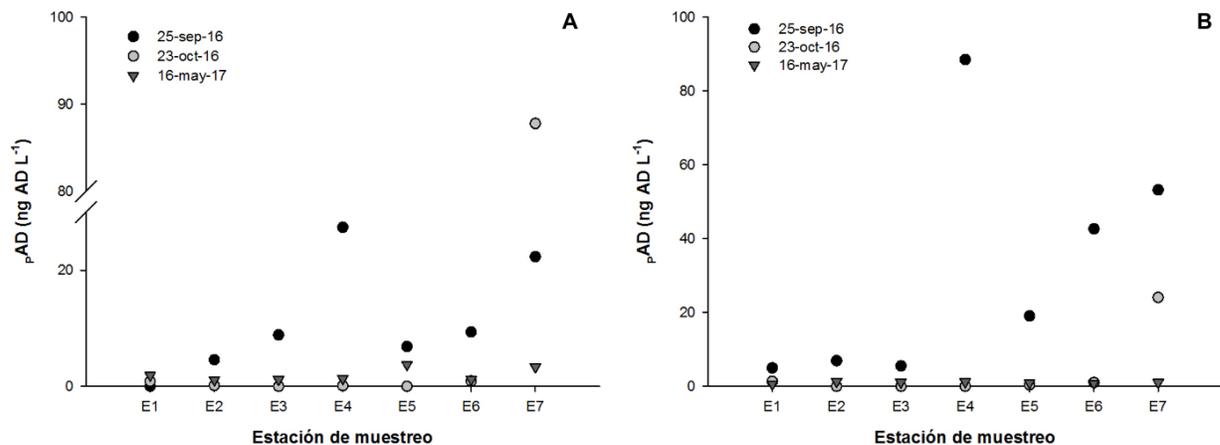


Figura 26. Concentración de ácido domoico en material particulado (pAD) para la ZGI (A) superficie y (B) base de la termoclina.

3.5.1 Ácido domoico en material particulado y abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. en la ZGI

La concentración de ρ AD estuvo correlacionada con la abundancia de células de *Pseudo-nitzschia* spp. en la Zona de las Grandes Islas. Las mayores concentraciones de ácido domoico se observaron durante los meses de septiembre y octubre (verano). Se detectaron concentraciones de AD de 90 ng AD L⁻¹ en estos meses y la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. fue mayor a 3.0×10^5 cel L⁻¹ ($r=0.92$ Fig. 27A).

Se evaluó la relación de ρ AD con la abundancia de cada morfotipo encontrado. La relación con la abundancia de *P. cf. pungens* presentó el r^2 más alto ($r^2= 0.85$) de todas las relaciones analizadas. Este morfotipo contribuyó con un 40% de la AT del género durante verano (Fig. 27B). Además, se determinó a partir de la pendiente resultante de regresión lineal que *Pseudo-nitzschia cf. pungens* produce 0.55 pg AD cel⁻¹.

En el mes de transición no se encontró una relación lineal entre la concentración de la toxina y la abundancia celular de *Pseudo-nitzschia* spp. o de alguno de sus morfotipos (Fig. 27B).

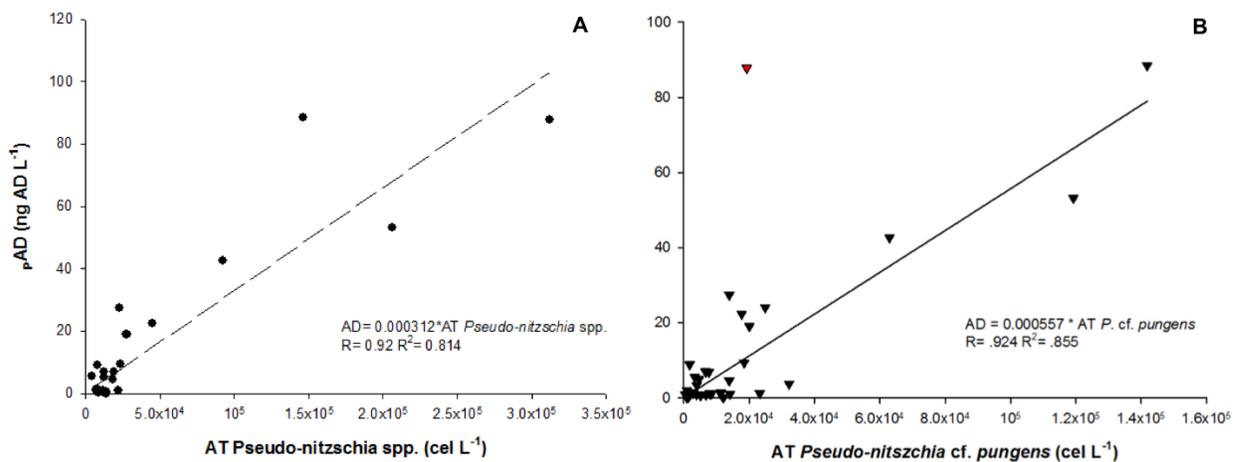


Figura 27. (A) Relación entre la concentración de ácido domoico en material particulado (ρ AD) y la abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. septiembre y octubre; (B) Regresión lineal ρ AD vs AT *Pseudo-nitzschia cf. pungens*. El triángulo rojo representa a los datos del mes de mayo que fueron excluidos de la regresión.

3.6 Comunidad fitoplanctónica: Alto Golfo de California

En esta zona de muestreo la abundancia total fitoplanctónica fue menor a la registrada en la ZGI, el intervalo de abundancia del fitoplancton fue de 7.5×10^3 a 3.8×10^5 cel L⁻¹, para el Alto Golfo de California. Así mismo, no se logró observar el mismo patrón estacional encontrado para la ZGI.

La máxima densidad celular se registró al comenzar el periodo de muestreo con 3.8×10^5 cel L⁻¹. En los meses subsecuentes la abundancia del fitoplancton fue menor con abundancias menores a las 2.5×10^3 cel L⁻¹ (Fig. 28).

En el AGC se observó un cambio en la comunidad fitoplanctónica a través del tiempo. A inicios del periodo de muestreo (agosto) el grupo algal dominante fue el de las cianobacterias (Cyanobacteria) representando el 80% de AR. Posteriormente, la AR de las cianobacterias disminuye y la contribución de las diatomeas aumentó hasta llegar a ser el grupo algal dominante (>80% AR). En los siguientes meses (octubre a diciembre) las diatomeas aportaron más del 50% a la abundancia total y otros grupos algales como el de los dinoflagelados aportaron entre el 30 y 40%, y las Euglenas y los silicoflagelados aportaron <5% a la abundancia total del fitoplancton (Anexo 10). En el Anexo 8 se muestran los géneros más abundantes de los grupos fitoplanctónicos para el AGC.

3.6.1 Variación estacional de la abundancia y diversidad morfológica de *Pseudo-nitzschia* spp.

El género *Pseudo-nitzschia* estuvo presente en todas las muestras analizadas del AGC. La abundancia de este género fue de 35 cel L⁻¹ como mínimo y 6.4×10^3 cel L⁻¹ como máximo. En general, las abundancias fueron más altas en agosto y se observó una disminución en la abundancia en los meses subsecuentes hasta registrar el valor mínimo en mayo. El género *Pseudo-nitzschia* representó en promedio el 10% de las diatomeas (Fig. 29).

Para el AGC se detectaron tres morfotipos de *Pseudo-nitzschia*, ya descritos en para la ZGI: *Pseudo-nitzschia* sp. 1, *P. cf. delicatissima* y *Pseudo-nitzschia* sp. 6. El morfotipo más abundante fue *Pseudo-nitzschia* sp. 1 que estuvo presente durante todo el monitoreo y la abundancia mayor en agosto (4.0×10^3 cel L⁻¹). Los otros morfotipos se presentaron con una frecuencia menor y en abundancias menores en esta área de estudio (Fig. 30).

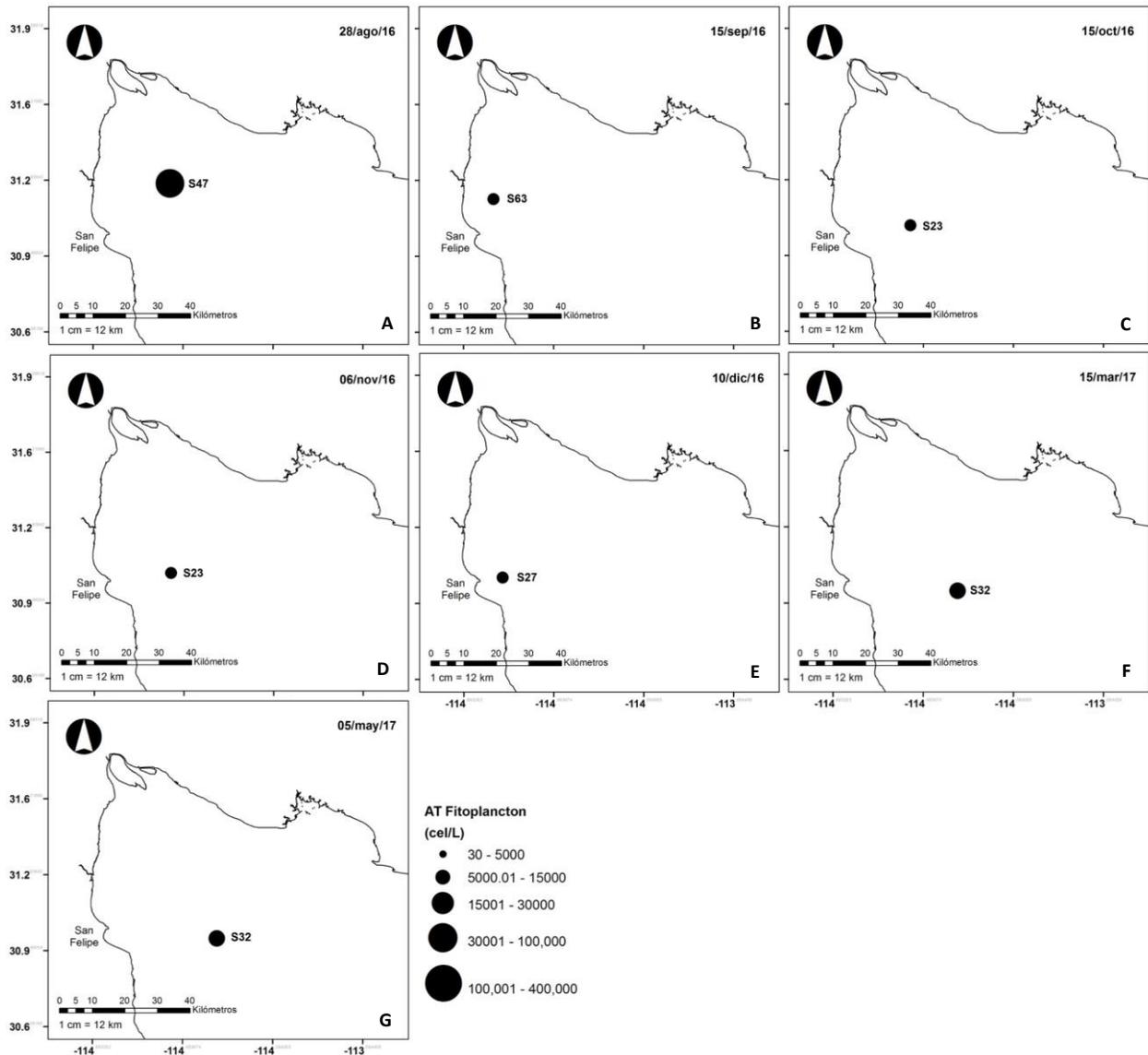


Figura 28. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) del fitoplancton en superficie para el Alto golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

El AGC presenta alta dinámica y existe resuspensión continua de sedimentos, por lo que es importante mencionar que las muestras de fitoplancton del AGC presentaban materia orgánica en abundancia, lo que dificultó los conteos celulares y no permitieron apreciar a detalle las células de fitoplancton de tamaño pequeño. Por lo tanto, los resultados presentados para esta zona se deben considerar como una aproximación solamente de la biomasa fitoplanctónica (incluyendo a *Pseudo-nitzschia*).

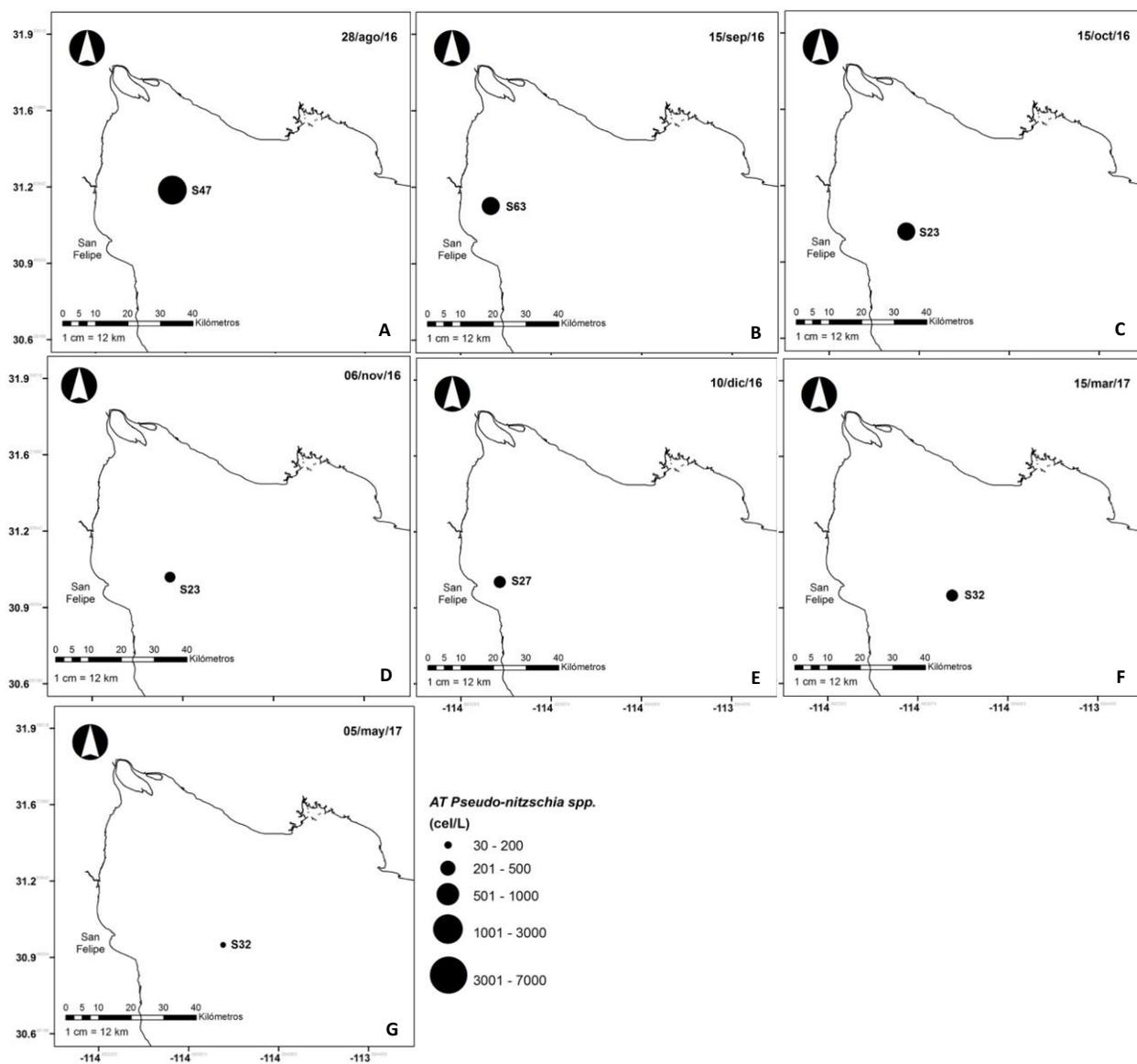


Figura 29. Variación espacial y temporal de la abundancia total (AT) de *Pseudo-nitzschia* spp. en el Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

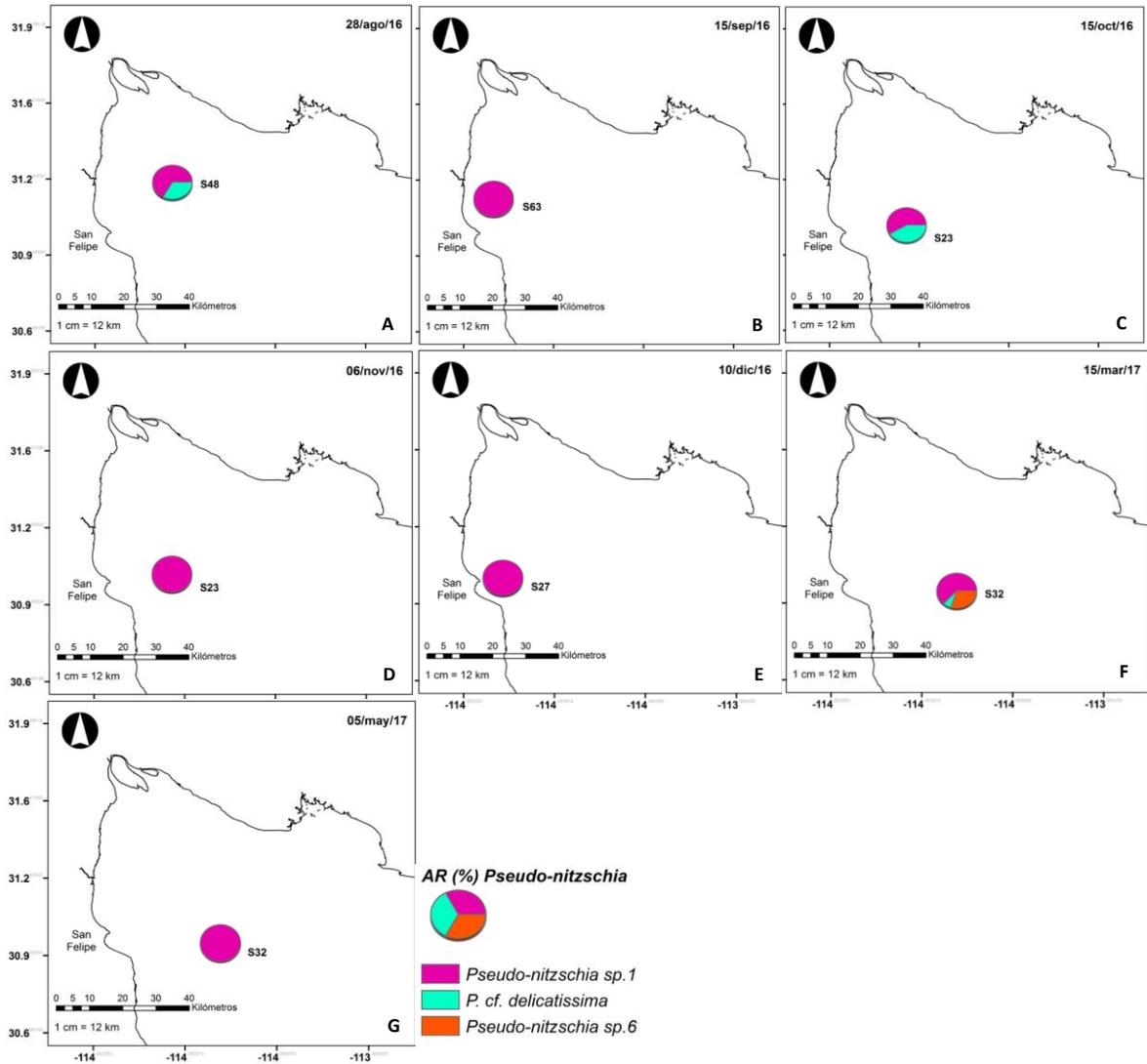


Figura 30. Variación espacial y temporal de los morfotipos de *Pseudo-nitzschia* presentes en la superficie para el Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-F) periodo de invierno, (G) mes de transición.

3.7 Caracterización e identificación morfológica de *Pseudo-nitzschia* spp.

Se establecieron cultivos de cinco cepas de *Pseudo-nitzschia* (Pn1BLA, Pn2BLA, Pn5BLA, Pn6BLA y Pn8BLA) de células aisladas de muestras de la Zona de las Grandes Islas. Asimismo, de la evaluación de las muestras de campo se identificaron siete morfotipos (Fig. 31). Con base en las características morfológicas y análisis moleculares se pudieron reconocer 4 especies: *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf. delicatissima*, *P. cf. pungens*, para la ZGI. Tres morfotipos no lograron ser identificados (*Pseudo-nitzschia* sp.1, *Pseudo-nitzschia* sp.6, *Pseudo-nitzschia* sp.2). Para el AGC se reconocieron 3 morfotipos: *Pseudo-nitzschia* sp.1, *P.*

cf. *delicatissima*, y *Pseudo-nitzschia* sp.6. Las características morfológicas de las cepas y morfotipos se describen en la Tabla 4.

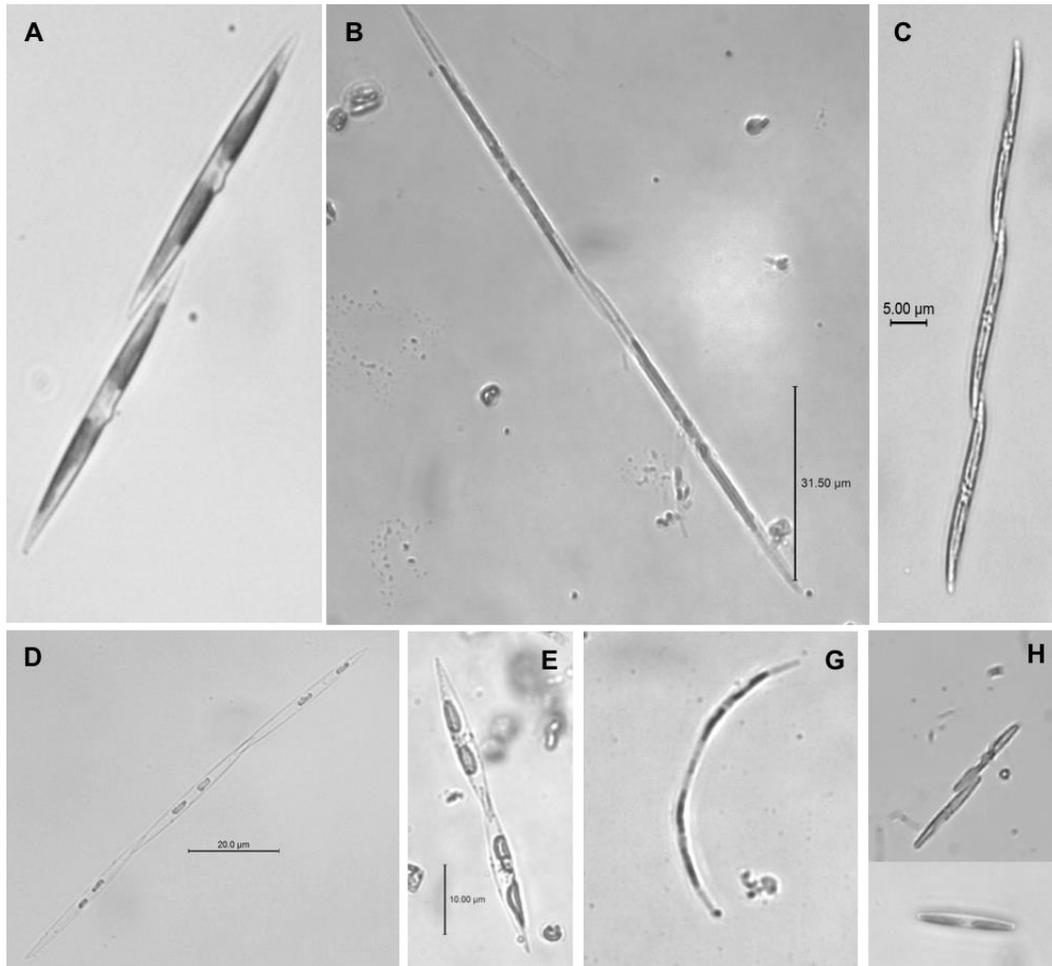


Figura 31. Imágenes de microscopía de luz (ML) de los morfotipos y cepas aisladas de *Pseudo-nitzschia* en la Zona de las Grandes Islas y Alto Golfo de California. (A) *P. cf. delicatissima* (cepa Pn2BLA y morfotipo Pn2); (B) *P. cf. pungens* (cepa Pn8BLA y morfotipo Pn5); (C) *P. multistriata* (cepas Pn1 y Pn5BLA, morfotipo Pn4); (D) *Pseudo-nitzschia* sp.1 (morfotipo Pn1); (E) *Pseudo-nitzschia* sp.6 (morfotipo Pn6); (G) *Pseudo-nitzschia* sp.2 (morfotipo Pn7) (H) *P. americana* (cepa Pn6, morfotipo Pn3).

Pseudo-nitzschia americana (Hasle) G.A. Fryxell en Hasle (1993) (Fig. 32; Tabla 4). Presente en invierno, ampliamente distribuida en la ZGI (dentro del Canal de Ballenas y en zona de costa), ausente en el AGC. ID: Cepa Pn6BLA, morfotipo en muestras de campo Pn3. Se obtuvo árbol filogenético basado en la LSU del rADN de la cepa Pn6 (Fig. 37)

Células lineares y simétricas en vista valvar, rectangulares en vista cingular. Ápices amplios y redondeados. Eje transapical de 1.82 – 3.23 μm , eje apical de 11.07-14.44 μm , con 25 estrías en 10 μm y 20 fíbulas en 10 μm , nódulo central ausente. Células con dos cloroplastos, uno en cada ápice. Se observaron células solitarias y en cadenas de hasta tres células. Epífitas de *Chaetoceros* spp. y *Stephanopyxis* spp.

Potencial tóxico: No se detectó AD_c en condiciones de cultivo (un cultivo analizado).



Figura 32. (A-B) *Pseudo-nitzschia americana* en ML (A) Células epífitas en *Stephanopyxis* sp. (B) Células solitarias, se muestran dos cloroplastos en cada ápice (C-D) Frústulas en vista valvar en SEM (escala de la barra= 2 μm) (C) Valva completa (D) Ápice celular, la flecha señala el patrón de estrías (escala de la barra= 1 μm).

Pseudo-nitzschia multistriata (Takano) Takano (Fig. 33; Tabla 4). Especie poco común, se presentó en bajas abundancias en la ZGI en mayo, presente dentro del Canal de Ballenas y en zona de costa. Ausente en el AGC. ID: Cepa Pn1BLA y Pn5BLA, morfotipo en muestras de campo Pn4. Se obtuvo árbol filogenético basado en el ITS del rADN de las cepas Pn1BLA y Pn5BLA (Fig. 36)

Células lanceoladas y asimétricas en vista valvar, sigmoideas en vista cingular. Ápices en punta, con dos cloroplastos laminares en cada ápice. Eje transapical de 1.09–2.70 μm , eje apical de 14.47-27.23 μm , 45 estrías en 10 μm ; 25 fíbulas en 10 μm . Nódulo central ausente. Se observaron células solitarias y en cadenas de hasta cinco células.

Potencial tóxico: No se detectó AD_c en condiciones de cultivo.

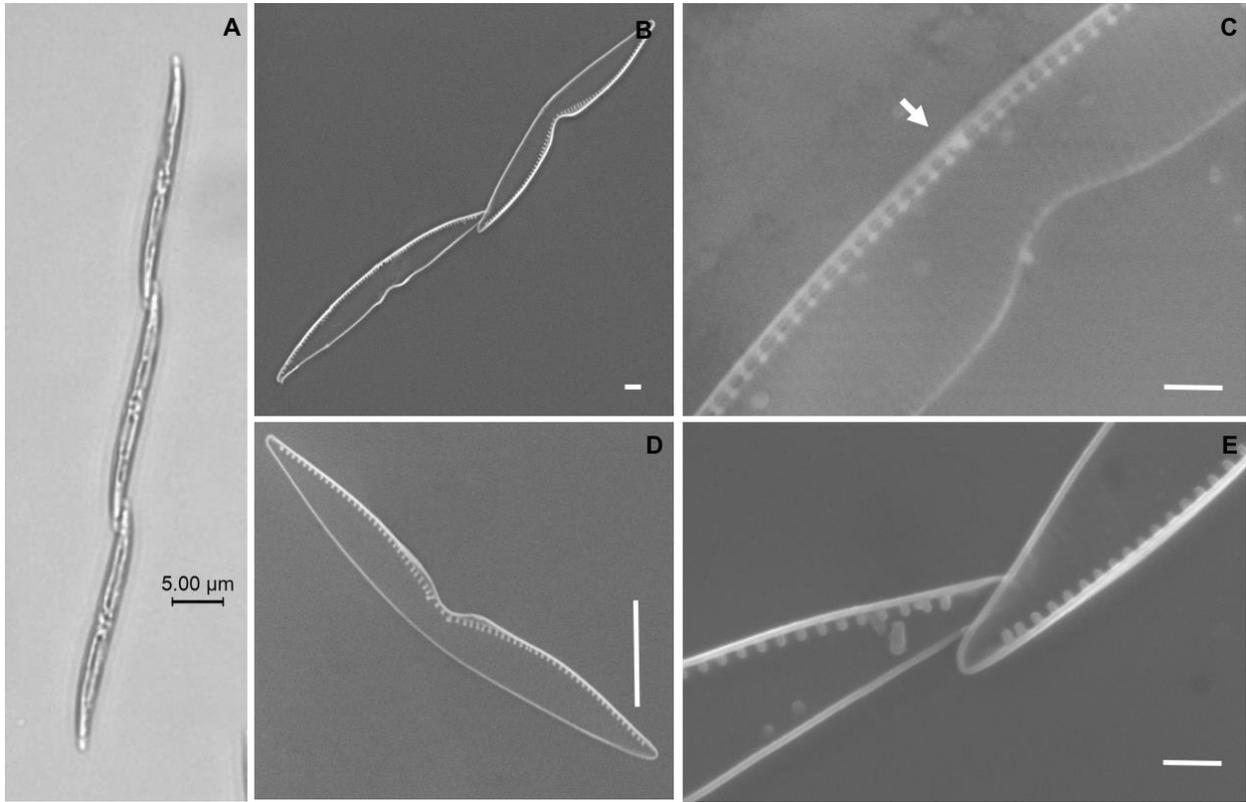


Figura 33. (A) *Pseudo-nitzschia multistriata* en ML. (B) Células en vista valvar mostrando la formación de cadenas en SEM (escala de la barra=2 μm) (C) Parte media de la valva mostrando la ausencia de nódulo central y patrón de estrías en SEM (escala de la barra=1 μm) (D) Frústula completa en SEM (escala de la barra=2 μm) (E) Ápices valvares mostrando el traslape celular (escala de la barra=1 μm).

Pseudo-nitzschia cf. delicatissima (Cleve) Heiden (Fig. 34; Tabla 4). Especie común en la ZGI en invierno y mes de transición, mayor abundancia dentro de las estaciones ubicadas en Canal de Ballenas. Presente en el AGC sólo durante el verano. ID: Cepa Pn2BLA, morfotipo en muestras de campo Pn2. No se obtuvieron árboles filogenéticos de esta cepa.

Células lineares y simétricas en vista valvar, linear a lanceolada en vista cingular. Ápices delgados en punta, con dos cloroplastos laminares en cada ápice. Eje transapical de 1.66–2.83 μm , eje apical de 30.06–27.23 μm , 18 estrías en 10 μm ; 18 fíbulas en 10 μm ; 2 filas de poroides, nódulo central presente. Se observaron colonias en cadenas de hasta ocho células.

Potencial tóxico: No se detectó AD_c en condiciones de cultivo.

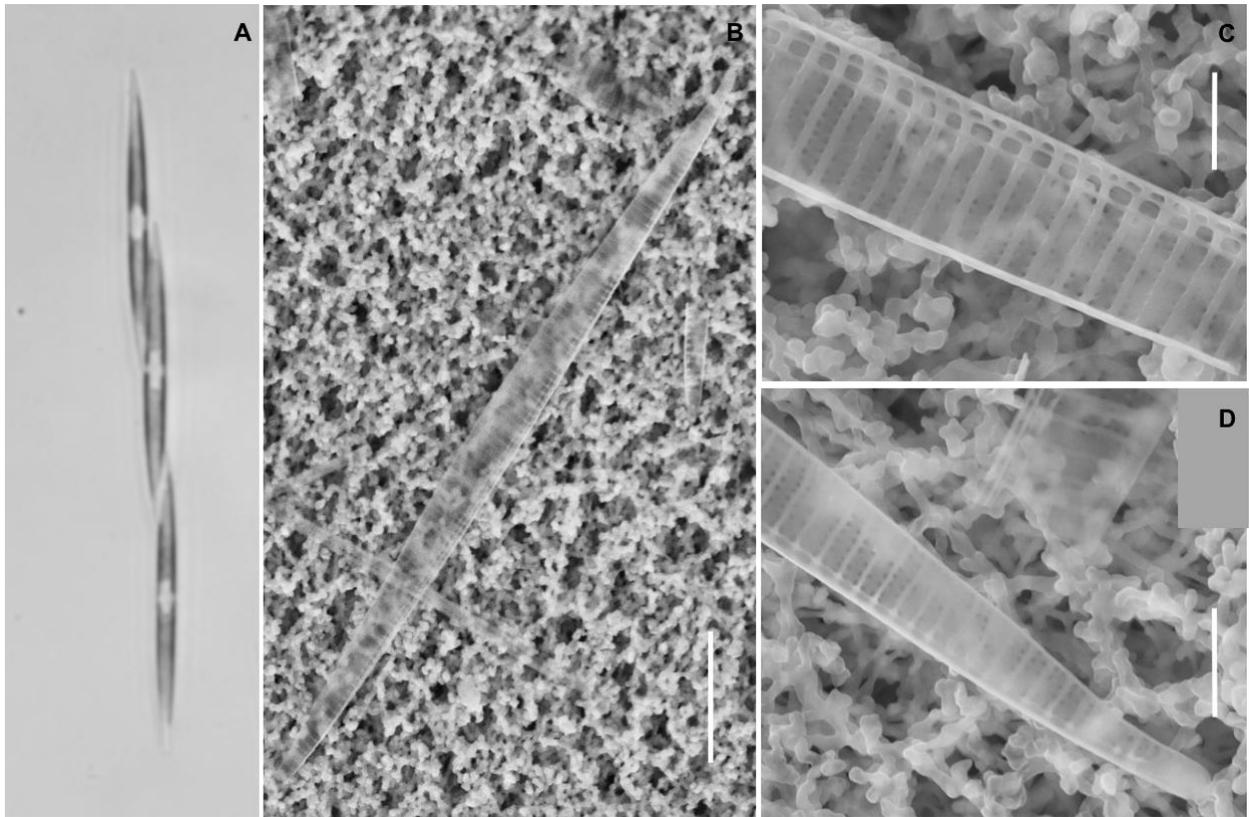


Figura 34. (A) *Pseudo-nitzschia cf. delicatissima* en ML (B) Frústula completa en SEM (escala de la barra=10 μm) (C) Fíbulas, estrías y líneas de poroides (escala de la barra=2 μm) (D) Ápice valvar (escala de la barra=2 μm).

Pseudo-nitzschia cf. pungens (Cleve) Hasle (Fig. 35; Tabla 4). Especie dominante en la ZGI principalmente en el verano, mayor abundancia en la base de termoclina. Ausente en el AGC. ID: Cepa Pn8BLA, morfotipo en muestras de campo Pn5. No se obtuvieron árboles filogenéticos de esta cepa.

Células lineares y simétricas en vista valvar, linear a lanceolada en vista cingular. Ápices delgados en punta, con dos cloroplastos laminares en cada ápice. Eje transapical de 1.90–4.77 μm , eje apical de 60.01–163.01

μm , 12 estrías en $10 \mu\text{m}$; 10 fíbulas en $10 \mu\text{m}$; 2-3 filas de poroides; 4 poroides en $1 \mu\text{m}$; poroides redondos, nódulo central ausente. Se observaron colonias en cadenas de hasta once células.

Potencial tóxico: No se detectó AD_c en condiciones de cultivo, aunque en este estudio la abundancia de esta especie tuvo una alta correlación con la concentración de AD en material particulado.

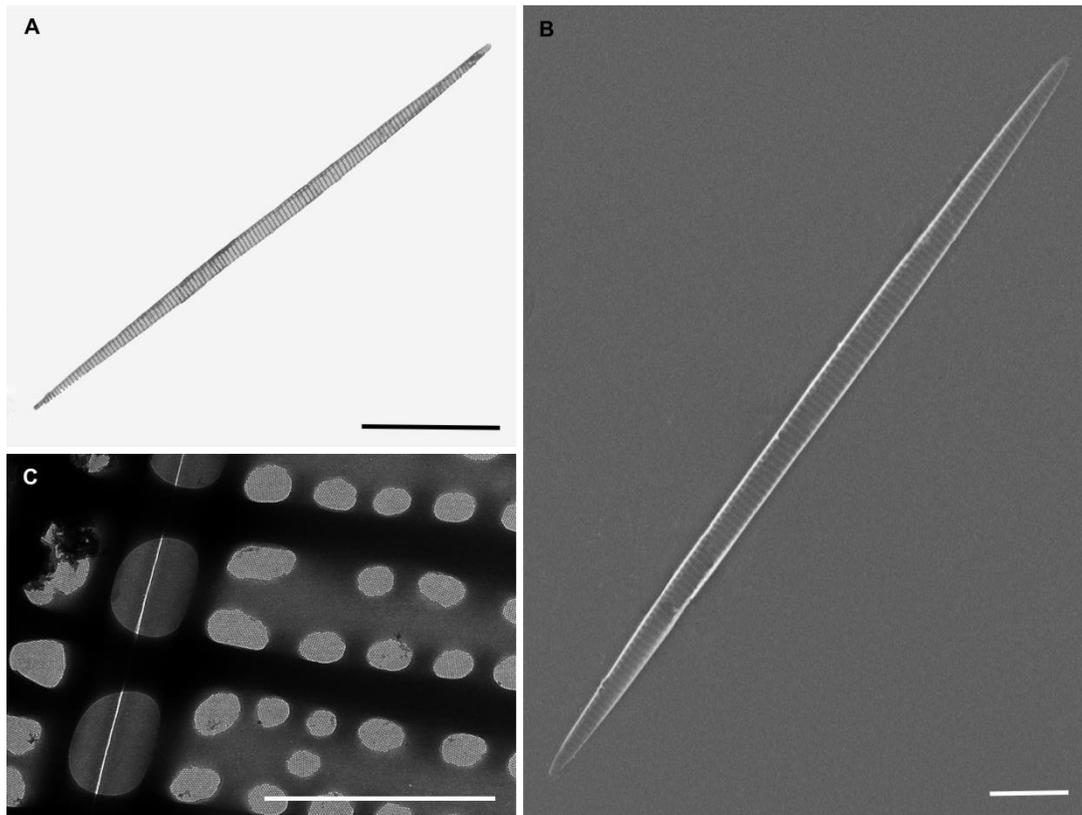


Figura 35. (A) *Pseudo-nitzschia cf. pungens* en TEM (escala de la barra= $20 \mu\text{m}$) (B) Frústula completa en SEM (escala de la barra= $10 \mu\text{m}$) (C) Fíbulas y poroides (escala de la barra= $1 \mu\text{m}$).

Tabla 4. Información morfológica de las cepas de *Pseudo-nitzschia* spp. de la Zona de las Grandes Islas ($n=30$; promedio \pm DS). n/v= características no visibles con SEM. (*) Señala a las cepas de *Pseudo-nitzschia* establecidas para este estudio.

Especie	Código cepa/morfotipo	Forma valvar	Eje apical (μm)	Eje transapical (μm)	Fibulas (10 μm)	Estrías (10 μm)	Fila poroides	Poroides (1 μm)	Nódulo central	Referencias
<i>P. multistriata</i>	Pn1BLA*;Pn5BLA*;Pn4	Lanceolada, asimétrica	21.92 \pm 4.15	1.91 \pm 0.37	25	45	n/v	n/v	n/v	Quijano-Scheggia et al., 2008 Ajani et al., 2013 Quijano-Scheggia et al., 2008
<i>P. cf. delicatissima</i>	Pn2BLA*	Lanceolada, simétrica	33.35 \pm 1.13	2.41 \pm 0.30	18	24	2	5	n/v	Parsons et al., 2002 Rivera-Vilarelle et al., 2015 Klein et al., 2010 Lundholm et al., 2002
<i>P. americana</i>	Pn6BLA*-Pn3	Rectangular, simétrica	13.17 \pm 0.68	2.30 \pm 0.36	20	25	n/v	n/v	-	Rivera-Vilarelle et al., 2015 Hernández-Becerril, 1998. Ajani et al., 2013.
<i>P. cf. pungens</i>	Pn8BLA*-Pn5	Linear, simétrica	93.33 \pm 31.9	3.50 \pm 1.25	10	12	2-3	4	-	Hernández-Becerril, 1998.
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.6	Pn6	Lanceolada, simétrica	22.63 \pm 2.74	1.90-4.77						
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.2	Pn7	Cóncava, asimétrica	54.69 \pm 9.38	2.41 \pm 0.57						

***Pseudo-nitzschia* sp. 1** (Fig. 31D). Morfotipo dominante en el AGC y en la ZGI principalmente durante el verano. No se establecieron cepas de este morfotipo y no se lograron observar características morfométricas en TEM o SEM.

Células lineares y simétricas en vista valvar, linear a lanceolada en vista cingular. Ápices delgados en punta, con dos cloroplastos laminares. Se observaron colonias en cadenas de hasta seis células.

Potencial tóxico: No se probó.

***Pseudo-nitzschia* sp. 6** (Fig. 31E). Especie presente en la ZGI principalmente durante mayo y en marzo en el AGC. ID: en muestras de campo Pn6. No se establecieron cepas de este morfotipo y no se lograron observar características morfométricas en TEM o SEM.

Células lanceoladas con ápices rostrados. Células simétricas en vista valvar y cingular. Ápices largos ahusados, con dos cloroplastos centrales. Eje transapical de 1.90–4.77 μm en la parte central, eje apical de 19.82–29.80 μm . Se observaron células solitarias y colonias en cadenas de hasta seis células.

Potencial tóxico: No se probó.

***Pseudo-nitzschia* sp. 2** (Fig. 31G). Especie rara en ZGI, ausente en el AGC. ID: en muestras de campo Pn7. No se establecieron cepas de este morfotipo y no se lograron observar características morfométricas en TEM o SEM.

Células cóncavas o convexas en vista valvar. Con dos cloroplastos centrales. Eje transapical de 1.41–2.65 μm , eje apical de 43.89–71.83.80 μm . Se observaron células en pares, raramente células solitarias.

Potencial tóxico: No se probó.

3.8 Identificación molecular de *Pseudo-nitzschia* spp.

El análisis filogenético realizado con las secuencias del ITS1, 5.8S e ITS2 del rADN de las cepas Pn1 y Pn5 y las 38 secuencias de nucleótidos reportadas en el NCBI (incluyendo al grupo externo) reveló relaciones

filogenéticas (máxima verosimilitud, ML) entre secuencias formando un mismo clado con valores de remuestreo mayores al 90% con *Pseudo-nitzschia multistriata* (Fig. 36).

El árbol filogenético (máxima verosimilitud, MLML) realizado con las secuencias del LSU del rADN de 32 especies que incluyen al grupo externo y a la secuencia de *Pseudo-nitzschia* obtenida en este estudio reveló que la cepa Pn6 forma un mismo clado altamente compatible con *Pseudo-nitzschia americana* con valores de remuestreo mayores al 90% (Fig. 37).

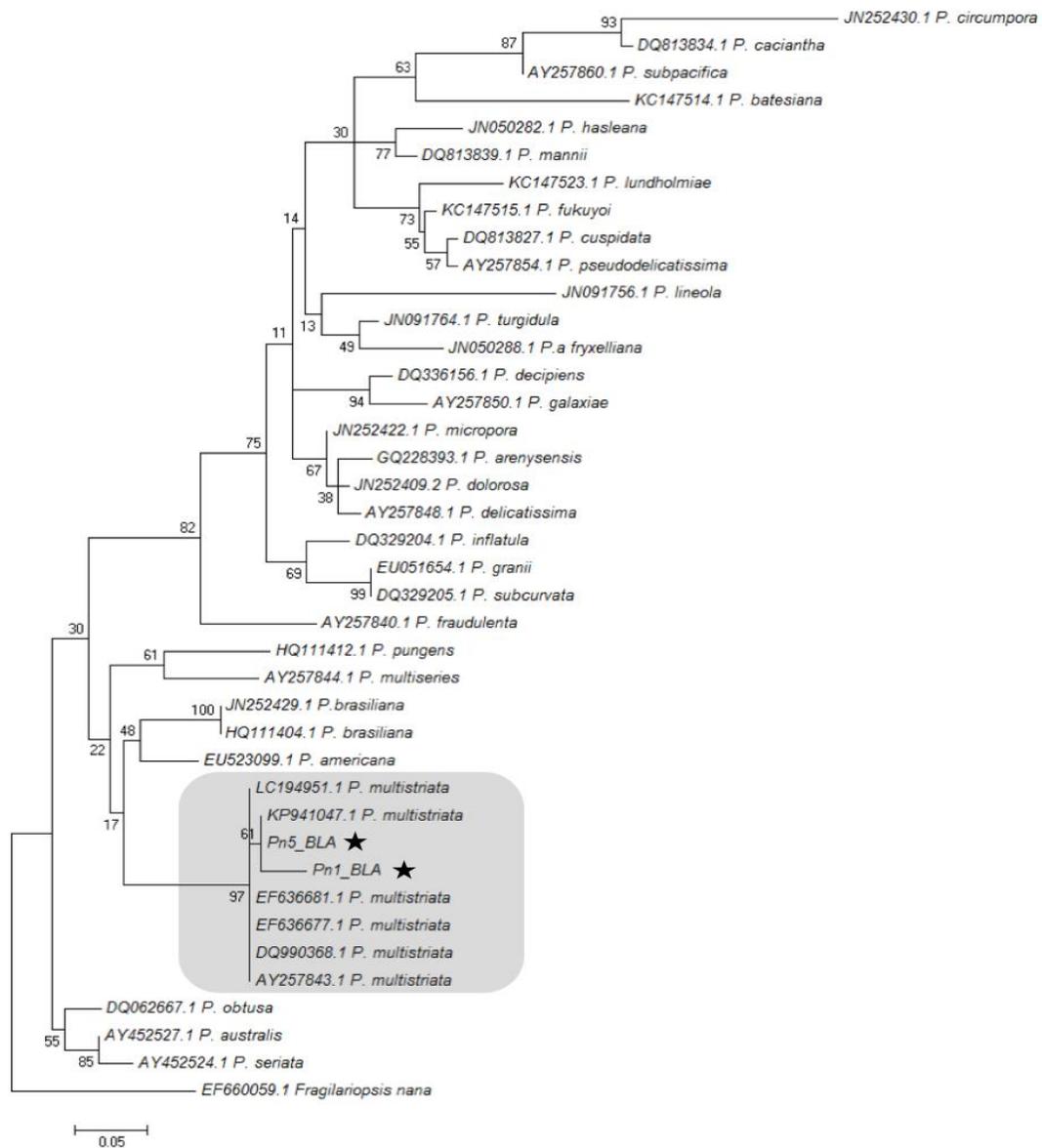


Figura 36. Árbol filogenético de las secuencias del marcador ITS del ADNr enraizado con un grupo externo (*Fragilariopsis nana*). El árbol fue construido con los valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de máxima verosimilitud (ML). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. La estrella indica las cepas obtenidas en este estudio.

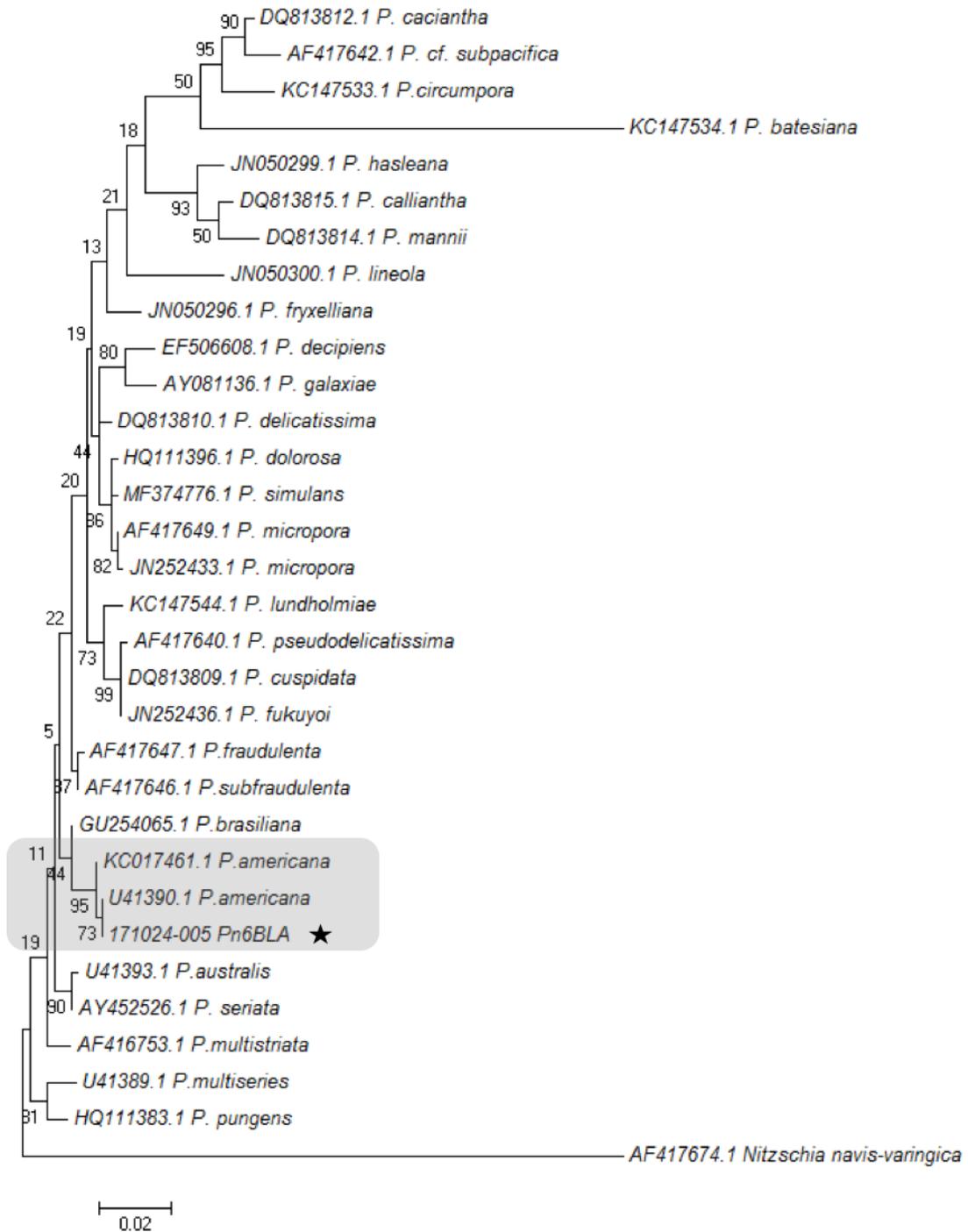


Figura 37. Árbol filogenético de las secuencias del marcador LSU del ADNr enraizado con el grupo externo *Nitzschia navis-varingica*. El árbol fue construido con los valores de remuestreo (1000 Bootstrap) de máxima verosimilitud (ML). Se muestra el nombre de las especies y el número de acceso al Genbank de cada taxón. La estrella indica las cepas obtenidas en este estudio.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Variables ambientales en la Zona de las Grandes Islas (ZGI): temperatura y salinidad

En la Zona de las Grandes Islas los cambios ambientales tienen una variación estacional marcada. Con base en la variación temporal descrita para el golfo de California (Alvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991), se identificaron tres temporadas en la zona de estudio: verano con un intervalo de temperatura entre 24 a 29°C; invierno con temperaturas entre 22 y 14 °C y mayo como mes de transición con una temperatura de 19°C. Esta variación estacional de la temperatura dentro del Golfo está relacionada a su posición geográfica y al patrón en la dirección del viento. Durante el verano el viento sopla desde el sureste transportando calor y aire húmedo tropical dentro del Golfo y durante este periodo se presentan características de aguas tropicales (aproximadamente 28°C). Durante el periodo de invierno los vientos dominantes que soplan del noroeste son fríos y secos, por lo que la temperatura del agua durante esta temporada disminuye. Mayo es un periodo de transición en el que hay un cambio en la dirección de los vientos y un cambio de estación; por lo tanto, la temperatura aumenta en este periodo (Alvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Paden et al., 1991; Escalante et al., 2013).

Además de la variación estacional observada en la temperatura del agua, también se registró una variación espacial en la zona de estudio. Las temperaturas menores durante todo el estudio se registraron dentro del Canal de Ballenas. No se observó una estratificación térmica en la columna de agua. La capa de mezcla alcanzó los 40 m en algunas estaciones a excepción de la parte sur de la Bahía de los Ángeles (estación E7) donde se detectó una termoclina somera principalmente durante agosto, noviembre y mayo. No existe mucha información sobre la circulación en la Bahía de los Ángeles (BLA), uno de los trabajos realizados es el de Amador-Buenrostro et al. (1991), estos autores simularon mediante un modelo numérico la circulación dentro de la Bahía con forzamiento por marea y viento. Se establece que en la parte sur y norte de la Bahía la magnitud de la corriente es menor y el agua tiene mayor tiempo de residencia. Por lo tanto, en estos sitios el enfriamiento de la columna de agua es menor, lo que podría favorecer la estratificación de la columna de agua. La falta de estratificación en la zona del Canal de Ballenas durante la mayor parte del muestreo se puede explicar por las corrientes intensas en esta zona y por la mezcla constante de agua superficial con agua de las cordilleras marinas, por lo que las temperaturas dentro de esta área generalmente son las más bajas de todo el Golfo (Badan-Dagon et al., 1985; Alvarez-Borrego, 2002).

En este estudio no se observaron grandes variaciones en la salinidad. El intervalo de salinidad registrada de 35.6 a 34.6 fue similar a lo reportado por Alvarez-Borrego y Gaxiola-Castro (1988), Alvarez-Borrego y

Lara-Lara (1991) y Torres-Delgado et al. (2013) para el área de estudio durante las estaciones de verano e invierno.

4.2 Variables ambientales en la ZGI: nutrientes inorgánicos

En este trabajo no se observó un patrón estacional en concentración de nutrientes. En general la concentración en superficie fue ligeramente menor durante el verano ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$: 3.5, PO_4^{3-} : 0.5 y SiO_2 : 4 μM) y mayor en el periodo de invierno ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$: 4.6, PO_4^{3-} : 1.4 y SiO_2 : 4 μM). La dinámica de los nutrientes dentro del CB esta asociada a la mezcla vertical de la columna de agua, este proceso es muy importante para la disponibilidad de los nutrientes en la superficie (Torres-Delgado et al., 2013). En otros estudios, se ha reportado para el CB una variación temporal y vertical en la concentración de nutrientes. Delgado et al. (2013) señalan una columna de agua estratificada durante el verano, lo que impone un control físico al flujo vertical de nutrientes y una columna de agua mezclada verticalmente en invierno; por lo tanto, el enriquecimiento de nutrientes es más intenso en invierno. Como se mencionó para el caso de la temperatura, la falta de estratificación en el Canal de Ballenas durante la mayor parte de este estudio podría explicar las altas concentraciones de nutrientes durante todo el periodo de muestreo, debido a las corrientes intensas en esta zona y la mezcla constante de agua superficial con agua de las cordilleras transporta aguas más frías y ricas en nutrientes hacia la superficie presentándose una condición ecológica similar a la de una surgencia constante descrita para esta zona por Álvarez-Borrego (2010).

Existe poca información sobre la concentración de nutrientes en la ZGI o se reporta su concentración integrada en aproximadamente en los primeros 200 m (Alvarez-Borrego et al., 1978; Alvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Hernández-Ayón et al., 2013; Torres-Delgado et al., 2013), por lo tanto los valores reportados en dichos trabajos son superiores (NO_3^- : 7.5-20.8 μM ; PO_4^{3-} : 0.9-3.0 μM ; SiO_2 : 6.4-40.2 μM) a los máximos encontrados en este trabajo para los primeros 40 m de la columna de agua ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$: 3.5, PO_4^{3-} : 0.5 y SiO_2 : 4 μM). Aparentemente el único trabajo que presenta la concentración de nutrientes en muestras discretas a diferentes profundidades es el de Alvarez-Borrego y Gaxiola-Castro (1988). Estos autores reportaron para el invierno concentraciones similares a las registradas en este trabajo para la misma temporada ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$: 6.5 μM , PO_4^{3-} : 1.44 μM y SiO_2 : 16.4 μM).

4.3 Biomasa y abundancia fitoplanctónica: ZGI y AGC

Existen pocos trabajos sobre la variación temporal de la biomasa fitoplanctónica en la ZGI medida directamente. Los trabajos de Gendrop-Funes et al. (1978), Alvarez-Borrego y Gaxiola-Castro (1988), Gaxiola-Castro et al. (1995) y Cortés-Lara et al. (1999) reportan datos puntuales de muestras obtenidas generalmente de campañas oceanográficas que sólo abarcaron una estación climática. Asimismo, el reporte más reciente es de hace casi dos décadas, por lo que se carece de una serie de datos que puedan brindar información actual sobre las variaciones estacionales de la biomasa del fitoplancton en la región.

Este tema ha sido mejor estudiado mediante la estimación de la biomasa fitoplanctónica por medio de percepción remota. Estos trabajos sí describen la variación estacional y temporal de la biomasa fitoplanctónica en todo el GC (Santamaría-del-Angel et al., 1994; Hidalgo-González y Alvarez-Borrego, 2001; Kahru et al., 2004; Espinosa-Carreón y Valdez-Holguín, 2007; Ramírez, 2014). Aunque estos datos tienen escalas temporales y espaciales diferentes a la aproximación de este trabajo, la información sirve para hacer inferencias generales sobre lo que podría estar ocurriendo en la ZGI.

Con relación a las mediciones directas de biomasa fitoplanctónica, Gendrop-Funes et al. (1978) reportaron para la temporada de primavera concentraciones de Chl a de aproximadamente 5.0 mg m^{-3} dentro del Canal de Ballenas tanto en superficie como a 20 m de profundidad. Sin embargo, los autores no señalan alguna relación entre las concentraciones reportadas y algún factor ambiental. Mediante el uso de sensores remotos, Santamaría-del-Angel et al. (1994), Hidalgo-González y Alvarez-Borrego (2001), Kahru et al. (2004); Espinosa-Carreón y Valdez-Holguín (2007) y Ramírez (2014), reportan que existe un ciclo anual en la biomasa del fitoplancton en todo el GC relacionado a procesos de surgencias que ocurren principalmente durante el invierno y verano. Sin embargo, Kahru et al. (2004) reportaron que en la ZGI no ocurría el mismo patrón estacional. Para esta región reportan que existe un ciclo semianual con máximos en la biomasa del fitoplancton relacionados a los periodos de transición durante la primavera (mayo-junio) y el otoño (septiembre-octubre). En estos periodos la estratificación vertical en la columna de agua es débil y la mezcla de mareas es suficiente para permitir un flujo de nutrientes hacia la zona eufótica ocasionado un incremento en la abundancia de fitoplancton. Lo reportado por Kahru et al. (2004) es congruente con lo registrado en este trabajo para la ZGI para el periodo de verano. La mayor biomasa y abundancia fitoplanctónica se presentó en septiembre ($4.2 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1.48 \times 10^6 \text{ cel L}^{-1}$, respectivamente). Además, de los procesos de aporte de nutrientes descritos anteriormente asociados al proceso de mezcla, durante el verano los vientos predominantes (suroeste) son débiles ($2\text{-}5 \text{ m s}^{-1}$) (Paden et al., 1991), lo cual podría disminuir la turbulencia en la capa superior de la columna de agua haciéndola más estable,

favoreciendo así el crecimiento del fitoplancton. En condiciones de vientos fuertes hay una disminución de la biomasa fitoplanctónica producida por alta dinámica física del sistema (Espinosa-Correón et al., 2007).

En este estudio las concentraciones menores de Chl *a* y las abundancias menores fitoplanctónicas se registraron durante el invierno en las estaciones ubicadas en el Canal de Ballenas ($0.36 \mu\text{g L}^{-1}$ y $7.70 \times 10^2 \text{ cel L}^{-1}$, respectivamente) aun cuando las concentraciones de los nutrientes fueron las máximas reportadas en este estudio (NO_3+NO_2 : 4.6, PO_4 : 1.4 y SiO_2 : 4 μM). Estos resultados sugieren que en el ZGI la mezcla vertical causada por los vientos del noroeste ($8\text{-}12 \text{ m s}^{-1}$) aunada a la mezcla causada por las corrientes de marea características del área de estudio ejercen un mayor control sobre la biomasa del fitoplancton que la concentración de nutrientes. Lo anterior ha sido reportado por Gaxiola-Castro et al. (1995) que estudiaron la distribución de la Chl *a* y su relación con la estratificación en el GC (incluyendo a la ZGI) al analizar muestras tomadas *in situ* durante la temporada de invierno. Los autores reportan que para la ZGI los valores de turbulencia eran altos, lo cual contribuía a una baja estratificación en la columna de agua y como consecuencia una baja productividad del fitoplancton. Los autores atribuyen estos resultados a la fuerte mezcla vertical que, a pesar de aportar nutrientes a la superficie, no permite el crecimiento del fitoplancton como resultado de bajas tasas fotosintéticas. Al respecto, Cortés-Lara et al. (1999) señalan que dentro del GC una fracción grande de la biomasa fitoplanctónica es acarreada por turbulencia hasta y desde profundidades superiores a los 50 m, causando la disminución de su capacidad fotosintética debido al acondicionamiento del fitoplancton a bajas irradiancias o bien a la reducción de la fotosíntesis cuando las células son transportadas a grandes profundidades.

Contrastante a lo observado en la ZGI, en la zona del Alto Golfo de California no se encontró el mismo patrón estacional en la biomasa del fitoplancton. Para esta zona se reportan bajas abundancias fitoplanctónicas con una disminución de agosto a mayo (3.8×10^5 a $7.5 \times 10^3 \text{ cel L}^{-1}$, respectivamente). No se analizó la concentración de nutrientes o algún otro parámetro hidrográfico para asociar las las bajas abundancias registradas. Probablemente estén relacionadas a la profundidad del área muestreada, que al ser somera (<30 m) está altamente influenciada fuerte mezcla de marea, además de existir una elevada turbidez y la resuspensión de sedimentos, que en conjunto disminuyen la disponibilidad de la luz para el fitoplancton (Santamaría-del-Angel et al., 1994; Alvarez y Jones, 2002).

La comunidad fitoplanctónica de la ZGI y del AGC fue dominada durante todo el periodo de estudio por el grupo de las diatomeas, con abundancia relativas superiores al 50% en ambas zonas y su pigmento marcador (Fucoxantina) fue el más abundante dentro de la ZGI. Estas áreas tienen en común la influencia

de la turbulencia sobre el fitoplancton, la cual además de ejercer un control sobre su biomasa, también es un factor determinante sobre la composición de sus grupos dentro de la columna de agua (Margalef, 1997). El dominio de las diatomeas sobre otros grupos algales ha sido reportado para la parte Norte (incluyendo la ZGI) y el AGC por Alvarez-Borrego y Gaxiola-Castro (1988), Gaxiola-Castro et al. (1995) y Cortés-Lara et al. (1999). Estos trabajos reportan, al igual que en este trabajo, a las diatomeas como grupo dominante en sitios con condiciones turbulentas, ricas en nutrientes con bajas tasas de estratificación. Lo anterior también ha sido registrado en el Golfo de Tehuantepec por Hernández-Becerril et al. (2015), quienes observaron el predominio de las diatomeas sobre otros grupos fitoplanctónicos en condiciones de mezcla turbulenta y surgencias cuando los vientos del norte soplan sobre la parte central del Golfo.

En este trabajo se registró que los dinoflagelados representaron menos del 30% de la abundancia total del fitoplancton tanto en la ZGI como en el AGC. En la Zona de las Grandes Islas, este grupo fue menos abundante durante el invierno. Alvarez-Borrego y Gaxiola-Castro (1988) reportan bajas abundancias de dinoflagelados (7×10^3 cel L⁻¹) dentro del CB en sitios sin estratificación, lo anterior concuerda a lo reportado para este grupo fitoplanctónico por Meave y Hernández-Becerril (1998) en el Golfo de Tehuantepec, quienes registraron que los dinoflagelados fueron más abundantes en sitios con condiciones de relativa estabilidad.

La variación abundancia de otros grupos algales en la Zona de las Grandes Islas y el Alto Golfo de California no ha sido reportada anteriormente. En este trabajo se registró que las Euglenofitas, Cryptofitas y los silicoflagelados aportaron en conjunto cerca del 1% (verano) y más del >10% (invierno) a la abundancia total del fitoplancton en la ZGI y 5% en el AGC (durante todo el estudio). De acuerdo al tamaño de los organismos pertenecientes a estos grupos algales, se clasifican como nanoplancton (<20µm). Se ha reportado que esta fracción del fitoplancton es más abundante que el microplancton (>20µm) en la parte sur del Golfo de California, mientras que en la parte norte generalmente ocurre lo contrario (Valdez-Holguín y Lara-Lara, 1987). Al respecto, Gilmartin y Revelante (1978) reportan que el nanoplancton representa el 49% de la biomasa total del fitoplancton en Bahía de los Ángeles. Sin embargo, en ninguno de los trabajos se menciona la relación entre la abundancia de los grupos con las características oceanográficas o climáticas de los sitios de estudio.

Al igual que la caracterización de la abundancia del fitoplancton y su composición, el de la distribución de los pigmentos fotosintéticos en el GC ha sido pobremente estudiada o no hay estudios al respecto, a excepción de la Chl *a*. En este trabajo se encontró que la razón de la Fuc y de la Chl *b* respectoa a la Chl *a* T son 0.4 y 0.1%, respectivamente. La Fuc no sólo se presenta en las diatomeas, pero los análisis por

microscopía confirmaron que las diatomeas y las euglenofitas en el caso de la Chl *b* son los principales productores primarios en la ZGI. Además, registramos la presencia de la Dv Chl *a* pigmento marcador de *Prochlorococcus*. Este pigmento se detectó únicamente en las temporadas de invierno y el periodo de transición donde represento el 0.1 de Chl *a* T (Fig. 21) en la ZGI. *Prochlorococcus* es un género con amplia distribución en el océano, su presencia se ha relacionado principalmente a zonas oligotróficas. Sin embargo, las células de este género son capaces de mantener su crecimiento en diferentes condiciones de luz (Partensky et al., 1999). Se han reportado máximos de DvChl *a* en profundidades cercanas a los 20 m tanto en la costa occidental de Baja California (Almazán-Becerril et al., 2010) como en el golfo de Tehuantepec (Hernández-Becerril et al., 2015) lo que sugiere que la presencia de *Prochlorococcus* en la ZGI no está asociada a condiciones oligotróficas. En este trabajo se reportan las mayores concentraciones durante el invierno, por lo tanto su presencia quizá esté relacionada al transporte de células de *Prochlorococcus* desde zonas más profundas donde son más abundantes, hasta la superficie debido a la intensa mezcla que se registra durante el invierno.

4.4 Estacionalidad y potencial tóxico de *Pseudo-nitzschia* spp.

En el golfo de California *Pseudo-nitzschia* es un componente común del fitoplancton (Moreno et al., 1996). Sin embargo, no hay estudios sobre la diversidad, variación temporal, ni potencial tóxico de sus especies. Este es el primer trabajo sobre la temática en el GC. En la ZGI la abundancia de *Pseudo-nitzschia* tuvo un patrón estacional, las mayores abundancias se registraron durante el verano y en el mes de transición ($>1.5 \times 10^5$ cel L⁻¹) y las menores durante el invierno ($<1 \times 10^3$ cel L⁻¹). La contribución de este género a la abundancia total de las diatomeas durante el verano fue del 30%. En el AGC la abundancia de *Pseudo-nitzschia* no tuvo un patrón estacional y este género representó aproximadamente el 10% de la abundancia de las diatomeas.

En el presente estudio se encontró que la mayor diversidad y abundancia de *Pseudo-nitzschia* se detectó cuando la temperatura fue superior a 26 °C (verano). El análisis de componentes principales demostró una fuerte correlación entre la abundancia de este género y la temperatura durante el verano. La distribución de distintas especies de *Pseudo-nitzschia* está relacionada generalmente con la temperatura y la salinidad (Hasle, 1995; Klein et al., 2010; Lundholm et al., 2010). En el golfo de México, la abundancia de *Pseudo-nitzschias* también presenta un patrón estacional, las mayores abundancias en las costas de Veracruz y Campeche (hasta 1.64×10^6 cel L⁻¹) ocurren durante el periodo de lluvias (agosto-septiembre) y secas (abril-

mayo) cuando la temperatura del agua es superior a los 26 °C (Parsons et al., 2012; Okolodkov et al., 2015; Poot-Delgado et al., 2015). Además, Okolodkov et al. (2015) reportan al igual que en este estudio que la abundancia de *Pseudo-nitzschia* tuvo una correlación mayor (Pearson, $R=0.47$, $p < 0.005$) con la temperatura que con la concentración de nutrientes. Los resultados obtenidos en el golfo de México (Parsons et al., 2012; Okolodkov et al., 2015; Poot-Delgado et al., 2015) y en el golfo de California (presente trabajo) difieren a lo publicado por Cabrales (2010), Rivera-Vilarelle et al. (2013) y Gracia-Escobar et al. (2015) para las costas del Pacífico mexicano, ya que en estos trabajos encontraron que la variación en la abundancia de *Pseudo-nitzschia* estuvo controlada principalmente por el aumento en la concentración de nutrientes asociado a eventos de surgencias.

Para este trabajo se reportan siete especies de acuerdo a los morfotipos de *Pseudo-nitzschia* encontrados en la ZGI (*Pseudo-nitzschia* sp.1., *P. cf. delicatissima*, *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf. pungens*, *Pseudo-nitzschia* sp.6 y *Pseudo-nitzschia* sp.2) y tres para el AGC (*P. cf. delicatissima*, *P. cf. pungens* y *Pseudo-nitzschia* sp.6). *P. pungens* y *P. americana* ya habían sido reportadas para el GC (Hernández-Becerril, 1998; Sierra-Beltrán et al., 1997; Sierra-Beltrán et al., 2005; Lundholm et al., 2002; Gárate-Lizárraga, 2007; Gárate-Lizárraga et al., 2013). Se añaden dos nuevos registros para el Golfo de California: *P. cf. delicatissima* y *P. multistriata*. Por lo tanto, el número de especies de *Pseudo-nitzschia* registradas en el GC asciende a nueve y seis de éstas han sido reportadas como productoras de AD (*P. cf. delicatissima*, *P. pungens*, *P. multistriata*, *P. brasiliana*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudolenta*). Esto representa una alta diversidad de especies de *Pseudo-nitzschia*, aunque menor a la registrada en otras costas mexicanas. En el Sistema Arrecifal Veracruzano (golfo de México) el género *Pseudo-nitzschia* está representado por ocho especies (*P. brasiliana*, *P. calliantha*, *P. mutiseries*, *P. pungens*, *P. subfraudolenta*, *P. subpacificica*, *P. delicatissima*, *P. cacialantha*) (Parsons et al., 2012; Okolodkov et al., 2015) y en Pacífico mexicano por once especies: *P. americana*, *P. australis*, *P. micropora*, *P. multistriata*, *P. subfraudolenta*, *P. brasiliana*, *P. dolorosa*, *P. pungens*, *P. delicatissima*, *P. cf. fryxelliana* (Rivera-Vilarelle et al., 2013). Las especies de *Pseudo-nitzschia* más comunes (con más registros) en las costas mexicanas son *P. pungens* y *P. delicatissima*, ambas consideradas como especies cosmopolitas (Hernández-Becerril, 1998; Lelong et al., 2012; Rivera-Vilarelle et al., 2013). En contraste, *P. multistriata* ha sido reportada únicamente en el océano Pacífico por Rivera-Vilarelle et al. (2013) y en este trabajo dentro del golfo de California.

En el litoral mexicano (a excepción del mar Caribe) se han documentado cambios de la composición de especies de este género a través del tiempo (Parsons et al., 2012; Okolodkov et al., 2015; Rivera-Vilarelle et al., 2013). En el verano se detectaron los siete morfotipos registrados para el golfo de California. *P. pungens* fue la especie más abundante, seguida de *Pseudo-nitzschia* sp.1. ambas especies estuvieron

presentes durante todo el estudio y su abundancia alcanzó los valores máximos en este periodo. La diversidad disminuyó en invierno y la especie mayor representada fue *P. americana*. Morfotipos como *P. multistriata* y *Pseudo-nitzschia* sp.2 estuvieron poco respresentadas en la comunidad de diatomeas. Hernández-Becerril (1998) y Gárate-Lizárraga et al. (2007) registraron la presencia de *P. pungens* en la parte sur y centro del GC. Por lo tanto, con base en nuestros resultados parece que esta especie está distribuida en la mayor parte o en todo el golfo de California (Fig. 38). En la revisión realizada por Lelong et al. (2012) se menciona que a nivel mundial *P. pungens* domina sobre otras especies de *Pseudo-nitzschia* en regiones con temperaturas cálidas. Otra especie de distribución cosmopolita encontrada en este trabajo es *P. americana*, esta especie fue reportada por Lundholm et al. (2002) en las costas de Sonora.

La identificación de las especies de *Pseudo-nitzschia* es fundamental para evaluar el potencial de acumulación de AD en el ambiente. Esto se debe comprobar mediante la detección de esta toxina para identificar a las especies potencialmente productoras de la misma. En este estudio se detectó ácido domoico en material particulado durante verano y el mes de transición. La concentración de AD estuvo correlacionada con la abundancia de *P. cf. pungens* ($r= 0.92$) que representó hasta el 40% de la AT del género en verano. Por lo tanto, aquí se propone que la presencia de AD en fitoplancton se debe a la presencia de *P. cf. pungenes* y que ésta problemente es la única especie que está produciendo esta toxina bajo las condiciones prevalecientes durante el verano. Esta especie presentó una concentración celular de aproximadamente $0.55 \text{ pg AD cel}^{-1}$. Aunque *Pseudo-nitzschia pungens* es reconocida como especie productora de AD, los trabajos sobre las condiciones bajo las cuales esta especie puede sintetizar la toxina son escasos, a pesar de su amplia distribución a nivel mundial (Hasle, 2002).

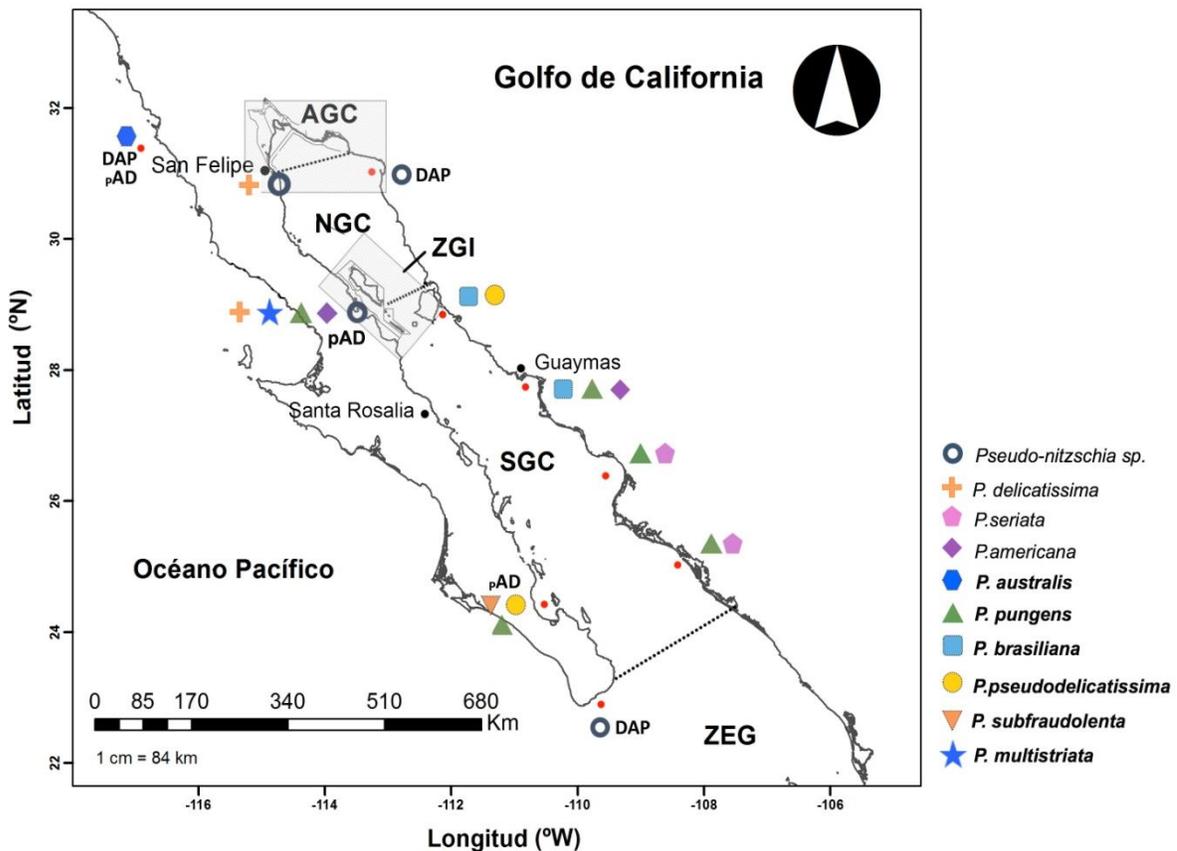


Figura 38. Distribución de especies de *Pseudo-nitzschia* en las costas del golfo de California. (**NGC**) Norte del golfo de California; (**ZGI**) Zona de las Grandes Islas; (**SGC**) sur del golfo de California; (**ZEG**) Zona de entrada golfo de California. (**DAP**) Registros de envenenamiento por ácido domoico, (**pAD**) Registros de ácido domoico en material particulado. En negritas se señalan a las especies reportadas con potencial tóxico.

Este es el primer reporte de AD en muestras de fitoplancton para el norte del golfo de California. Este resultado es uno de los pocos reportes de esta toxina en el ambiente en México. Solamente se ha reportado AD en el sur del golfo de California (Bahía de la Paz) (Lizárraga et al., 2007) y en el océano Pacífico. En el AGC se registró una mortandad importante de fauna marina y se atribuyó a una intoxicación por ácido domoico ya que se detectó esta toxina en muestras de cerebro, corazón y contenido estomacal. Sin embargo, no se detectó un florecimiento y por lo tanto no se identificó a la especie de *Pseudo-nitzschia* potencialmente productora de AD (SEMARNAT-PROFEPA, 1997). En la región sur del golfo, Gárate-Lizárraga et al. (2007) detectaron bajas concentraciones de AD en muestras de red (24-52 ng AD filtro⁻¹) durante un florecimiento mixto de *P. fraudolenta*, *P. pungens* y algunas especies del complejo *P. pseudodelicatissima*, pero no se identificó a la especie que produjo el AD detectado en las muestras de fitoplancton. Es escaso el estudio de las especies de *Pseudo-nitzschia* y presencia de la toxina en el golfo

de California. Los resultados de este trabajo son el primer reporte sobre la ecología del género *Pseudo-nitzschia* y su potencial nocivo en el Golfo (Fig. 45). Es importante continuar con estos estudios y obtener cepas de *Pseudo-nitzschia* para caracterizar su fisiología y producción de AD bajo diferentes condiciones de cultivo. En este aspecto, Santiago-Morales y García-Mendoza (2011) aislaron dos cepas de *P. australis* en la bahía de Todos Santos, B.C. y caracterizaron la producción de AD de dicha especie en diferentes condiciones de cultivo; éste es el primer reporte en México en el que se identifica a la especie productora de AD.

Además de *P. cf. pungens* (Pn8), en este trabajo se mantuvieron cultivos de cepas de *P. multistriata* (Pn1 y Pn5), especie reportada en como productora de ácido domoico en cepas del mar Mediterráneo (Sarno, 2000) y de *P. cf. delicatissima* (Pn2) también reportada como productora de AD en material colectado en Canadá y Nueva Zelanda (Lundholm, 2018). Sin embargo, se detectó AD celular en las cepas aisladas bajo las condiciones de cultivo probadas en este trabajo (Apartado 2.3.5). En Lelong et al. (2012) se sugiere que todas las especies de *Pseudo-nitzschia* tienen la capacidad para sintetizar AD. No se ha detectado AD en algunas especies porque no se han probado las condiciones que induzcan la producción de esta toxina, ni se han utilizado métodos de detección lo suficientemente sensibles. En este sentido, sería importante reevaluar si las cepas aisladas en este trabajo producen AD. Se tiene que probar diferentes condiciones de cultivo para evaluar su potencial tóxico. Es importante mencionar que en este trabajo el protocolo utilizado para la cuantificación de AD (celular y en material particulado) no fue limitante, ya que las muestras fueron analizadas con cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (LC-MS/MS) con un límite de detección de 0.025 ng AD ml⁻¹.

4.5 Morfología y filogenia de *Pseudo-nitzschia*

La morfología de *P. americana* caracterizada en este trabajo es congruente a lo descrito por Lundholm et al. (2002) para la cepa aislada en la parte sur del golfo de California. La formación de cadenas y la forma de vida epífita también son congruentes con las descripciones realizadas por estos autores. Se encontraron ligeras variaciones entre los datos morfométricos de cepas aisladas en las costas del Pacífico mexicano. Los especímenes descritos por Hernández-Becerril (1998) y Rivera-Vilarelle et al. (2013) son ligeramente más grandes (eje apical: 18-27 µm; eje transapical: 3.1-4.0 µm; fíbulas en 10 µm: 19-21; estrías en 10 µm: 28-30) a las que están presentes en el golfo de California. No hay registros de *P. americana* en el golfo de México.

P. cf. delicatissima es reportada por primera vez en las costas del golfo de California, sus características morfológicas son similares a lo reportado para otras cepas mexicanas del océano Pacífico y golfo de México, eje apical: 36.5-41.9 μm ; eje transapical: 1.3-2.3 μm ; fíbulas en 10 μm : 20-24: 9 a 14 estrías en 10 μm y nódulo central presente (Rivera-Vilarelle et al., 2013; Okolodkov et al., 2015). *P. multistriata* también es un nuevo registro en el golfo de California, su presencia en México únicamente había sido reportado en las costas de Manzanillo por Rivera-Vilarelle et al. (2013). Las características morfológicas de esta especie están dentro de los intervalos reportados por Quijano et al. (2008), Ajani et al. (2013) y Rivera-Vilarelle et al. (2013) a excepción del eje apical que es menor (22 vs 24-58 μm). Los análisis moleculares y filogenéticos confirmaron la identidad de esta especie en la ZGI.

Pseudo-nitzschia cf. pungens fue la especie más abundante en ambas zonas de estudio, las características descritas en este trabajo varían ligeramente con lo reportado para otras cepas del golfo de California. Hernández-Becerril (1998) describe para especímenes colectados del norte y sur del golfo un eje apical entre 94 a 109 μm , pero no señala las medidas del eje transapical. En este trabajo se registro una amplitud celular de 60 a 163 μm y una longitud de 1.9 a 4 μm . Estas medidas son más parecidas a las reportadas para cepas del sureste de Australia (68 a 111 μm de eje apical y 1.9-3.7 μm de eje transapical) reportadas por Ajani et al. (2013). El resto de los parámetros ultra estructurales concuerdan con lo reportado por estos dos autores (Tabla 10).

Morfológicamente, las especies de *Pseudo-nitzschia* descritas en este estudio pertenecen a dos complejos descritos por Hasle y Syvertsen (1997). *P. americana* y *P. cf. pungens* se encuentran dentro del “complejo *Pseudo-nitzschia seriata*” (>3 μm de ancho), mientras que *P. multistriata* y *P. delicatissima* al “complejo *Pseudo-nitzschia delicatissima*” (<3 μm de ancho).

Hasta el momento no se cuenta con secuencias moleculares de otras cepas de *Pseudo-nitzschia* del golfo de California. Los datos moleculares del ITS y de la LSU del presente estudio son los primeros datos en su tipo y muestran la afinidad genética de las cepas de la ZGI con *P. multistriata* del golfo de Nápoles, Italia (D’Alelio et al., 2009) y con *P. americana* de Nueva Gales, Australia (Ajani et al., 2013).

Capítulo 5. Conclusiones

- En la ZGI la variación de la temperatura y concentración de nutrientes tuvieron un patrón estacional marcado: verano (agosto a octubre) e invierno (noviembre a marzo) y se detectó un mes de transición (mayo). La mayor concentración de nutrientes se observó en invierno dentro del Canal de Ballenas (NO_3+NO_2 : 4.6, PO_4 : 1.4 y SiO_2 : 4 μM).
- En la Zona de las Grandes Islas la columna de agua se mantuvo mezclada verticalmente durante todo el periodo de estudio, por lo que la distribución de las variables ambientales y biológicas no tuvo grandes fluctuaciones con la profundidad.
- En la ZGI la biomasa fitoplanctónica presentó una variación temporal marcada con abundancias más altas en el verano ($4.2 \mu\text{g L}^{-1}$ Chl *a* y 1.48×10^6 cel L^{-1}) y mes de transición ($>1 \mu\text{g L}^{-1}$ Chl *a* y 2.6×10^6 cel L^{-1}). En el AGC la variación de la abundancia del fitoplancton no presentó un patrón estacional como en la ZGI. En ambas zonas las diatomeas son los principales productores primarios.
- En la ZGI la mayor abundancia de *Pseudo-nitzschia* se registró en verano y en el mes de transición ($>1.5 \times 10^5$ cel L^{-1}), la menor abundancia se presentó en invierno ($<1 \times 10^3$ cel L^{-1}). El género representó el 30% del grupo de las diatomeas. La mayor abundancia de *Pseudo-nitzschia* spp. se relacionó con la temperatura más alta en la ZGI. En el AGC no se observó un patrón estacional en la abundancia de *Pseudo-nitzschia*.
- Se registraron siete morfotipos de *Pseudo-nitzschia* para la ZGI (*Pseudo-nitzschia* sp1., *P. cf. delicatissima*, *P. americana*, *P. multistriata*, *P. cf. pungens*, *Pseudo-nitzschia* Pn6 y *Pseudo-nitzschia* sp.2) y tres para el AGC (*P. cf. delicatissima*, *P. cf. pungens* y *Pseudo-nitzschia* sp.6). De las especies reportadas, tres son potencialmente productoras de ácido domoico: *P. delicatissima*, *P. multistriata* y *P. cf. pungens*.
- Son nuevos registros para las costas del golfo de California *P. cf. delicatissima* y *P. multistriata*
- Se detectó ácido domoico en material particulado durante el verano y mes de transición. La concentración de esta toxina se correlacionó con la abundancia de *P. cf. pungens* que representó hasta el 40% del género de *Pseudo-nitzschia* en verano.

Literatura citada

- Ajani, P., Murray, S., Hallegraeff, G., Lundholm, N., Gillings, M., Brett, S., Armand, L. 2013. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New South Wales, Australia: morphotaxonomy, molecular phylogeny, toxicity, and distribution. *Journal of Phycology* 49, 765-785. DOI: 10.1111/jpy.12087
- Ajani, P.A., Verma, A., Lassudrie, M., Doblin, M.A., Murray, S.A. 2018. A new diatom species *P. hallegraeffii* sp. nov. belonging to the toxic genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from East Australian Current. *PLoS ONE* 13 (4): 1-20.
- Almazán-Becerril, A., García-Mendoza, E. 2008. Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: a nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas* 34, 29–43.
- Almazán-Becerril, A., García-Mendoza, E., Rivas, D. 2010. Distribución de pigmentos fotosintéticos y grupos de fitoplancton durante octubre de 2003. En: Gaxiola-Castro, G., Durazo, R. (Eds.), *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California 1997-2007*. SEMARNAT, INE, CICESE y UABC. pp. 263-276.
- Alvarez-Borrego, S., Rivera, J.A., Gaxiola-Castro, G., Acosta-Ruiz, M.J., Schwartzlose, R.A. 1978. Nutrientes en el Golfo de California. *Ciencias Marinas* 5(2), 53-71.
- Alvarez-Borrego, S. 2002. Physical Oceanography. En: Case, T. J., Cody, M. L., Ezcurra, E. (Eds.), *A New Island Biogeography of the Sea of Cortés*, Oxford University Press, pp.41-59.
- Alvarez-Borrego, S. 2007. Oceanografía de la región de las grandes islas. En: Danemann, G.D., Ezcurra, E. (Eds.), *Bahía de los Ángeles: Recursos naturales y Comunidad línea base*, SEMARNAT, INE, Pronatura Noroeste A.C., San Diego Natural History Museum, pp. 45-65.
- Alvarez-Borrego, S. 2010. Physical, Chemical and Biological Oceanography of the Gulf of California. En: Brusca, R. (Ed.), *The Gulf of California: Biodiversity and Conservation*, The University of Arizona Press and ASDM, pp.24-48.
- Alvarez-Borrego, S., Gaxiola-Castro, G. 1988. Photosynthetic parameters of northern Gulf of California phytoplankton. *Continental Shelf Research*, 8(1), 37-47.
- Alvarez-Borrego, S., Lara-Lara, J.R. 1991. The Physical Environment and Primary Productivity of the Gulf of California. En: Dauphin, P., Simoneit, B.R.T. (Eds.), *The Gulf and Peninsular Province of the Californias*. American Association of Petroleum Geologists, Tulsa, pp. 555-567.
- Alvarez, L.G., Jones, S.E. 2002. Factors influencing suspended sediment flux in the Upper Gulf of California. *Estuarine, Coastal. Shelf Science*, 54, 747-759.

- Amador-Buenrostro, Serrano-Guzmán, Argote-Espinoza, M.A. 1991. Numerical Model of The Circulation Induced By The Wind At Bahia De Los Angeles, B.C., *Ciencias Marinas*, 17(3), 39-57.
- Armbrust, V.E. 2009. The life of diatoms in the world's ocean. *Nature* 459, 185-192.
- Badan-Dangon, A., Koblinsky, C.J., Baumgartner, T. 1985. Spring and summer in the Gulf of California: observations of surface thermal patterns. *Oceanologica Acta* 8, 13-22.
- Bates, S.S., Garrison, D.L., Horner R.A. 1998. Bloom dynamics and physiology of domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.) *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 267-292.
- Bates, S.S., Bird, C.J., Freitas, A.S.W, Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C. 1989. Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island. Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46, 1203-1215.
- Bates, S.S., Trainer V.L. 2006. The ecology of harmful diatoms. En: Granéli E., Turner J. (Eds.) *Ecology of harmful algae*. SpringerVerlag, Heidelberg, pp. 81-93.
- Bird, C.J., Boyd, R.K., Brewer, D., Craft, C.A., W. De Freitas, A.S., Dyer, E.W., Embree, D.J., Falk M., Flack, M.G., Foxall, R.A., Gillis, C., Greenwell, M., Hardstaff, W.R., Jamieson, W.D., Lay-cock, M.V., Leblanc P., Lewis, N.I., Mcculloch, A.W., Mccully, G.K., Mclnerney-Northcott, M., Mcinnes, A.G, Mclachlan, J.L., Odense, P., O'neil, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Seto, P.F., Sim, P.G., Tappen, D., Thibault, P., Walter, J.A., Wright, J.L.C., Backman, A.M., Taylor, A.R., Dewar, D., Gilgan, M., Richard, D.J.A. 1988. Identification of domoic acid as the toxic agent responsible for the P.E.I. contaminated mussel incident. Atlantic Research Laboratory Technical Report No. 56, NRCC 29083. pp. 86.
- Bray, N. A., Robles, J.M. 1991. Physical Oceanography of the Gulf of California. En: Dauphin, P., Simoneit, B.R.T. (Eds.), *The Gulf and Peninsular Province of the Californias*. American Association of Petroleum Geologists, Tulsa, pp. 511-553.
- Cabrales, T.G. 2010. Distribución espacial y temporal de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* spp. y concentración de ácido domoico en la región de la Bahía de Todos Santos, B.C., México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 124 pp.
- Cho, E.S., Kotaki, Y., Park, J.G. 2001. The comparison between toxic *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Hasle) Hasle and non-toxic *P. pungens* (Grunow) Hasle isolated from Jinhae Bay, Korea. *Algae* 16 (3), 275-285.
- Cortés-Lara, M.C., Alvarez-Borrego, S., Giles-Guzmán, A.D. 1999. Vertical mixing Effect on the Distribution of Nutrients and Phytoplankton in Two Regions of the Gulf of California, During Summer. *Revista Sociedad Mexicana de Historia Natural* 49, 193-206.

- D'Alelio, D., Amato, A., Kooistra, W.H., Procaccini, G., Casotti, R., Montresor, M. 2009. Internal Transcribed Spacer Polymorphism in *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Naples: Recent divergence or intraspecific hybridization?. *Protist* 160 (1), 9-20.
- Dortch, Q, Robichaux, R., Pool, S., Milsted, D, Mire, G., Rabalais, N.N., Soniat, T.M., Fryxell, G.A., Turner, R.E., Parsons, M.L. 1997. Abundance and vertical flux of *Pseudo-nitzschia* in the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series* 146, 249-264.
- Escalante, F., Valdez-Holguín, J. E., Álvarez-Borrego, S., Lara-Lara, J. R. 2013. Temporal and spatial variation of sea surface temperature, chlorophyll a, and primary productivity in the Gulf of California. *Ciencias Marinas* 39, 203-215.
- Espinosa-Carreón, T. L., Valdez-Holguín, J. E. 2007. Gulf of California interannual chlorophyll variability. *Ecología Aplicada* 6(1-2), 83-92.
- Fryxell, G.A., Reap, M.E., Valencic, D.L. 1990. *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseries* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. *Beih. Nova Hedwigia* 100, 171-188.
- Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D. 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (June-July 2006). *Harmful Algae News, IOC-UNESCO* 32, 6-7.
- Gárate-Lizárraga, I., Poot-Delgado, C.A., Ramírez-Castillo, E.R., Páez-Hernández, M.H. 2013. Proliferation of *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and P.cf. *peudodelicatissima* (Bacillariophyceae) in the Estero Santa Cruz, northern Gulf of California, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48, 393-399.
- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C., Peña-Manjarrez, J.L. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae* 8, 493-503.
- Gaxiola-Castro, G., Garcia-Cordova, J.J., Valdez-Holguin, E., Botello-Ruvalcaba, M. 1995. Spatial distribution of chlorophyll α and primary productivity in relation to winter physical structure in the Gulf of California. *Continental Shelf Research* 15(9), 1043-1059.
- Gendrop-Funes, V., Acosta-Ruiz, M., Schwartzlose, R. A. 1978. Distribución horizontal De Clorofila "a" Durante La Primavera En la Parte Norte Del Golfo De California. *Ciencias Marinas* 5(1), 71-89. doi.org/10.7773/cm5il.313.
- Gilmartin, M., Revelante, N. 1978. The Phytoplankton Characteristics of the Barrier Islands Lagoons of the Gulf of California. *Estuarine and Coastal Marine Science* 7, 29-47.
- Gómez-Aguirre, S., Licea, S., Gómez, S. 2004. Proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) y otras especies del microplancton en la Bahía de Mazatlán, México. *Revista de Biología Tropical*, 69-76.

- Gracia-Escobar, M.F., Millán-Núñez, R., Valenzuela-Espinoza, E., González-Silvera, A., Santamaria-del-Ángel, E. 2015. Changes in the Composition and Abundance of Phytoplankton in a Coastal Lagoon of Baja California, México, During 2011. *Open Journal of Marine Science* 5, 169-181. <http://dx.doi.org/10.4236/ojms.2015.52014>.
- Grasshoff K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. 1983. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 419.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, 32, 234–36.
- Hasle G.R. 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriis* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology, and distribution. *Journal of Phycology* 31, 428–435.
- Hasle, G.R. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites?. *Harmful Algae* 1, 137–146.
- Hasle, G.R., Fryxell, G.A. 1970. Diatoms: Cleaning and Mounting for Light and Electron Microscopy, *Transactions of the American Microscopical Society* 89, 469-474.
- Hasle, G.R., Syvertsen, E.E. 1997. Marine diatoms. En Thomas, C.R. (Ed.) *Identify Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 5-385.
- Hernández-Ayón, J. M., Chapa-Balcorta, C., Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V.F., Huerta-Díaz, M.A., Santamaría-del-Ángel, E., Galindo-Bect, S., Segovia-Zavala, J.A. 2013. Dynamics of dissolved inorganic carbon in the Midriff Islands region of the Gulf of California: Influence of water masses. *Ciencias Marinas* 39(2), 183-201. doi:<http://dx.doi.org/10.7773/cm.v39i2.2243>.
- Hernández-Becerril, D.U. 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific Coast of México. *Hydrobiologia* 379, 77-84.
- Hernández-Becerril, D.U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora Cynthia, Baron- Campis, S., Ceballos-Corona, G., Herrera-Silveira J., Meave del Castillo M.E., Juárez- Ruiz, N., Merino-virgilio F., Morales-Blake, A., Ochoa, J.L., Orellana-Cepeda, E., Ramírez-Camarena, C., Rodríguez-Salvador, R. 2007. Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. *Journal of Environmental Science and Health* 42, 1349-1363.
- Hernández-Becerril, D.U., López-Tachiquin, L.F., Machain-Castillo, M.L. Monreal-Gómez, M.A. 2015. Distribución de pigmentos fotosintéticos del fitoplancton del Golfo de Tehuantepec en verano (junio, 2003): importancia del picofitoplancton. *Hidrobiológica* 25 (3), 365-374.
- Hidalgo-González, R.M., Alvarez-Borrego, S. 2001. Chlorophyll profiles and the water column structure in the Gulf of California. *Oceanologica Acta* 24, 19-28.
- Jackson, A.E., Ayer, S.W., Laycock, M.V. 1992. The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens*. *Canadian Journal of Botany* 70, 2198-2201.

- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology* 42, 545-557.
- Kahru, M., Marinone, S., Lluch-Cota, S., Parés-Sierra, A., Mitchell, G. 2004. Ocean-color variability in the Gulf of California: scales from days to ENSO. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 51(1), 139-146. doi:10.1016/j.dsr2.2003.04.001.
- Klein, C., Claquin, P., Bouchart, V., Le Roy, B., Véron, B. 2010. Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9, 218–226.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C.V., Huyen, N.T.M., Hoy, N.C., Fukuyo, Y., Kodama, M. 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp. isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *Journal of Phycology* 36, 1057–1060.
- Lavín, M.F., Marinone, S.G. 2003. An Overview of the Physical Oceanography of the Gulf of California. En: Velasco, O.U., Sheinbaum, J., Ochoa, J. (Eds.), *Nonlinear Processes in Geophysical Fluid Dynamics*, Kluwer Academic Publishers, pp. 173-204.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soundant, P., Bates, S.S. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51 (2), 168-216.
- Lewitus, A.J., Horner, R.A., Caron, D.A., García-Mendoza, E., Hickey, B.M., Hunter, M., Huppert, D.D., Kelly, D., Kudela, R.M., Langlois, G.W. Largier, J.L., Lessard, E.J., RaLonde, R., Rensel, J., Strutton, P.G., Trainer, V.L., Tweddle, J.F. 2012. Harmful Algal blooms along the North American West Coast Region: history, trends, causes, and impacts. *Harmful Algae* 19, 133-159.
- Liefer, J.D., Robertson, A., MacIntyre, H.L., Smith, W.L., Dorsey, C.P. 2013. Characterization of a toxic *Pseudo-nitzschia* spp. Bloom in the Northern Gulf of Mexico associated with domoic acid accumulation in fish. *Harmful Algae* 26, 20-32.
- Li, Y., Huang, C.X., Xu, G.S., Lundholm, N., Teng, S.T., Wu, H., Tan, Z. 2017. *Pseudo-nitzschia simulans* sp. nov. (Bacillariophyceae), the first domoic acid producer from Chinese waters. *Harmful Algae* 67, 119-130.
- Lim, H.C., Lim, P.T., Su, S.N.P., Teng, S.T., Leaw, C.P. 2012. Genetic diversity of *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (Bacillariophyceae) from Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 24, 1465–75.
- Lim, H.C., Teng, S.T., Leaw, C.P., Lim, P.T. 2013. Three novel species in the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. batesiana* sp. nov., *P. lundholmiae* sp. nov. and *P. fukuyoi* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the Strait of Malacca, Malaysia. *Journal of Phycology* 49, 902–916.
- Lundholm, N., Clarke, A., Ellegaard, M. 2010. A 100-year record of changing *Pseudo-nitzschia* species in a sill-fjord in Denmark related to nitrogen loading and temperature. *Harmful Algae* 9, 449–457.

- Lundholm, N., Moestrup, O. 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis varingica* sp. nov (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. *Journal of Phycology* 36, 1162–1174.
- Lundholm, N., Moestrup, O. 2002. The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* p. nov. (Bacillariophyceae): morphology and phylogenetic relationships. *Phycologia* 41, 594-605.
- Lundholm, N., Moestrup, O., Hasle, G.R., Hoef-Emden, K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*?. *Journal of Phycology* 39, 797–813.
- Lundholm, N., Hasle, G.R., Fryxell, G.A., Hargraves, P.E. 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliiana* and *Pseudo-nitzschia linea*. *Phycologia* 41, 480- 497.
- Lundholm, N. 2018. Bacillariophyceae. IOC-UNESCO taxonomic reference list of harmful micro algae. Consultado el 6 de enero de 2018 de: <http://www.marinespecies.org/hab>.
- Mafra, L.L, Léger, C., Bates, S.S., Quilliam, M.A. 2009. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1216, 6003-6011.
- Margalef, R. 1997. Turbulence and marine life. *Scientia Marina* 61(1), 109-123.
- Meave, M.E., Hernández-Becerril, D.U. 1998. Fitoplancton. En: Tapia G., M. (Eds.), *El Golfo de Tehuantepec: El Ecosistema y sus Recursos*. UAM Iztapalapa, México, D.F. pp. 59-74.
- Moreno, J.L., Licea-Durán, S., Santoyo, H. 1996. Diatomeas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur-SEPFOMES-PROMARCO.
- Okolodkov, Y. B., Aké-Castillo, J.A, Campos-Bautista, G., Lara-Martínez, R., L., Jiménez-García, F. 2015. Dinámica anual del género *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Sistema Arrecifal Veracruzano, p. 249- 266. En: Granados-Barba, A., Ortiz-Lozano, L., Salas-Monreal, D., González-Gándara, C. (Eds.), *Aportes al conocimiento del Sistema Arrecifal Veracruzano: hacia el Corredor Arrecifal del Suroeste del Golfo de México*. Universidad Autónoma de Campeche, pp. 366.
- Ochoa, J.L., Sierra-Beltrán, A., Cruz-Villacorta, A., Sánchez-Paz, A., Núñez-Vázquez, E. 1996. Recent observations of HABs and toxic episodes Mexico. *Harmful Algae News* (14), 4.
- Omura, T., Iwataki, M., Borja, V.M., Takayama, H., Fukuyo, Y. 2012. Marine phytoplankton of the Western Pacific. *Kouseisha Kouseikaku*, Tokyo.
- Paden, C.A., Abbot, M.R., Winant, C.D. 1991. Tidal and admosferic forcing of the Upper Ocean in the Gulf of California Sea Surface Temperature Variability. *Journal of Geophysical Research* 96, 18337-18359.

- Pan, Y., Bates, S.S., Cembella, A.D. 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* 6, 127–135.
- Parsons, M.L., Okolodkov, Y.B., Aké-Castillo, J.A. 2012. Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Botánica Mexicana* 98, 51-72.
- Partensky, F., Hess, W.R., Vaulot, D. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology Molecular Biology Review* 63, 106-127.
- Poot-Delgado, C., Okolodkov, Y.B., Aké-Castillo, J.A., Redón-vonOsten, J. 2015. Annual cycle of phytoplankton with emphasis on potentially harmful species in oyster beds of Terminos Lagoon, southeastern Gulf of Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 50 (3), 465-477.
- Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., Gaviño-Rodríguez, J.H., Castro-Ochoa, F., Rivera-Vilarelle, M., Galicia-Pérez, M., Patiño-Barragan, M. 2011. First report of *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *P. micropora* (Bacillariophyceae) found in Cuyutlan Lagoon, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 46, 189-197.
- Quilliam, M.A. 2003. Chemical methods for domoic acid the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology*. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, pp. 247–266.
- Ramírez, M.R. 2014. Biomasa y producción fitoplanctónicas en el norte del Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 115 pp.
- Rhodes, L.L. 1998. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32, 537–544.
- Rivera-Vilarelle, M., Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., Gaviño-Rodríguez, J.H., Castro-Ochoa, F., Reyes-Herrera, A. 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Manzanillo and Santiago Bays, Colima, Mexico. *Botanica Marina*, 1-18. doi: 10.1515/bot-2012-0176
- Santamaría-del-Angel, E., Alvarez-Borrego, S., Müller-Karger, F.E. 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research* 99(C4), 7411-7421.
- Santiago, I.S. 2011. Potencial tóxico de cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas de la costa occidental de Baja California. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 161 pp.
- Santiago-Morales, I.S., García-Mendoza, E. 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO₃ ratios. *Harmful Algae* 12, 82-94.

- Sarno, D., Dahlmann, J. 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algae News* 21, 5.
- Sarthou G, Timmermans, K.R., Blain, S., Tréguer, P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* 53, 25–42.
- Sato, M., Nakano, T., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E., Sato, Y. 1996. Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae, *Phytochemistry* 42, 1595–1597.
- SEMARNAT-CONANP. 2007. Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado. (1ra. Ed.). México.
- SEMARNAT-CONANP. 2014. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Zona Marina Bahía de Los Ángeles, Canales de Ballenas y de Salsipuedes (1ra. Ed.). México.
- SEMARNAT-PROFEPA. 1997. Mortandad de mamíferos marinos cuyos cadáveres arribaron a las costas de Sinaloa. Informe Técnico. México, D. F. pp 34.
- Sierra-Beltrán A.P., Cortés-Altamirano, R., Gallo- Reynoso, J.P., Licea-Durán, S., Égido-Villarreal, J. 2005. Is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* toxin the principal cause of sardines, dolphins, sea lions and pelicans mortality in 2004 in Mexico?. *Harmful Algae News* 29, 6-8.
- Sierra-Beltrán, A. P., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Vi- Llacorta, A., Ochoa, J. L. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic *Pseudonitzschia* sp. is spreading. *Toxicon* 35, 447-453.
- Smida, D.B., Lundholm, N., Kooistra, W.H.C.F., Sahraoui, I., Ruggiero, M.V., Kotaki, Y., Ellegaard, M., Lambert, C., Hadj Mabrouk, H., Sakka Hlaili, A. 2014. Morphology and molecular phylogeny of *Nitzschia bizertensis* sp. nov. a new domoic acid producer. *Harmful Algae* 32, 49–63.
- Solórzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hipoclorite method. *Limnology and Oceanography* 14, 799-801.
- Soto-Mardones, L., Marinone, S.G., Parés-Sierra, A. 1999. Time and spatial variability of the sea surface temperature in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 25(1), 1-30.
- Sournia, A. 1978. *Phytoplankton Manual*. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO, pp. 337.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, pp. 184.
- Taylor, F.J.R., Haigh, R., Sutherland, T.F. 1994. Phytoplankton ecology of Sechart Inlet, a fjord system on the British Columbia coast. II. Potentially harmful species. *Marine Ecology Progress Series* 103, 151-164.

- Taylor, J.C., Harding, W.R., Archibald, C.G.M. 2007. A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples. Water Research Commission, Gezina, Pretoria.
- Teng, S.T., Lim, P.T., Lim, H.C., Rivera-Vilarelle, M., Quijano-Scheggia, S., Takata, Y., Quilliam, M.A., Wolf, M., Bates, S.S., Leaw, C.P. 2015. A non-toxicogenic but morphologically and phylogenetically distinct new species of *Pseudo-Nitzschia*, *P. Sabit* Sp. Nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 51, 706-725.
- Teng, S.T., Tan, S.N., Lim, H.C., Dao, V.H., Bates, S.S., Leaw, C.P. 2016. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 52, 973–989.
- Terseleer, N., Gypens, N., Lancelot, C. 2013. Factors controlling the production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae): A model study. *Harmful Algae* 24, 45-53.
- Tomas, C.R., 1997. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego, California.U.S.
- Torres-Delgado, E.V., Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V.F., Huerta-Díaz, A., Segovia-Zavala, J.A., Hernández-Ayón, J.M., Galindo-Bect, S. 2013. Wintertime enrichment of inorganic nutrients in the Ballenas Channel, Gulf of California. *Ciencias Marinas* 39 (2), 165-182. doi:<http://dx.doi.org/10.7773/cm.v39i2.2236>.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adam, N.G., Trick, C.G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14, 271-300.
- Valdéz-Holguín, J.E., Lara-Lara, J. R. 1987. Primary Productivity In The Gulf Of California Effects Of El Niño 1982-1983 Event. *Ciencias Marinas* 13(2),34-50.
- Van Heukelem, L., Thomas, C.S. 2000. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*, 910, 31-49.
- Villac, M.C., Roelke, D.L., Villareal, T.A., Fryxell, G.A. 1993. Comparison of two domoic acid-producing diatoms: a review. *Hydrobiol.* 269, 213-224.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 315–22.
- Work, M.T., Barr, B., Beale, A.M., Fritz, L., Quilliam, M.A., Jeffrey, L.C. 1993. Epidemiology of Domoic Acid Poisoning in Brown Pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's Cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24, 54-62.
- Zabaglo, K., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M., Bialczyk J. 2016. Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research* 13, 94-101.

ANEXOS

Anexo 1

Estructura del ácido domoico y mecanismos de toxicidad

El AD es un aminoácido de bajo peso molecular (311 Da.), hidrosoluble, no proteico y cristalino. Contiene un anillo de prolina, un grupo imino y tres grupos carboxilo (Fig. 39), que son los responsables de la alta hidrofilia y polaridad de la molécula. La estructura química del AD es similar a la del ácido caínico y a la del glutamato (Fig. 39). Existen 8 isómeros del AD (iso-ADs), algunos de ellos producto de su degradación, éstos isómeros al igual que el AD se encuentran presentes en el medio ambiente, aunque en menores concentraciones. El AD y sus isómeros son estables a temperatura ambiente; sin embargo, son sensibles a la fotodegradación (Zabaglo et al., 2016; Jeffery et al., 2004).

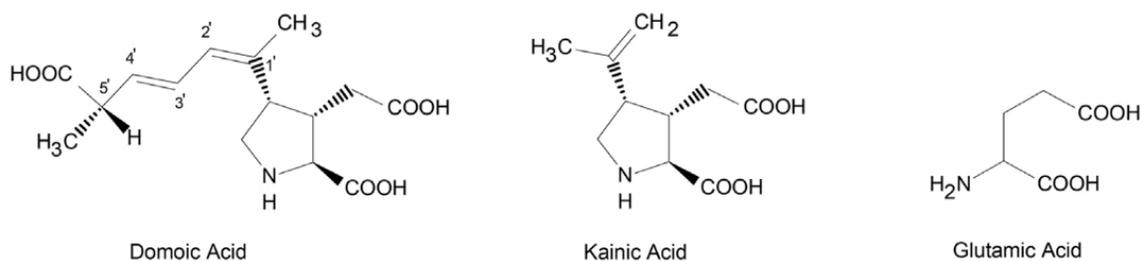


Figura 39.-Estructura química del ácido domoico, ácido Kaínico y glutamato.

El mecanismo de acción de la toxicidad del AD ocurre a nivel neuronal. El ácido domoico, al ser un análogo del glutamato (neuroexcitador) tiene una fuerte afinidad con sus receptores que están ampliamente distribuidos en el cerebro de mamíferos (concentrados en el hipocampo). La unión del AD a estos receptores estimula el disparo neuronal que conduce a la activación de los canales de calcio, lo cual provoca un desequilibrio en la homeostasis de iones intracelulares por el aumento en la concentración de Ca²⁺ (Jeffery et al., 2004). El resultado es hinchazón neuronal, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción neurológica, daño del ADN, agotamiento energético, daño mitocondrial y muerte de células nerviosas asociadas a la retención de la memoria, de ahí la pérdida de memoria característica del ASP (Zabaglo et al., 2016).

Anexo 2

Tabla 5. Profundidades de muestreo en la base de la termoclina por sitio y por temporada, en la Zona de las Grandes Islas, golfo de California.

Estación	20/ago/16	25/sep/16	23/oct/16	19/nov/16	21/ene/17	03/feb/17	08/mar/17	16/may/17
E1	6m	15m	5m	20m	s/d	15m	15m	15m
E2	26m	5m	20m	20m	s/d	15m	15m	3m
E3	10m	20m	30m	20m	s/d	15m	15m	12m
E4	21m	20m	20m	12m	s/d	15m	15m	17m
E5	28m	20m	20m	30m	s/d	15m	15m	20m
E6	10m	5m	20m	20m	s/d	15m	15m	5m
E7	6m	2m	20m	18m	s/d	15m	15m	20m

Anexo 3

Tabla 6. Lista de secuencias de ITS y LSU ADNr de *Pseudo-nitzschia* usadas en los análisis filogenéticos. En negritas se señalan a las cepas obtenidas en este estudio.

Especie	Cepa	Número de acceso NCBI	
		ITS ADNr	LSU ADNr
	Pn5-BLA		
	Pn1-BLA		
	Pn6-BLA		
<i>P. americana</i>	Kervel	EU523099	
	CV2		U41390
			KC017461
<i>P. arenysensis</i>	Ner-D1	GQ228393	
<i>P. australis</i>	PLYSt19A	AY452527	
	CV8		U41393
<i>P. brasiliana</i>	PnSm07	HQ111404	
	PnSm20		HQ111371
<i>P. batesiana</i>	PnTb19	KC147514	KC147534
<i>P. caciantha</i>	AL-56	DQ813834	DQ813812
<i>P. calliantha</i>	AL-112	DQ813841	DQ813815
<i>P. circumspora</i>	PnSb58	JN252430	KC147533
<i>P. cuspidata</i>	AL-17	DQ813827	DQ813809
<i>P. decipiens</i>	Mex13	DQ336156	EF506608
<i>P. delicatissima</i>	AL-22		DQ813810
	Tasm10	AY257840	
<i>P. fraudolenta</i>	Limens1	AY257840	AF417647
<i>P. fryxelliana</i>	NWFSC241	JN050288	JN050296
<i>P. fukuyoi</i>	PnKk36	KC147517	JN252436
<i>P. galaxiae</i>	Mex23	AY257850	AY081136
<i>P. grannii</i>	UBC100	EU051654	
<i>P. hasleana</i>	NWFSC186	JN085962	JN050299
<i>P. inflatula</i>	No7	DQ329204	AF417639
<i>P. lineola</i>	NWFSC188	JN091756	JN050300
<i>P. lundholmiae</i>	PnTb10	KC147523	KC147538
<i>P. mannii</i>	AL-101	DQ813839	DQ813814
<i>P. micropora</i>	PnKk14	JN252422	JN252433
<i>P. multiseris</i>	CV19		U41389
	mu3	AY257844	
<i>P. multistriata</i>	SZN-B27		AF416753
	KoreaA	AY257843	
	CM2	DQ990368	
	B5	EF636677	
	A/B4	EF636681	
	Ps91	KP941047	
	HY28C8	LC194951	

Tabla 6. Continuación. Lista de secuencias de ITS y LSU ADNr de *Pseudo-nitzschia* usadas en los análisis filogenéticos. En negritas se señalan a las cepas obtenidas en este estudio.

Especie	Cepa	Número de acceso NCBI	
		ITS	LSU
<i>P. obtusa</i>	T5	DQ062667	
<i>P. pungens</i>	PnMt45	HQ111412	
	PnSb48		HQ111384
<i>P. pseudodelicatissima</i>	P-11	AY257864	AF417640
<i>P. seriata</i>	PLYSt52B	AY452524	AY452526
<i>P. subcurvata</i>	1-F		DQ329205
<i>P. subfraudolenta</i>	rensubfrau		AF417646
<i>P. subpacifica</i>	RdA8	AY257860	AF417642
<i>P. turgidula</i>	NWFSC220	JN091764	
<i>Fragilariopsis nana</i>	ErikaFcyl	AF660059	
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	VSP974-1		AF417675

Anexo 4

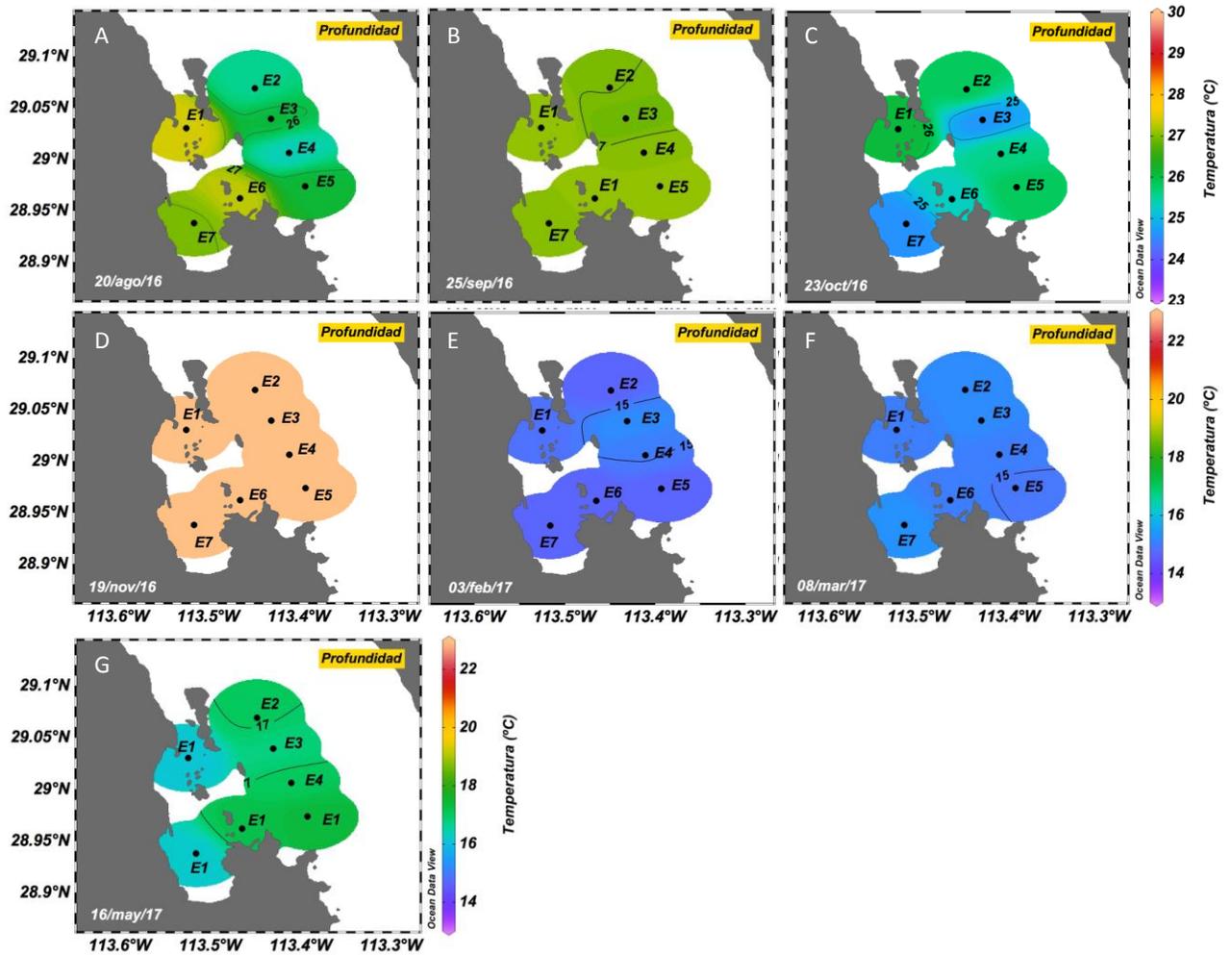


Figura 40. Variación espacio-temporal de la temperatura en la base de la termoclina dentro para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) Periodo de verano; (D-F) Periodo invierno; (G) mes de transición.

Anexo 5

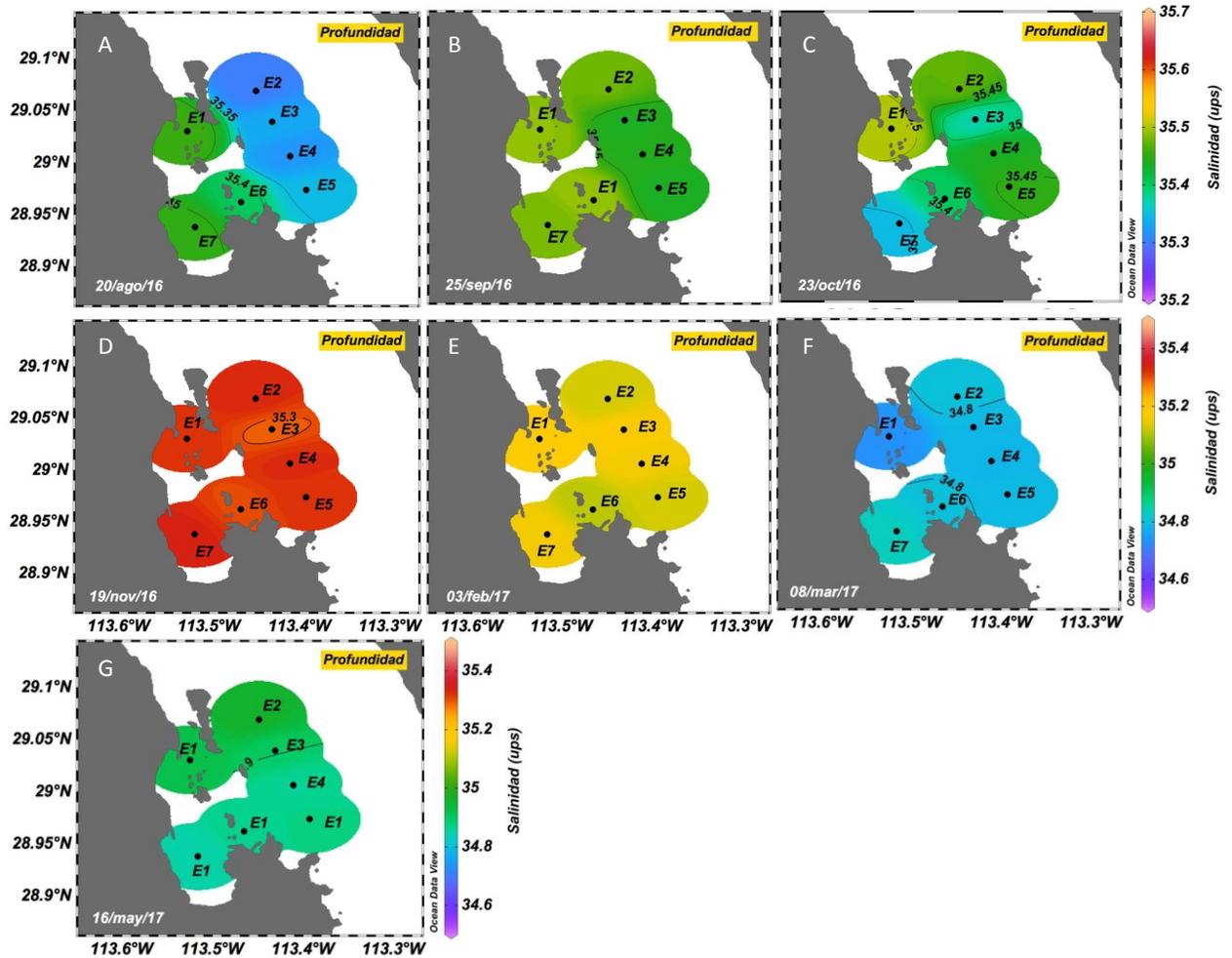


Figura 41. Variación espacio-temporal de la salinidad en la base de la termoclina para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) Periodo de verano; (D-F) Periodo de invierno; (G) mes de transición.

Anexo 6

Tabla 7. Concentración máxima y promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de verano. Clorofila c_3 (Chl c_3), clorofila c_2 (Chl c_2), peridinina (Per), 19'-butanoilfucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), diatoxantina (Diat), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).

Pigmento	20/ago/16				25/sep/16				23/oct/16			
	Om		Termoclina		Om		Termoclina		Om		Termoclina	
	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}
<i>Chl c3</i>	0.128	0.062	0.097	0.054	0.273	0.099	0.570	0.193	0.114	0.074	0.232	0.118
<i>Chl c2</i>	0.438	0.186	0.103	0.038	0.954	0.325	0.349	0.096	0.307	0.166	0.318	0.134
<i>Per</i>	0.139	0.054	0.068	0.038	0.182	0.062	0.254	0.078	0.375	0.073	0.055	0.018
<i>19-But</i>	0.025	0.005	0.022	0.006	0.024	0.003	0.022	0.005	0.042	0.029	0.040	0.020
<i>Fuc</i>	0.897	0.498	0.625	0.381	1.193	0.619	5.647	1.957	1.583	0.613	1.651	0.634
<i>Pras</i>	0.023	0.009	0.031	0.005	0.000	0.000	0.024	0.003	0.045	0.010	0.038	0.018
<i>Vio</i>	0.040	0.008	0.026	0.004	0.059	0.008	0.000	0.000	0.023	0.008	0.020	0.005
<i>19-Hexa</i>	0.122	0.081	0.128	0.042	0.115	0.060	0.129	0.072	0.250	0.091	0.124	0.079
<i>Diadino</i>	0.094	0.053	0.069	0.030	0.349	0.105	0.187	0.084	0.334	0.074	0.121	0.041
<i>Allo</i>	0.071	0.024	0.017	0.007	0.072	0.027	0.170	0.044	0.041	0.021	0.032	0.023
<i>Diat</i>	0.023	0.010	0.008	0.001	0.031	0.006	0.086	0.028	0.036	0.017	0.000	0.000
<i>Zea</i>	0.100	0.067	0.079	0.037	0.087	0.059	0.053	0.037	0.213	0.121	0.098	0.044
<i>Chl b</i>	0.109	0.077	0.150	0.050	0.437	0.158	0.111	0.056	0.378	0.105	0.143	0.113
<i>Dv Chl a</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.009	0.026	0.014
<i>β-caro</i>	0.055	0.033	0.032	0.021	0.178	0.074	0.100	0.049	0.106	0.044	0.067	0.039

Tabla 8. Concentración máxima y promedio de de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de invierno. Clorofila c_3 (Chl c_3), clorofila c_2 (Chl c_2), peridina (Per), 19'-butanoilfucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), diatoxantina (Diat), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).

Pigmento	19/nov/16				03/feb/17				08/mar/17			
	0m		Termoclina		0m		Termoclina		0m		Termoclina	
	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}
<i>Chl c3</i>	0.138	0.100	0.147	0.082	0.034	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.064	0.009
<i>Chl c2</i>	0.570	0.384	0.457	0.314	0.095	0.068	0.317	0.129	0.140	0.083	0.145	0.095
<i>Per</i>	0.077	0.034	0.053	0.022	0.127	0.068	0.143	0.060	0.063	0.040	0.074	0.044
<i>19-But</i>	0.027	0.021	0.020	0.014	0.014	0.008	0.012	0.004	0.015	0.010	0.011	0.007
<i>Fuc</i>	1.185	0.736	1.459	0.911	0.472	0.259	2.453	0.819	1.015	0.407	1.068	0.427
<i>Pras</i>	0.027	0.004	0.000	0.000	0.030	0.024	0.034	0.022	0.064	0.053	0.059	0.049
<i>Vio</i>	0.087	0.045	0.065	0.048	0.037	0.022	0.060	0.024	0.064	0.046	0.202	0.064
<i>19-Hexa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.090	0.067	0.077	0.031	0.118	0.045	0.100	0.044
<i>Diadino</i>	0.292	0.042	0.158	0.055	0.125	0.090	0.264	0.122	0.241	0.121	0.145	0.076
<i>Allo</i>	0.260	0.067	0.077	0.032	0.123	0.067	0.167	0.069	0.315	0.171	0.274	0.183
<i>Diat</i>	0.031	0.008	0.020	0.005	0.017	0.009	0.014	0.007	0.033	0.022	0.020	0.014
<i>Zea</i>	0.044	0.019	0.049	0.021	0.030	0.015	0.015	0.011	0.062	0.033	0.043	0.026
<i>Chl b</i>	0.205	0.071	0.073	0.058	0.190	0.130	0.229	0.140	0.280	0.193	0.310	0.216
<i>Dv Chl a</i>	0.114	0.032	0.081	0.040	0.040	0.022	0.111	0.029	0.031	0.016	0.049	0.023
<i>β-caro</i>	0.079	0.026	0.054	0.031	0.073	0.047	0.131	0.061	0.121	0.077	0.096	0.063

Tabla 9. Concentración máxima y promedio de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$) de la Zona de las Grandes Islas durante el periodo de transición. Clorofila c_3 (Chl c_3), clorofila c_2 (Chl c_2), peridinina (Per), 19'-butanoiloxifucoxantina (19-But), fucoxantina (Fuc), prasinoxantina (Pras), violaxantina (Vio), 19'-hexa-fucoxantina (19-Hexa), diadinoxantina (Diadino), aloxantina (Allo), zeaxantina (Zea), clorofila b (Chl b), divinil clorofila a (DVChl a), clorofila a (Chl a) y β -caroteno (β -caro).

Pigmento	16/may/17			
	0m		Termoclina	
	Max	\bar{x}	Max	\bar{x}
<i>Chl c3</i>	0.116	0.040	0.064	0.033
<i>Chl c2</i>	0.085	0.028	0.548	0.128
<i>Per</i>	0.320	0.111	0.067	0.034
<i>19-But</i>	0.018	0.009	0.011	0.006
<i>Fuc</i>	0.255	0.057	0.896	0.206
<i>Pras</i>	0.047	0.035	0.053	0.035
<i>Vio</i>	0.166	0.066	0.181	0.080
<i>19-Hexa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Diadino</i>	0.324	0.133	0.226	0.116
<i>Allo</i>	0.064	0.040	0.135	0.042
<i>Diato</i>	0.036	0.026	0.013	0.005
<i>Zea</i>	0.044	0.015	0.029	0.008
<i>Chl b</i>	0.048	0.032	0.091	0.050
<i>Dv Chl a</i>	0.026	0.016	0.030	0.017
<i>β-caro</i>	0.136	0.053	0.049	0.036

Anexo 7

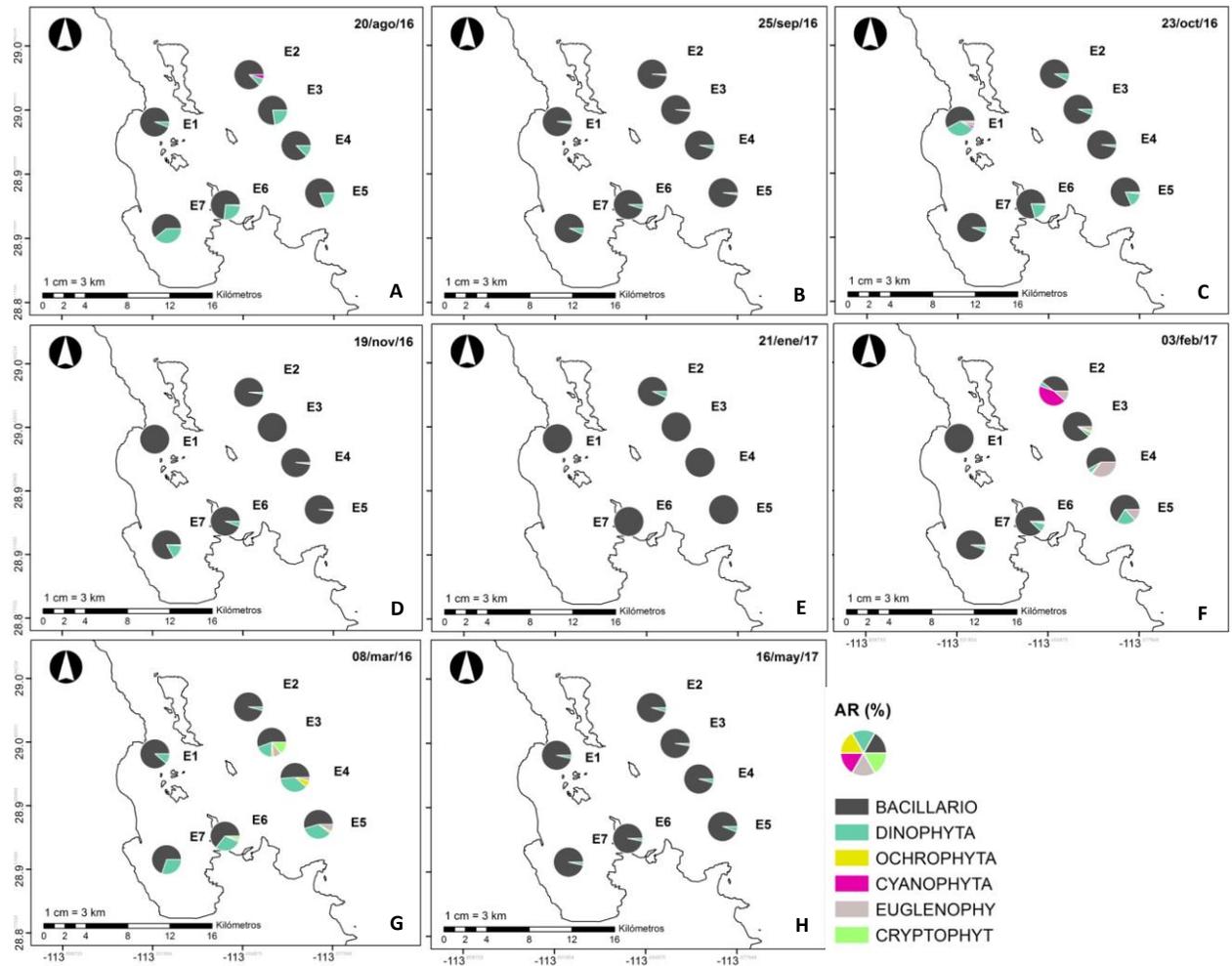


Figura 42. Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton en superficie para la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

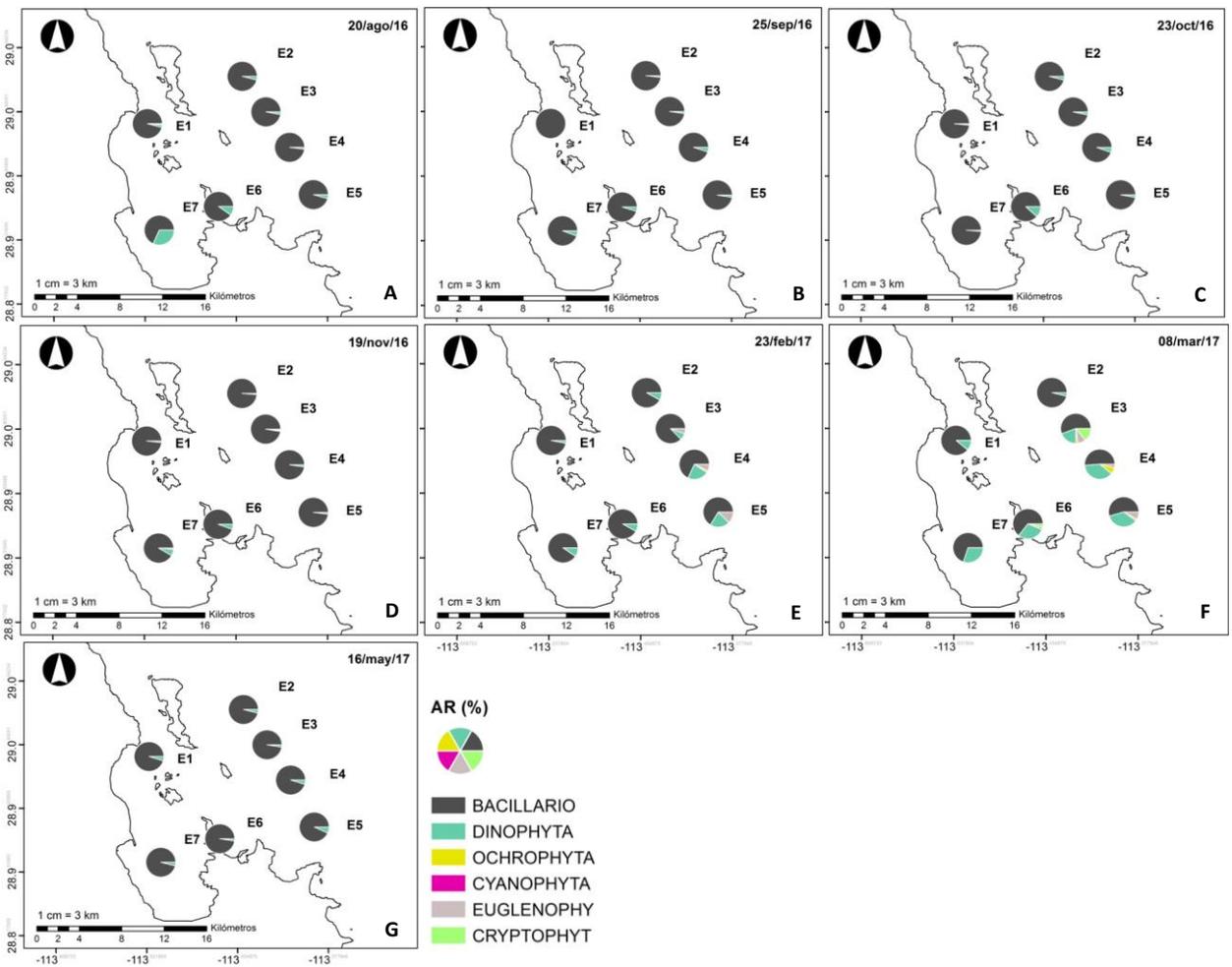


Figura 43. Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton en la base de la termoclina de la Zona de las Grandes Islas, golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.

Anexo 8

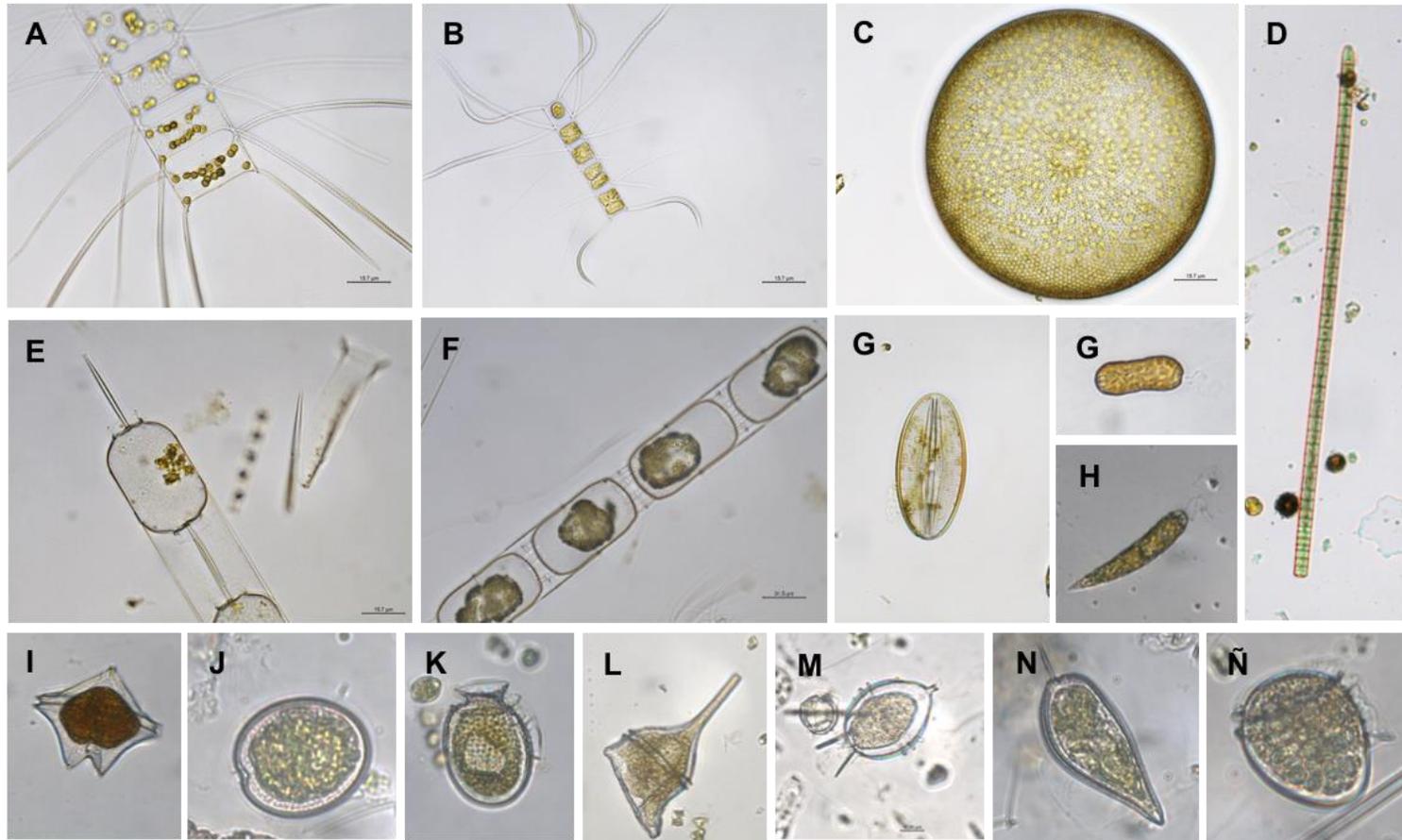


Figura 44. Especies fitoplanctónicas más abundantes en ambas zonas de estudio. (A-B) *Chaetoceros* spp.; (C) *Coscinodiscus* sp.; (D) *Trichodesmium* sp.; (E) *Ditylum* sp. ; (F) *Stephanophixys* sp.; (G) *Navicula* sp.; (G) Rafidofita; (H) Euglenofita; (I) *Protoperidinium* sp.; (J) *Prorocentrum* sp.; (K) *Dynophysis* sp. (L) *Ceratium* sp.; (M) *Protoperidinium* sp.; (N) *Prorocentrum* sp.; (Ñ) *Phalacroma* sp.

Anexo 9

Tabla 10. Matriz de entrada (Rotación Varimax) de los componentes principales. En negritas se señalan las entradas con correlaciones > 0.70. (CP) componente principal.

Variable	CP1	CP2
Temperatura	0.08	0.98
Salinidad	0.09	0.99
NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻	0.89	-0.04
NH ₄	0.78	0.06
PO ₄ ³⁻	0.85	0.18
SiO ₂	0.80	0.30

Anexo 10

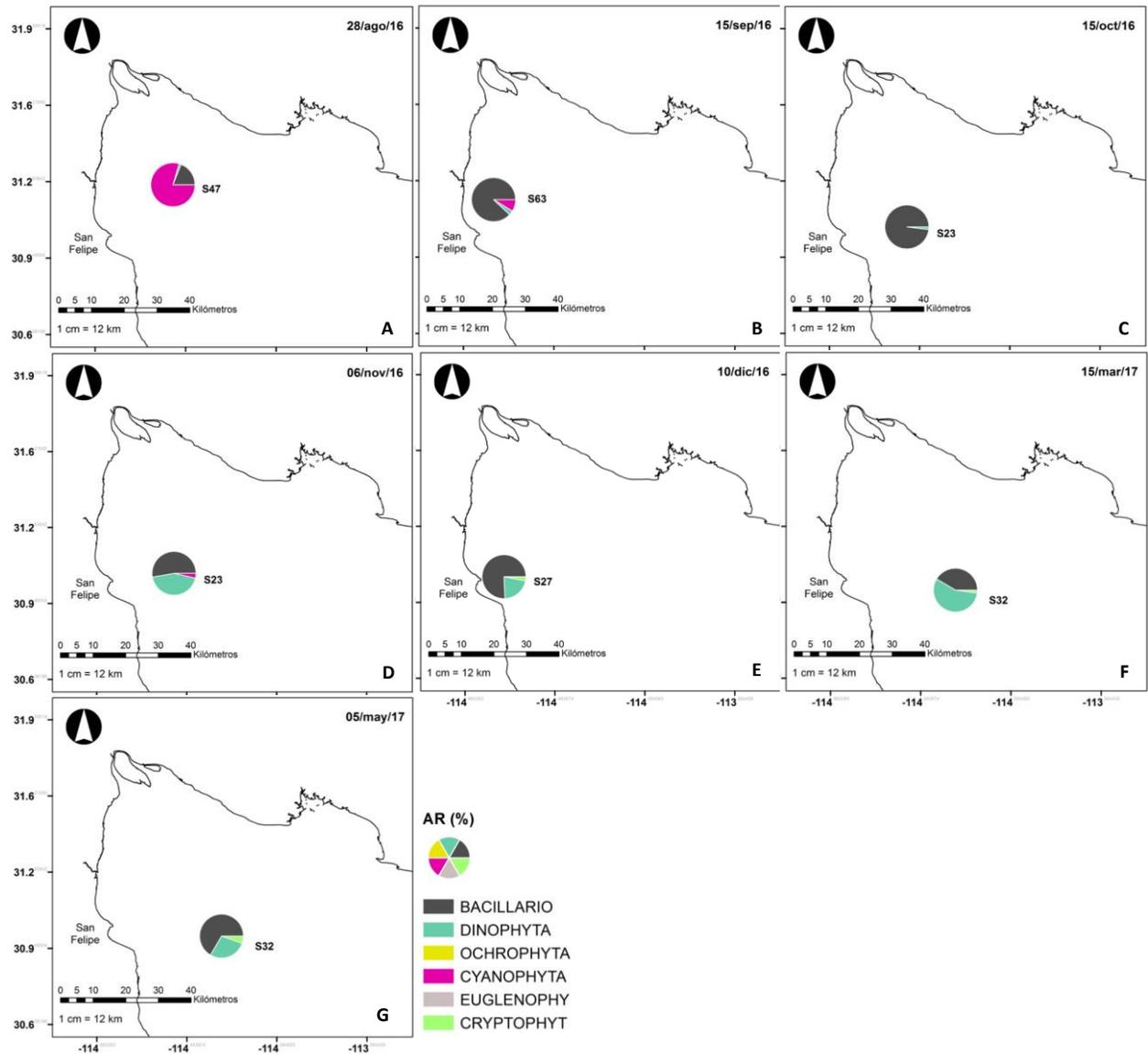


Figura 45. Variación espacial y temporal de la abundancia relativa (AR) del fitoplancton del Alto Golfo de California. (A-C) periodo de verano, (D-G) periodo de invierno, (H) mes de transición.