



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

DIRECTOR DE MEMORIA

DR. PABLO VALENZUELA VALDES

FUNDACIÓN CIENCIA PARA LA VIDA

PROFESOR PATROCINANTE

DR. MARIO ROSEMBLATT SILBER

“GENÓMICA DE DINOFLAGELADOS TÓXICOS:  
PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENOTECAS DE  
ADN COMPLEMENTARIO DE *ALEXANDRIUM CATENELLA*”

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

DANIELA LORETO FUENTES CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE , Enero 2005

UCh - FC  
Biotecnología  
F. 954  
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“GENÓMICA DE DINOFLAGELADOS TÓXICOS: PREPARACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE GENOTECAS DE ADN COMPLEMENTARIO DE  
ALEXANDRIUM CATENELLA”.**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**DANIELA LORETO FUENTES CONTRERAS**

**Director de Memoria de Título**

Dr. Pablo Valenzuela Valdés

Dr. Mario Roseblatt Silver

Prof. Patrocinante

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Ariel Orellana López

Presidente Comisión

Dra. Mónica Vásquez Pérez



Santiago de Chile, Enero 2005

## AGRADECIMIENTOS

Luego de recorrer este camino, no quiero dejar de agradecer a aquellos que me ayudaron y apoyaron para llegar al final.... A los doctores Pablo Valenzuela y Mario Roseblatt por aceptarme en los laboratorios de la Fundación y guiar el desarrollo de mi tesis.

A Paulina Uribe, por su inmensa ayuda, por estar y poder contar contigo siempre y a Virginia por su apoyo tanto laboral como emocional, gracias Viki por acompañarme y sobre todo aguantarme en las etapas críticas.

Infinitas gracias papá y mamá por su entrega y amor incondicional, por enseñarme lo necesario para ser feliz, gracias a mis hermanos Javiera y Esteban por nacer y contagiarme esa alegría de vivir.

Quiero agradecer a las personas que conforman la fundación, milenio y bioschile por crear un valioso ambiente de calidez y buena onda, especialmente a Juanita y Bertsy por su amistad, consejos y ayuda en buenos y malos momentos, a Rodolfo por su espíritu de ayuda al tesista y grata conversación, a Tati por su valioso apoyo logístico y anímico, a Ale y Gloria por su buena disposición, a Verónica y Vivian por sus conocimientos y ayuda, a los chiquillos de quimérico por alegrarme el día a día, a Cecilia por acompañarnos en los momentos difíciles, a los laboratorios de milenio, biología molecular e inmuno por recibirme siempre en buena onda y proporcionarme conocimientos y materiales cuando lo necesité.

También quiero agradecer a mis amigos de la universidad, Mariela, Dani, Mirna, Bertsy, Marlene, Andrea, Diana, Pablo, Ale, Nilo, Andrés, César por

todos los momentos de alegrías, penas, logros y veraneos, que hemos compartido desde que nos conocimos y por compartir aquellas experiencias que nos han hecho crecer y madurar.

Quiero agradecer especialmente a Mabel, Sole y Pauli, por su valiosa amistad y por ayudarme a crecer....

# INDICE GENERAL

Agradecimientos.....	ii
Indice general.....	iv
Indice de figuras y tablas.....	vi
Abreviaturas .....	viii
Resumen.....	x
<i>Summary</i> .....	xii
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Floraciones Algales Nocivas (FAN).....	1
1.2 Características de los dinoflagelados.....	6
1.3 <i>Alexandrium catenella</i> .....	10
1.4 Objetivo general.....	15
1.5 Objetivos específicos.....	15
<b>2 Materiales y métodos</b> .....	<b>16</b>
2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de la cepa ACC07 de <i>Alexandrium catenella</i> .....	16
2.2 Obtención de cultivos axénicos.....	17
2.2.1 Cultivos axénicos.....	17
2.2.2 Recuento de bacterias.....	19
2.3 Preparación de genotecas de ADN complementario (ADNc).....	19
2.3.1 Purificación de ARN mensajero (ARNm).....	19

2.3.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	22
2.3.3 Purificación del ADNc.....	22
2.3.4 Ligación del ADNc al vector y empaquetamiento en fago $\lambda$ .....	23
2.3.5 Amplificación de las genotecas.....	23
2.3.6 Excisión <i>in vivo</i> del plasmidio pBluescript a partir del vector Uni-ZapXR .....	23
2.4 Obtención de clones recombinantes.....	24
2.5 Purificación de ADN plasmidial .....	25
2.6 Secuenciación de ADN plasmidial .....	26
2.7 Análisis de las secuencias obtenidas .....	26
<b>3 Resultados</b> .....	<b>28</b>
3.1 Cultivo de <i>Alexandrium catenella</i> .....	28
3.1.1 Curva de crecimiento del cultivo original .....	28
3.1.2 Obtención de cultivos axénicos.....	30
3.2 Elaboración de las genotecas.....	32
3.3 Obtención de clones recombinantes.....	36
3.4 Secuenciación y análisis de los clones recombinantes.....	39
3.4.1 Resultados generales.....	39
3.4.2 Distribución de grupos taxonómicos.....	42
3.4.3 Comparación de los grupos de ortólogos de secuencias conocidas.....	46
3.4.4 Genes conocidos encontrados.....	48
<b>4 Discusión</b> .....	<b>57</b>

5 Conclusión	63
6 Bibliografía	65

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del grupo de toxinas del Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) .....	4
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Alexandrium catenella</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Esquema de lavados y tratamientos con antibióticos para la obtención de cultivos axénicos de <i>A. catenella</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de cultivos de <i>A. catenella</i> y bacterias asociadas en cultivo original .....	29
<b>Figura 5.</b> Disminución de la concentración de bacterias después de sucesivos lavados y aplicación de antibióticos .....	30
<b>Figura 6.</b> Epifluorescencia de cultivos de <i>A. catenella</i> teñidos con Naranja de Acridina .....	31
<b>Figura 7.</b> Electroforesis del ARN total de <i>A. catenella</i> en gel de agarosa al 1.4% en condiciones desnaturantes .....	32
<b>Figura 8.</b> Fraccionamiento por tamaño de ADNc de <i>A. catenella</i> de la genoteca 1 .....	34
<b>Figura 9.</b> Primera selección de clones recombinantes mediante complementación $\alpha$ .....	36

<b>Figura 10.</b> Selección de clones recombinantes .....	37
<b>Figura 11.</b> ADN plasmidial de los clones seleccionados .....	38
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de secuencias significativas y su distribución en grupos taxonómicos en la genoteca 1 .....	44
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de secuencias significativas y su distribución en grupos taxonómicos en la genoteca 2 .....	45
<b>Figura 14.</b> Distribución de grupos funcionales de las secuencias conocidas de ambas genotecas de <i>A. catenella</i> .....	47
<b>Tabla I.</b> Grupos de proteínas ortólogas (COGs) .....	27
<b>Tabla II.</b> Etapas en la elaboración de la genotecas de <i>A. catenella</i> .....	35
<b>Tabla III.</b> Resultados generales de la búsqueda de secuencias homólogas conocidas en bases de datos .....	41
<b>Tabla IV.</b> Marcos de lectura abiertos de las secuencias no identificadas.....	41
<b>Tabla V.</b> Distribución grupos taxonómicos de secuencias homólogas conocidas de genotecas de <i>A. catenella</i> .....	43
<b>Tabla VI.</b> Distribución de grupos funcionales de las secuencias conocidas de genotecas de <i>A. catenella</i> .....	46
<b>Tabla VII.</b> Genes conocidos encontrados en la genoteca 1 .....	50
<b>Tabla VIII.</b> Genes conocidos encontrados en la genoteca 2 .....	54

## ABREVIATURAS

FAN: Floraciones Algas Nocivas.

VPM: Veneno Paralizante de Mariscos.

STX: Saxitoxina.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosomal.

EST: *Expressed sequence tags*.

rpm: Revoluciones por minuto.

dNTP: Deoxinucleótidos trifosfatos

Ci/mmol: Curie/mmol.

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

PCR: Reacción de Polimerasa en Cadena.

LB: Luria-Bertani.

COG: Grupos de ortólogos de proteínas.

CHSE: células de embrión de salmón Chinook.

pfu: Unidad formadora de placa.

pb: Pares de bases.

St: Estándar de peso molecular.

Sec.: Secuencia.

HSP90: *Heat Shock Protein 90*.

PCP: *Peridinin-chlorophyll protein*.

Col.: colaboradores.

kDa: kDalton

## RESUMEN

Las floraciones algales son fenómenos naturales que ocurren normalmente en los mares y aguas dulces del mundo. Algunas de estas floraciones pueden ser nocivas para el hombre y mamíferos superiores, debido que algunas de estas microalgas producen potentes toxinas, que pueden ser incluso letales para el hombre. Dichos episodios significan un gran impacto en salud e importantes pérdidas económicas, sociales y turísticas para la zona afectada.

El Veneno Paralizante de Marisco (VPM) es una de las más nocivas de estas toxinas, perteneciente a la familia de las saxitoxinas. En Chile, la principal especie productora de VPM es el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, presente en las regiones X, XI y XII.

Con el fin de obtener información respecto de la biología de esta especie, se decidió iniciar estudios genómicos en ella, para ello se elaboraron dos genotecas de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero obtenido de cultivos de *A. catenella*. La genoteca 1 se realizó a partir de un cultivo original que contenía  $3 \times 10^4$  bacterias asociadas por dinoflagelado, y la genoteca 2 a partir de un cultivo sometido a tratamientos de lavados y antibióticos, para eliminar las bacterias asociadas.

De las 1.264 secuencias totales obtenidas y analizadas sólo un 17.1% posee una homología aceptable (valor de  $E < 10^{-3}$  e identidad  $> 30\%$ ) con secuencias encontradas en GenBank. En la genoteca 2 se obtuvo un aumento

importante en el número de secuencias de dinoflagelados (de 3.4% a 33.3%) y una disminución en el número de secuencias de origen bacteriano (de 37.6% a 6.1%), esto muestra la importancia de trabajar con cultivos axénicos en este tipo de estudios.

Analizando los grupos de ortólogos de proteínas (COGs), la mayor parte de las secuencias con homología aceptable se clasifica en el grupo de función desconocida (38% en la genoteca 1 y 54% en la genoteca 2).

Entre los genes de dinoflagelados encontrados, los más relevantes son: citocromo b y c, gliceraldehido-3P deshidrogenasa, ARNr, HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) y PCP (*peridinin-chlorophyll protein*), estos genes son importantes en estudios filogenéticos y en evolución de la endosimbiosis secundaria en dinoflagelados.

En general, los resultados de esta genoteca concuerdan con aquellos obtenidos por otros autores en genómica de dinoflagelados, debido principalmente a la carencia de información a nivel molecular, específicamente en la cantidad de genes secuenciados e identificados de este grupo.

## SUMMARY

Algal blooms are natural phenomena that usually occur in oceanic and fresh waters. Some of these blooms are harmful to humans and other species due to the potent toxins that some microalgae produce. Those toxic events cause a great impact on public health as well as important economics, social and touristic damage in the affected area.

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) is one of the most harmful Red Tides toxins, a member of the saxitoxin family. In Chile, the dinoflagellate *Alexandrium catenella* is the algae responsible of PSP production. This species is present in the X, XI and XII region.

Genomic studies on *Alexandrium catenella* were initiated in order to obtain biological information of this species. With this objective, two cDNA (complementary DNA) libraries were prepared from *A. catenella* mRNA (messenger RNA). The cDNA library 1 was obtained from an original *A. catenella* culture containing  $3 \times 10^4$  bacteria/dinoflagellate, for the cDNA library 2, associated bacteria were eliminated from the dinoflagellates culture by successive washing and antibiotics treatments.

A total of 1264 sequences were obtained, 17.1% of them share an accepted homology (E value  $< 10^{-3}$  and identity  $> 30\%$ ) with sequences found in GenBank. Comparing both libraries, an important increase of dinoflagellate sequences (from 3.4% to 33.3%) and a decrease of bacterial sequences (from

37.6% to 6.1%) was obtained in the cDNA library 2. Those results demonstrate the importance of working with axenic cultures on this kind of studies.

Grouped in clusters of orthologous groups (COGs), the unknown function group contains the higher proportion of sequences with acceptable homology in both libraries (38% in the cDNA library 1 and 54% in the cDNA library 2).

Dinoflagellate genes corresponded to cytochrome b and c, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, rRNA, HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) y PCP (*peridinin-chlorophyll protein*), these genes are important for phylogenic and evolutionary studies of secondary endosymbiosis.

Finally, the results obtained here are in agreement with others authors on dinoflagellate genomics, regarding to the scarce dinoflagellates molecular data, specially on published known sequences and identified genes.

# **1.- Introducción**

## **1.1 Floraciones Algales Nocivas (FAN)**

Las floraciones algales son fenómenos naturales, se producen por la multiplicación explosiva de las algas microscópicas que constituyen el fitoplancton marino (Comité Oceanográfico Nacional, Chile, 1999). Estos organismos son, en la práctica, la principal puerta de entrada de energía solar en los ecosistemas marinos y principal fuente alimentaria de moluscos bivalvos filtradores (ostras, choritos, cholgas, almejas, etc.), en conjunto con larvas de crustáceos y peces pequeños. El crecimiento de las poblaciones fitoplanctónicas depende de la ganancia o pérdida neta de energía que resulta del balance entre fotosíntesis y respiración. Los factores reconocidos como principales reguladores de la fotosíntesis en el mar son: la luz solar (intensidad, duración, longitud de onda, penetración en la columna de agua), las concentraciones de nutrientes (principalmente material orgánico disuelto nitratos, fosfatos, y eventualmente silicatos) y la profundidad de la capa de mezcla (Margalef, 1958). La variabilidad de estos factores es lo que determina, que el fitoplancton presente variaciones cuantitativas y cualitativas, relativamente propias, en determinadas áreas y períodos de tiempo en el océano. Las observaciones regulares en un mismo lugar han mostrado que existen variaciones en el curso de un año, y que generalmente se repiten de un año a otro mostrando un "ciclo anual" característico (Bougis, 1974; Alvial, 1980). Las proliferaciones de primavera en las aguas templadas han sido objeto de

numerosos estudios, y de ellos se puede concluir que, en general, el mecanismo que las regula se basa en la acumulación de nutrientes durante el otoño-invierno debido a una mayor homogeneidad térmica de la columna de agua, lo que favorece su difusión y mezcla hacia los niveles superficiales. Es por ello que este aporte de nutrientes a las aguas superficiales y el aumento de la radiación solar, activan la proliferación de primavera. En cuanto a la finalización de los florecimientos algales, generalmente ha estado asociado a la reanudación de vientos, procesos de mezclas y a una disminución de la temperatura y la radiación en el agua de mar (Muñoz y Alvial, 1988).

Normalmente una proliferación algal masiva (que puede llegar a millones de células por litro) es beneficiosa para la acuicultura y las operaciones de pesca. Sin embargo, en ocasiones, puede acarrear efectos muy negativos para la salud humana y causar grandes pérdidas económicas y daño social. Dependiendo del microorganismo causante, las FAN pueden tener carácter tóxico o no. En estas últimas, su efecto nocivo es fundamentalmente mecánico, se generan grandes mortandades de peces por asfixia debido a la obturación de sus branquias o por reducción drástica del oxígeno disuelto en el agua, en otros casos se generan grandes cantidades de espuma afectando, además, el valor recreacional de la zona afectada. Las floraciones tóxicas pueden generar daño a organismos vertebrados superiores, incluido el hombre, debido a la producción de toxinas cuyos efectos pueden ser incluso de carácter letal (Comité Oceanográfico Nacional, Chile, 1999). Entre las 5.000 especies de fitoplancton marino, alrededor de 300 especies son capaces de producir un cambio de coloración en la superficie marina ante una proliferación masiva

(fenómeno conocido como Marea Roja), mientras que sólo 40 de ellas tienen la capacidad de producir las potentes toxinas que llegan al hombre a través de moluscos y peces. Entre estas microalgas se incluyen dinoflagelados, diatomeas, prymnesiófitas y rafidófitas. Las microalgas nocivas y con ellas sus toxinas, son concentradas en el aparato digestivo de dichos organismos, llamados transvectores que son, finalmente, consumidos por el hombre (Comité Oceanográfico Nacional, Chile, 1999). El grado de intoxicación en el hombre depende de la cantidad de moluscos consumidos, del nivel de toxina concentrada por éstos y de la potencia de la toxina del dinoflagelado responsable de la Marea Roja (Avaria y Muñoz, 1986).

Hasta la fecha, han sido descritos 4 grupos de toxinas en dinoflagelados (Shumway, 1990). El primero es el VPM (Veneno Paralizante de Mariscos), o PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), que actúa bloqueando canales de sodio y por lo tanto interfiere con la conducción neuromuscular (Kao, 1993). El segundo es el VDM (Veneno Diarreico de Moluscos), el cual afecta el aparato digestivo del hombre. El tercero corresponde al VNM (Veneno Neurotóxico de Moluscos), cuyas toxinas producen síntomas neurotóxicos sin llegar a consecuencias fatales y finalmente, el VAM (Veneno Amnésico de Moluscos) que está compuesto por ácido domoico el cual también causa severos trastornos neurológicos.

En Chile, la floración algal nociva que más afecta al país es la relacionada con la especie llamada *Alexandrium catenella*. Este dinoflagelado es el principal responsable de la producción de Veneno Paralizante de

Mariscos en Chile. Dicho veneno, ha ocasionado hasta la fecha 321 casos de intoxicación, con un saldo de 20 muertes.

([http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea\\_Roja.html](http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea_Roja.html)).

Las toxinas del VPM son neurotoxinas solubles en agua que poseen una acción específica y directa sobre nervios periféricos y músculos esqueléticos bloqueando los canales de sodio en la membrana excitable de la célula. Las muertes humanas resultantes del consumo de mariscos contaminados son causadas por falla respiratoria resultante de una parálisis periférica (Avaria y Muñoz, 1986). No existe ningún antídoto conocido para las toxinas del VPM y el tratamiento se limita a ventilación mecánica en situaciones de riesgo vital. Las toxinas del VPM consisten en un grupo de derivados relacionados estructuralmente, los cuales varían en su potencia. Las más potentes son las toxinas carbamatos (incluyendo saxitoxina, STX, neosaxitoxina, NSP, y gonyautoxinas, GTXs), las de potencia intermedia son las toxinas decarbamoil, y las menos potentes son las toxinas N-sulfocarbamoil (toxinas B y C) (Shimizu, 1996) (Figura 1).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
STX	H	H	H	OCNH <sub>2</sub>
GTX II H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	"	"
GTX III H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	"	"
NEO	OH	H	H	"
GTX I OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	"	"
GTX IV OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	"	"
C1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	"
C2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	"
C3	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	"
C4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	"
dc-STX H	H	H	OH	"

**Figura 1.** Estructura del grupo de toxinas del Veneno Paralizante de Mariscos (VPM)

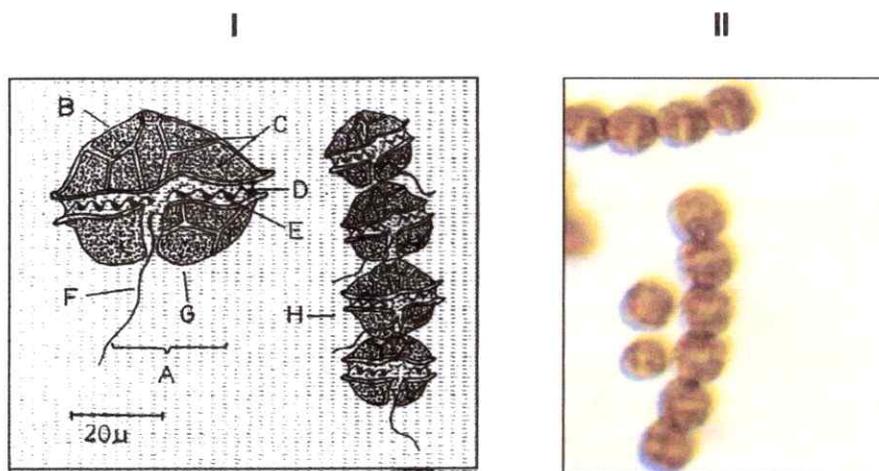
El impacto negativo de las FAN es bastante considerable, ya que año tras año cobran vidas humanas, siendo además, mariscos de importancia comercial los transvectores más comunes. Por esta razón, un fenómeno de este tipo implica una paralización temporal en la actividad extractiva y, por lo tanto, se genera un gran daño a nivel social, económico y turístico en la zona afectada.

En Chile el fitoplancton posee especies inocuas a lo largo de todo el litoral y nocivas en las regiones de Los Lagos (X región), de Aysén (XI región) y en la región de Magallanes (XII región) ([http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea\\_Roja.html](http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea_Roja.html)). En el país, en la última década las FAN han experimentado un sostenido aumento en su frecuencia, intensidad y área de impacto, abarcando actualmente la zona costera comprendida entre Castro, en el mar interior de Chiloé, hasta el sur del Canal Beagle. En la XI región, la persistencia del VPM durante los últimos años, ha mantenido cerrada las pesquerías artesanales y la acuicultura de mariscos, lo que además ha llevado al desaparecimiento de ambas actividades y a una fuerte emigración de la zona. Durante el verano-otoño de 2002 se observó por primera vez un evento FAN en la zona de Chiloé, lo que significó un fuerte impacto económico y social que afectó directamente a alrededor de un cuarto de la población total de la isla. El efecto de las FAN sobre la actividad de extracción y cultivo de especies marinas es de enorme importancia si consideramos que en Chile la acuicultura se ha transformado en un motor de desarrollo para las regiones australes, con retornos superiores a los US\$1.300

millones anuales y generación de más de 50.000 empleos directos e indirectos ([http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea\\_Roja.html](http://www.fondef.cl/fondef/informativo/Marea_Roja.html)).

## 1.2 Características de los dinoflagelados

Uno de los principales productores las toxinas de las FAN son los dinoflagelados, microalgas del reino protista, división algal *Pyrrhophyta* (algas rojas). Su rango de tamaño va desde 5  $\mu\text{m}$  a 2mm., dependiendo de la especie. Los dinoflagelados están cubiertos por una cobertura compleja llamada amphiesma, la cual está compuesta por 2 membranas continuas, interna y externa. Entre éstas se encuentra una serie de vesículas aplanadas que contienen placas de celulosa llamadas tecas, las que están estrechamente ensambladas formando un firme y fuerte esqueleto periférico. El término dinoflagelado significa flagelo en rotación. Estas especies poseen 2 flagelos, insertos en su pared celular, a través de poros flagelares. Uno de ellos tiene aspecto de cinta y se encuentra ubicado bordeando la célula de manera transversal (flagelo transversal), el otro es el flagelo longitudinal que se extiende tangencialmente a la célula, perpendicular al plano del flagelo transversal. El flagelo transversal es alrededor de 2 o 3 veces más largo que el longitudinal. Ambos ayudan al movimiento del organismo: el longitudinal causa un empuje directo hacia delante, mientras que el transversal provee un movimiento de natación en espiral. (<http://jeevz.tripod.com/dinoflagellates/id1.html>) (Figura 2).



**Figura 2. Morfología de *Alexandrium catenella*.**

I. Dibujo esquemático de *A. catenella*. A.-Célula aislada, B.-Epiteca, C.-Placas. D.-Cíngulum, E.-Flagelo transversal, F.-Flagelo longitudinal, G.-Hipoteca, H.-Cadena de células. II. Cadena de células vivas de *A. catenella* (contribución Paulina Uribe).

En cuanto a su sistema de nutrición, han sido descritos dinoflagelados de tipo autótrofos, heterótrofos, parásitos y simbioses (<http://www.biology.hawaii.edu/bio171/Notes/protists%201%20Plant-like%20Protists.htm>). Los dinoflagelados fotosintéticos poseen básicamente 2 tipos de pigmentos, clorofila y carotenoides, específicamente clorofila *a*, *c* y peridininina (Rae, 1976).

Los dinoflagelados son células haploides en su estado vegetativo (Von Stosch, 1972; Allen y col., 1975). Poseen ambos tipos de reproducción, sexual y asexual. Durante la reproducción sexual, las células móviles producen gametos, los cuales se unen en un estado plano-zigoto (<http://jeevz.tripod.com/dinoflagellates/id1.html>). En algunas especies, el plano-



zigoto puede sufrir transformaciones morfológicas y fisiológicas que dan lugar a la formación de quistes (hypnozigoto). Algunos dinoflagelados como *Gymnodinium catenatum*, (Blackburn y col., 1989) son heterotáticos, es decir, la reproducción sexual y la formación de quistes ocurre solamente cuando se juntan clones o células genéticamente diferentes. Otras especies en cambio (ej. *Peridinium* sp., *Scrippsiella trochoidea*) son homotáticos y la formación de quistes puede ocurrir entre células pertenecientes a un mismo clon. Los quistes formados son más resistentes a condiciones adversas, corrosión química y/o digestión. Una vez completado el período de dormancia, el protoplasma deja el quiste fosilizado y construye una nueva célula, la cual sigue reproduciéndose de manera vegetativa (<http://jeevz.tripod.com/dinoflagellates/id1.html>).

Los dinoflagelados son eucariontes con un ciclo celular con las fases G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M (Raikov, 1995; Soyer-Gobillard, 1996), que poseen ciertas características nucleares inusuales, tales como un alto contenido de ADN genómico (2-200 pg/núcleo, dependiendo de la especie) (Rae, 1973); un envoltorio nuclear permanente, un huso mitótico extra-nuclear y cromosomas unidos a la membrana nuclear por segregación (Raikov, 1995; Soyer-Gobillard, 1996). Probablemente el rasgo más sobresaliente de los dinoflagelados es la morfología y estructura de sus cromosomas. Los filamentos de ADN están empaquetados en cromosomas que varían en número de 4 a 200, dependiendo de la especie. Los cromosomas de la mayoría de los dinoflagelados están descritos como permanentemente condensados durante el ciclo celular, aunque poseen un período S definido en la síntesis de ADN en el ciclo celular (Herzog y col., 1984). El ADN de dinoflagelados está organizado en dos regiones

cromosómicas. Una es el cuerpo principal, que contiene el ADN genéticamente inactivo y juega un rol tanto en la mantención de la estructura cromosómica, como en la unión del ADN a las proteínas de matriz. La otra región se conoce como periférica difusa, que contiene el ADN activo en transcripción (Sigee, 1984). Las hebras de cromatina poseen un diámetro de 3 a 6 nm (Soyer y Puiseux-Dao, 1968). Se ha demostrado la existencia de un bajo contenido de proteínas básicas  $M_r$  en los núcleos de los dinoflagelados (sólo un 10% de la masa de ADN), las cuales muestran menor afinidad por el ADN que la mayoría de las histonas eucariontes (Vernet y col., 1990; Sala-Rovira y col., 1991). Aunque se sabe que el ADN eucarionte contiene ciertas bases modificadas tales como 5-metilcitosina y la menos común  $N^6$ -metiladenina, los dinoflagelados son los únicos eucariontes que poseen 5-hidroximetiluracilo (HOMeU) (Rae y Steele, 1978; Rae, 1973). HOMeU constituye de un 4% a un 19% del total de bases y reemplaza al 12-70% de la timina (Rae, 1976). Las cantidades relativas de HOMeU en los dinoflagelados varían considerablemente según la especie. La organización del ADN en los cromosomas incluye la presencia de ADN satélites (Rae, 1973) y secuencias repetidas interespaciadas con secuencias no repetidas (Allen y col., 1975).

Los dinoflagelados juegan un rol ecológico significativo en los mares, existiendo evidencia paleontológica de que han sido el grupo fitoplanctónico dominante desde el período Jurásico (Loeblich, 1976). Los rasgos especiales de la estructura y organización del núcleo, cromosomas y ADN, como se mencionó anteriormente, lo hacen diferente de la mayoría de los eucariontes. Esto ha llevado a muchos autores a asignarles una posición antigua dentro del

*phylum*, el cual podría haber emergido cerca de la base de la rama de los eucariontes (Loeblich, 1984). Sin embargo, los resultados de la comparación de las secuencias del ARN ribosomal 24-28S indican una aparición más bien tardía de los dinoflagelados, los cuales representan un grupo monofilético con una relación cercana a las levaduras y los ciliados (Sala-Rovira y col., 1991; Lenaers y col., 1991). El análisis de los árboles filogenéticos basados en datos de secuencias del RNA ribosomal 5S indica que el linaje de los dinoflagelados se une a la rama de los eucariontes en el punto de la divergencia entre los reinos plantas y animales (Cavalier-Smith, 1981).

### **1.3 *Alexandrium catenella***

Entre los dinoflagelados, *Alexandrium catenella* es el principal responsable de la producción de Veneno Paralizante de Mariscos en Chile. Este dinoflagelado se encuentra incluido en la clase Dinophyceae, orden Peridiniales, familia Gonyaulacaceae. Es una microalga autótrofa, relativamente pequeña (longitud total entre 28 y 40  $\mu\text{m}$ , ancho y diámetro 24-37  $\mu\text{m}$ ). Se caracteriza por ser de una forma ovoide, con una coloración pardo-rojiza. Posee ambos flagelos, transversal y longitudinal. Es un organismo de vida libre que, por lo general, se encuentra formando cadenas, las que durante proliferaciones, pueden tener 40 o más células (Lembeye y Guzmán, 1982).

En la Región de Magallanes esta especie se encuentra normalmente en concentraciones alrededor de 500 células por litro, durante todo el año, pudiendo sin embargo, desaparecer del fitoplancton durante el invierno (Lembeye y Guzmán, 1982). Quizás uno de los principales problemas con las

proliferaciones de *A. catenella*, aparte de su peligrosidad tóxica, es que se presenta en muchas ocasiones subsuperficialmente, no pudiéndose detectar oportunamente el fenómeno de discoloración (Guzmán y col., 1975).

En Chile, la especie ha sido descrita en el Estrecho de Magallanes (Campodónico y Guzmán, 1974; Guzmán y Campodónico, 1975; Campodónico y col., 1975; Guzmán, 1976), Puerto Natales (Lembeye, 1981a) y Seno Unión en Magallanes (Lembeye, 1981b). *A. catenella* se encuentra también a lo largo de la costa del Pacífico noroeste desde la Columbia Británica (Canadá) hasta California en los Estados Unidos (Gaines y Taylor, 1986) y en Asia (entre el Estrecho de Bering y el norte de Japón (Scholin y col., 1995) y Pacífico Sur asiático (Uribe y col., 1999)). El primer FAN reportado en Chile fue en 1972 en la región de Magallanes (Guzmán y Campodónico, 1975) y la especie de dinoflagelado tóxico dominante fue identificado por criterios morfológicos como *A. catenella* (Guzmán y Campodónico, 1978). Posteriormente, por comparación de secuencias de ARNr, esta cepa fue agrupada en el ribotipo del Pacífico Sur asiático (Uribe y col., 1999).

A nivel mundial, existe una gran controversia debido a la posible influencia de bacterias en la producción de toxinas por parte de los dinoflagelados. Utilizando la definición de simbiosis detallada por Werner (1992) las bacterias pueden ser consideradas como simbiontes de los dinoflagelados los cuales producen sustancias inhibitorias y estimuladoras para los otros, creando un complejo denominado "ficósfera" (Bell y Mitchell, 1972; Doucette y Trick, 1995). Existe una serie de trabajos enfocados al esclarecimiento de dicha interrelación, los cuales se basan fundamentalmente en la comparación de

producción de toxinas entre cultivos con las bacterias y cultivos axénicos. La mayoría de ellos carecen de evidencias concretas de la ausencia de bacterias en el cultivo, de un monitoreo apropiado del estado del cultivo durante los experimentos, y de evidencias definitivas de que las partículas tipo bacterias intra o extracelulares observadas en dinoflagelados sean efectivamente bacterias (Gallacher y Smith, 1999). Recientemente se ha demostrado que las bacterias extracelulares no influyen mayormente en la producción de toxinas en *A. catenella* en cultivo (Uribe y Espejo, 2003).

Aunque se conoce bastante de la estructura química y de los efectos de las saxitoxinas en humanos y moluscos, se sabe muy poco acerca de las rutas de biosíntesis y rol metabólico de dicha toxina en los dinoflagelados (Anderson D., comunicación personal). En cuanto a rutas biosintéticas de la saxitoxina, Shimizu (1993) ha propuesto una que contiene 9 pasos. Por otro lado Hosie (1998), sugirió que cada paso debe involucrar un correspondiente número de genes sumado a genes regulatorios. En una búsqueda de los genes involucrados en la biosíntesis de la saxitoxina, se compararon los patrones de ARNs mensajeros obtenidos de cultivos sincronizados de *Alexandrium fundyense*, en intervalos de producción y no producción de toxina. Se identificaron 2 genes transcripcionalmente regulados mediante la técnica de *Differential Display*. Sin embargo, los autores reconocen que no existe evidencia directa de que dichos genes estén efectivamente involucrados en la producción de toxinas (Taroncer-Oldenburg y Anderson, 1998).

A nivel mundial son muy pocos los trabajos realizados en secuenciación genética de dinoflagelados, los existentes se orientan principalmente a estudios

de filogenia basados en las secuencias de ARNs ribosomales (en género *Alexandrium* (Scholin y col., 1995; Zardoya y col., 1995)) y de proteínas como actina, tubulina y citocromo c oxidasa entre otras (Saldarriaga y col., 2003; Norman y Gray, 1997). Otros grupos están orientados a esclarecer la teoría de endosimbiosis secundaria y transferencia lateral de genes cromosomales y plastidiales entre eucariontes (Cavalier-Smith, 2003; Bhattacharya y col., 2003). También existen en las bases de datos, secuencias de ciertos genes interesantes como son por ejemplo, luciferasa (Okamoto y col., 2001, Liu y col., 2003), proteínas nucleares (Taroncher-Oldenburg y Anderson, 2000; Zhang y Lin, 2004), y algunas aproximaciones al mecanismo de expresión génica, por ejemplo factores de iniciación de la transcripción (Guillebault y col., 2002).

Considerando la enorme importancia social y económica que tienen los dinoflagelados para Chile y la evidente falta de información a nivel mundial, se hace necesario profundizar nuestro conocimiento acerca de la biología molecular e iniciar estudios genómicos en *A. catenella*. Los estudios genómicos se pueden desarrollar siguiendo diferentes caminos, uno de ellos es secuenciar el genoma completo del organismo, lo que se han realizado recientemente en animales, plantas y bacterias (actualmente existen más de 150 genomas bacterianos secuenciados publicados en las bases de datos de NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_g.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.html)). Considerando la cantidad de ADN descrito para el género *Alexandrium* ( $10^{10}$ - $10^{12}$  pares de bases, es decir, más de 100 veces el genoma humano (Anderson D., comunicación personal), este método resulta inviable. Un enfoque alternativo a ese, son las denominadas *Expressed Sequence Tags* (EST), secuencias

parciales obtenidas a partir de la secuenciación simple de ADNc (ADN complementario) elegidos al azar. De este modo se obtiene una representación de los genes que se están expresando en los individuos al momento de extraer su ARN, evitándose así secuenciar material irrelevante. Poseer una genoteca de ESTs (colección de ESTs) es una herramienta muy útil, ya que permite disponer de información directa para conocer los mecanismos utilizados por el dinoflagelado en procesos metabólicos, división celular, formación de quistes, síntesis de toxinas y otros. Además la genoteca es un excelente punto de partida para aislar y estudiar algunos genes específicos.

Actualmente existen algunos grupos a nivel mundial iniciando el desarrollo y secuenciación de genotecas de dinoflagelados, pero no de *A. catenella*, lo cual genera una mayor relevancia a este proyecto.

Para este estudio se ha elegido el aislado ACC07 de *A. catenella*, caracterizado a nivel de ribotipos (Uribe y col., 1999) y de composición de toxinas (determinadas por HPLC), este aislado es productor de saxitoxina, neosaxitoxina, gonyautoxina de la 1 a la 5 y carbamoil 1 y 2 (Lagos, 1998).

#### **1.4 Objetivo general**

- Obtención de información genética de *A. catenella* en base a la preparación y caracterización de genotecas de ADN complementario.

#### **1.5 Objetivos específicos**

- Cultivo de *A. catenella* (ACC07) y preparación de genoteca.
- Obtención de cultivo axénico de *A. catenella* (ACC07) y preparación de genoteca.
- Caracterización de las secuencias de ADN complementario obtenidas de ambas genotecas.
  - Análisis y comparación de las secuencias de ADN complementario con bases de datos internacionales.
  - Comparación de los resultados obtenidos en ambas genotecas

## 2.- Materiales y métodos

### 2.1 Cultivo *in vitro* de la cepa ACC07 de *Alexandrium catenella*

La cepa ACC07 de *A. catenella* fue aislada originalmente a partir de muestras fitoplanctónicas colectadas en abril de 1994 en el Canal Costa de la XI región de Chile (45° 32'S; 73° 34'W). Este clon fue gentilmente donado por Miriam Seguel, Universidad Austral, Puerto Montt. Las células se cultivaron en matraces de vidrio, en un incubador a 16°C con luz blanca y ciclos de luz:oscuridad de 10:14 horas. El medio de cultivo utilizado fue f/2 (Guillard, 1975) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), el cual fue disuelto en agua de mar previamente filtrada a 0.22µm y autoclavada. Luego de agregar los componentes del medio, fue nuevamente filtrado a 0.22 µm y almacenado a 4°C.

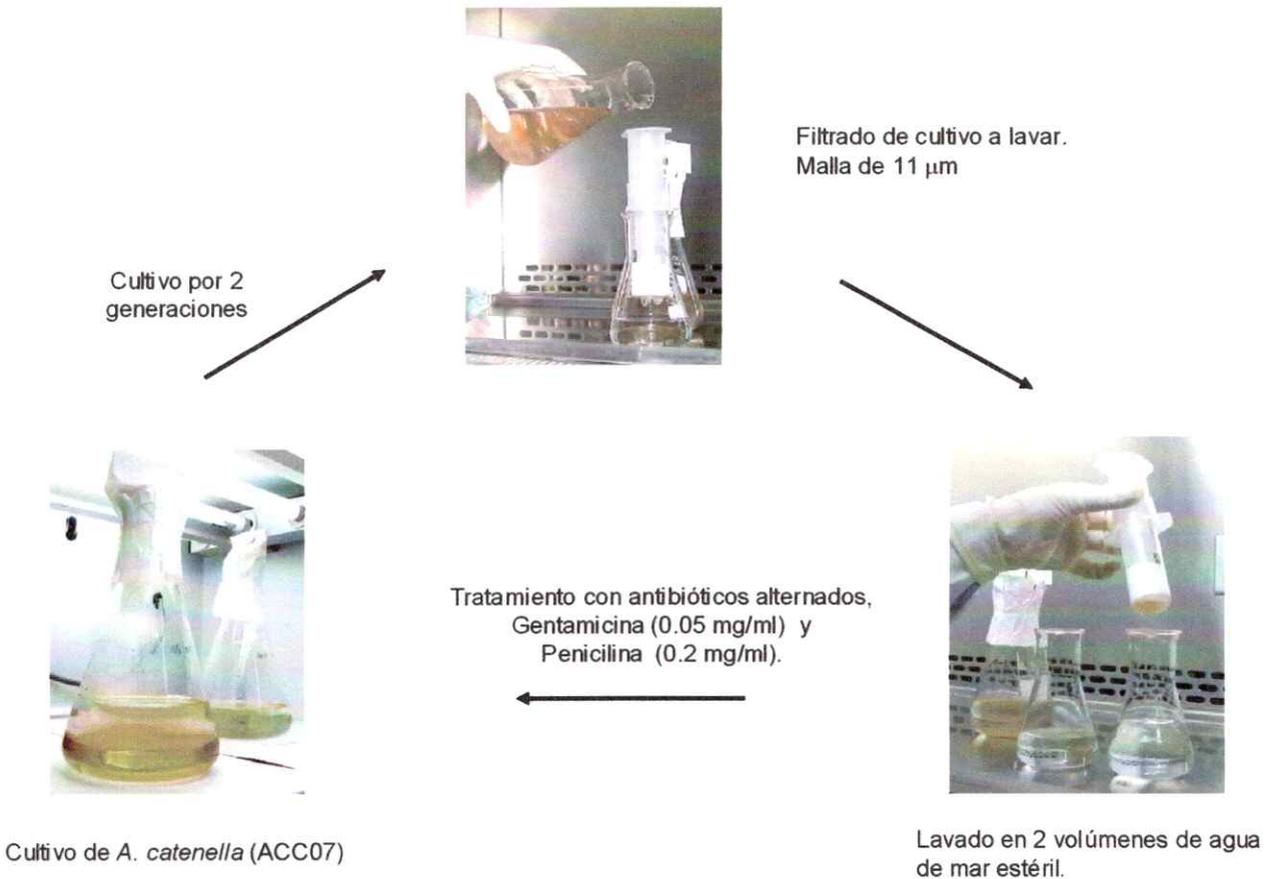
El recuento de dinoflagelados se realizó por observación directa en un microscopio Axioskop (Zeiss, Alemania) con objetivo 10x, en alícuotas de 10µl y en duplicado.

Uno de los parámetros utilizados para la caracterización del crecimiento de los dinoflagelados fue la Tasa de Crecimiento ( $\mu$ ), que representa la rapidez de crecimiento por unidad de biomasa, y se obtiene al integrar la ecuación de crecimiento de población en un sistema cerrado ( $dN/dt=\mu N$ ), dando lugar a la ecuación  $N=N_0e^{\mu t}$  ( $N$ =células/ml,  $N_0$ =células originales/ml y  $t$ =tiempo en días). El otro parámetro utilizado es el Tiempo de duplicación ( $t_d$ ), el cual se obtiene haciendo  $N_0=2$ , en el tiempo  $t_d$  y es  $t_d=\ln 2/\mu$ .

## **2.2 Obtención de cultivos axénicos**

### **2.2.1 Cultivos axénicos**

La eliminación de las bacterias de los cultivos se desarrolló en base al protocolo descrito por Uribe y Espejo (2003). Este proceso consiste en sucesivos lavados y tratamientos con diferentes antibióticos de manera alternada. Los lavados fueron realizados cuando la concentración de dinoflagelados era de 2.000 células/ml y en grupos de 50.000 células. Para el lavado de cada grupo se utilizaron 2 volúmenes de 50 ml de agua de mar estéril. Posteriormente las células lavadas fueron resuspendidas en medio f/2 a una concentración final de 500 células por ml y se agregó el antibiótico correspondiente. Los antibióticos utilizados fueron gentamicina (0.05 mg/ml) y penicilina (0.2 mg/ml). El proceso se repitió cuando la concentración de dinoflagelados en cultivo llegó nuevamente a 2.000 células/ml, alternando el antibiótico utilizado, hasta completar 6 tratamientos (3 ciclos de cada antibiótico) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de lavados y tratamientos con antibióticos para la obtención de cultivos axénicos de *A. catenella*.

## **2.2.2 Recuento de bacterias**

Para la determinación de la cantidad de bacterias presentes en el cultivo se utilizaron dos métodos. Uno de ellos fue el conteo directo de las muestras obtenidas de los cultivos en una cámara de Neubauer (Hirschmann EM, Techcolor), con un objetivo de 40x. El segundo método utilizado fue microscopía de epifluorescencia, usando como fluorocromo Naranja de Acridina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Uribe y col., 1999), este compuesto tiñe específicamente los ácidos nucleicos. Para la tinción, se prepararon diluciones de las muestras hasta obtener aproximadamente  $10^5$  bacterias/ml, agregando Naranja de Acridina a una concentración de 0.1%. Las muestras fueron observadas en el microscopio con un objetivo de 100x a una longitud de onda de 500 nm. Las fotos fueron obtenidas con una cámara MC80 Axioskop (Zeiss, Alemania) adosada al microscopio.

## **2.3 Preparación de genotecas de ADN complementario (ADNc)**

### **2.3.1 Purificación de ARN mensajero (ARNm)**

El contenido de toxinas en el género *Alexandrium* es generalmente mayor en la etapa de crecimiento exponencial (Anderson y cols., 1990), es por ello que la cosecha de los dinoflagelados se realizó el día 10 mediante centrifugación a 2.000 rpm por 5 min en tubos cónicos de 50 ml (centrifuga Dynac® II, Bencton Dickinson).

La extracción de ARN total del cultivo se realizó utilizando tiocianato de guanidinio o Trizol, para la genoteca 1 y 2 respectivamente. En el primer caso, el sedimento que contenía  $4.5 \times 10^6$  células de dinoflagelado fue resuspendido

en 6 ml del buffer de homogenización (tiocianato de guanidinio 4M, Tris.Cl 0.1 M (pH 7.5), 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol) y se sonicó en hielo 3 veces por 3 seg cada una a máxima potencia (Banson Sonifier 450). Luego se agregaron 6 ml de fenol, 600 $\mu$ l de acetato de sodio 2M y 1,2 ml de cloroformo, se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4°C, se colectó la fase acuosa superior y se agregó 6ml de isopropanol. Luego se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado con 6 ml de etanol 75% y centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C. El sedimento obtenido fue secado y resuspendido en 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas (Winkler Ltda.). La extracción con Trizol se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Gibco BRL, Life Technologies). El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de Trizol (Gibco BRL, Life Technologies) mediante agitación en un Vortex (Maxi Mix II, Thermolyne) por 2 min. El rompimiento de las células se realizó por calentamiento en un baño de agua a 45°C, seguido de un congelamiento en nitrógeno líquido (-96°C) por 2 a 3 min. Este procedimiento se repitió 4 veces. La lisis se completó en un homogenizador Dounce (Kontess Glass CO., Vineland N.J.) por 30 minutos. El grado de lisis de las células fue controlado por observación directa al microscopio. Se agregaron 2 ml de cloroformo al lisado y se agitó vigorosamente por 15 seg, luego se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C y se extrajo la fase acuosa superior. El ARN se precipitó con 5 ml de alcohol isopropílico seguido de incubación a temperatura ambiente por 10 min y centrifugación a 12.000 g por 10 min a 4°C. El sedimento obtenido se lavó con 10 ml de etanol

75%, con agitación vigorosa y se centrifugó a 7.500 g por 5 min a 4°C. Luego de secado, el sedimento se resuspendió en 300 µl de agua destilada libre de nucleasas (Winkler Ltda.).

Para determinar la concentración del ARN obtenido, a una dilución de la muestra se le realizó un espectro entre 200 y 320 nm en un espectrofotómetro (UV-160A, Shimadzu). El cálculo de la concentración se realizó según la fórmula  $[\text{ARN}](\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{factor de dilución}$ . Entre 5-10 µg de ARN fueron analizados en un gel de agarosa al 1% preparada en solución de corrida con formaldehído [MOPS 0.02M (pH 7.0), acetato de sodio 8mM, EDTA 5 mM (pH 8.0), formaldehído 2.2 M] y bromuro de etidio 0.1µg/ml.

Para purificar las fracciones poliA+ a partir del ARN total, se utilizó una columna de oligo(dT)-celulosa del kit "Oligotex mRNA Midi Kit" (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La determinación de la cantidad de ARN poliA+ obtenido se realizó mediante espectrofotometría.

La preparación de la genoteca a partir de las respectivas fracciones enriquecidas en ARN poliA+ fue realizada utilizando los *kits* "cDNA Synthesis Kit", "ZAP-cDNA® Synthesis Kit" y "ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit", todos ellos de Stratagene® y siguiendo el protocolo descrito en el Manual de Instrucciones del producto.

### 2.3.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de la primera hebra de ADNc, se realizó con un partidor-adaptador oligo(dT), el cual posee un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI*. Particularmente en esta genoteca, se utilizó además un partidor poli hexámero (2.5 µg/µl) con el fin de mejorar la cantidad y variedad de ADNc sintetizado.

La síntesis de la segunda hebra de ADNc se realizó utilizando Rnasa H y DNA polimerasa I. Se ligaron adaptadores *EcoRI* en ambos extremos de los fragmentos sintetizados, y finalmente se digirieron con la enzima de restricción *XhoI*, con el fin de obtener un ADNc de doble hebra capaz de ser insertado de manera unidireccional en el vector. Para hacer el seguimiento de los pasos de la síntesis de ambas hebras se utilizaron 2 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dNTP (800 Ci/mmol).

### 2.3.3. Purificación del ADNc

ADNc se purificó en una columna de Sefarosa CL-2B. La selección de las fracciones de ADNc a utilizar se realizó considerando sus concentraciones aproximadas (determinadas mediante un contador de centelleo Lumi-Scint luminometer/LSC) y los tamaños obtenidos, esto último se determinó mediante una autoradiografía realizada a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida 5% y teñida con bromuro de etidio, secado y expuesto a la placa autoradiográfica (MXG/Plus, Kodak) por 2 días a -80°C. Luego de revelar la placa, se eligieron las fracciones de ADNc a utilizar de acuerdo a su concentración y tamaño promedio deseado.

#### **2.3.4 Ligación del ADNc al vector y empaquetamiento en fago lambda**

El ADNc de las fracciones elegidas se precipitó, luego se resuspendió en agua libre de nucleasas y se ligó al vector Uni-ZAP XR<sup>®</sup>. Los vectores se empaquetaron en fago lambda Zap II y se titularon mediante recuento de placas de lisis en células *E. Coli* XL1-Blue MRF'.

#### **2.3.5 Amplificación de las genotecas**

Se amplificaron los fagos obtenidos de las genotecas con el fin de obtener un mayor y más estable *stock* para ser almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para ello se infectaron células de XL1-Blue MRF' de *E. coli* con los fagos y luego de la formación de placas de lisis en agar de superficie NZY (para 1l: 5g de cloruro de sodio, 2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de extracto de levadura, 10 g de NZ amina (caseína hidrolizada) y 0.7%(p/v) de agarosa), los fagos amplificados se recuperaron mediante la elución con tampón SM (para 1l: 5.8 g de NaCl, 2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml de Tris-HCl 1M (pH 7.5) y 5 ml de gelatina 2% (p/v)). Luego de agregar cloroformo (5%) y centrifugar por 10 min a 500 g, se recuperó el sobrenadante y fue almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$  en alícuotas (con 0.3% de cloroformo) y a  $-80^{\circ}\text{C}$  (con 7% de DMSO).

#### **2.3.6 Excisión *in vivo* del plasmidio pBluescript a partir del vector Uni-Zap XR**

Este proceso consiste en extraer y recircularizar el segmento donde se encuentra el inserto en el vector Uni-Zap XR, generando el plasmidio pBluescript. La obtención de los clones recombinantes se realizó transformando

las bacterias directamente con el plasmidio. Esto permite ciertas ventajas con respecto al trabajo con fagos, por ejemplo, una manipulación más sencilla y rápida de la transformación y cultivo de las bacterias y un mayor rendimiento de material a secuenciar, ya que el número de copias por célula del vector Uni-Zap XR<sup>®</sup> es mucho menor que el plasmidio pBluescript (Manual de instrucciones, Stratagene).

La excisión *in vivo* se realizó con la ayuda del fago *helper* ExAssist en células *E. coli* cepa SOLR, el cual complementa el sistema de excisión.

#### **2.4 Obtención de clones recombinantes**

Luego de obtener la genoteca de ADNc en forma de plasmidios, éstos se usaron para transformar células de *E. coli* cepa SOLR. Para esto se mezclaron, 1 ml de las bacterias resuspendidas en MgSO<sub>4</sub> 10mM y 1µl de la solución con los plasmidios de la genoteca. Las bacterias se sembraron en una placa Petri de 16 cm de diámetro con LB-agar (triptona 5 g, extracto de levadura 2,5 g, cloruro de sodio 2,5 g, agua destilada 500 ml y 16 g de agar (BDH Chemicals, Toronto) con ampicilina (50 µg/ml), IPTG (3.9 µmoles) y X-gal (2 mg por placa) en su superficie.

El plasmidio confiere, entre otras funciones, resistencia a ampicilina a la célula huésped y permite realizar una primera selección de las colonias recombinantes por color mediante la complementación  $\alpha$ .

Las células recombinantes fueron identificadas por la formación de colonias blancas en las placas. La determinación del tamaño aproximado de los

insertos de los clones recombinantes se realizó mediante PCR con partidores SK y T7 descritos para el plasmidio en uso. La PCR fue realizada directamente en las células tomando con un asa estéril las colonias blancas de la placa de LB y resuspendiéndolas en 13  $\mu$ l de agua destilada. La mezcla se incubó a 100°C por 10 min y luego se agregaron los restantes reactivos (2  $\mu$ l buffer Taq polimerasa 10x, 0.16  $\mu$ l dNTP 25mM cada uno, 0.6  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2  $\mu$ l partidores SK y T7 10  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ l). El programa de amplificación fue 95°C por 5 min, [94°C por 1 min, 52°C por 1min, 72°C por 1:15 min] por 30 ciclos, 72°C por 10 min (Termociclador PTC-100™, M.J. Research). Finalmente, los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 2% a 100 volts por 20 min, utilizando un estándar de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Se seleccionaron aquellos clones que poseían un inserto de tamaño igual o superior a 300 pares de bases.

## **2.5 Purificación de ADN plasmidial**

Los clones seleccionados se crecieron en 3,5 ml de medio LB líquido con ampicilina (50  $\mu$ g/ml), a 37°C y con agitación constante de 200 rpm durante la noche. Se destinaron 400  $\mu$ l del cultivo a la preparación de *stocks* en glicerol 20% para ser almacenados a -80°C. El resto del cultivo se utilizó para extraer el ADN plasmidial siguiendo el protocolo de extracción de lisis alcalina modificado a partir de los métodos de Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981), descrito en Sambrook y col., 1989. Los sedimentos de ADN plasmidial obtenidos fueron resuspendidos tampón TE (10 mM Tris·Cl, 1mM EDTA (pH8)).

El rendimiento de las extracciones fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

## **2.6 Secuenciación de ADN plasmidial**

La secuenciación de los insertos de los clones seleccionados de la genoteca se realizó usando el método de Sanger y col. (1977), con dideoxifosfatos fluorescentes, en un secuenciador automático ABI 310 Genetic Analyser. La secuenciación se realizó a partir del extremo 5' de los fragmentos con el partidor T3 diseñado para el plasmidio en uso.

## **2.7 Análisis de las secuencias obtenidas**

Las secuencias obtenidas se visualizaron mediante el electroferograma en el programa Chromas (Copyright® 1998-2002 Technelysium Pty Ltd.). Luego, fueron analizadas manualmente identificándose y eliminándose los segmentos de las secuencias correspondientes al vector.

Las secuencias redundantes (identidad >90%) y *contigs* (identidad >90% y un mínimo de coincidencia de 30 nucleótidos) se identificaron con el programa Sequencher 3.1 (©2003 Gene Codes Corporation). En ambos casos, los alineamientos fueron revisados manualmente para constatar, entre otras cosas la calidad de las secuencias en el fragmento comparado.

Con el fin de anotar las secuencias obtenidas, éstas fueron comparadas con base de datos internacional de NCBI mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul y col., 1990; Gish y States, 1993; Madden y col., 1996; Altschul y col., 1997; Zhang y Madden, 1997). Se utilizó el

programa *BlastX* (secuencia traducida a aminoácidos *versus* la base de datos de proteínas) y *BlastN* (comparación nucleótido-nucleótido). En este último se utilizaron dos bases de datos, la de nucleótidos sin restricción y la de EST, la primera excluye a la segunda.

Posteriormente, para los sucesivos análisis se seleccionaron las secuencias cuya homología con aquellas de las bases de datos cumplía con los parámetros de identidad >30% y valor estadístico  $E < 10^{-3}$ .

Las secuencias seleccionadas fueron clasificadas de acuerdo al grupo taxonómico al cual pertenece su homóloga y al grupo de ortólogos al que corresponde la proteína identificada, para ello se utilizó las categorías de *Clusters of Orthologous Groups of Proteins* (COGs) basadas en los trabajos de Tatusov y col., 1997 y Tatusov y col., 2001. Las categorías se detallan en la Tabla I.

**Tabla I. Grupos de proteínas ortólogas (COGs)**

Categoría	Descripción
Desconocida	Secuencia que no se conoce a que proteína pertenece pero si su organismo de origen.
Proteína no caracterizada	Se conoce la proteína pero no la función que cumple dentro del organismo.
Expresión génica	Procesos de traducción, transcripción y replicación.
Proceso celular	División celular, procesamiento de proteínas, membrana celular, movilidad y secreción, transporte de iones y transducción de señales.
Metabolismo	Producción de energía y metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, coenzimas y secundario.

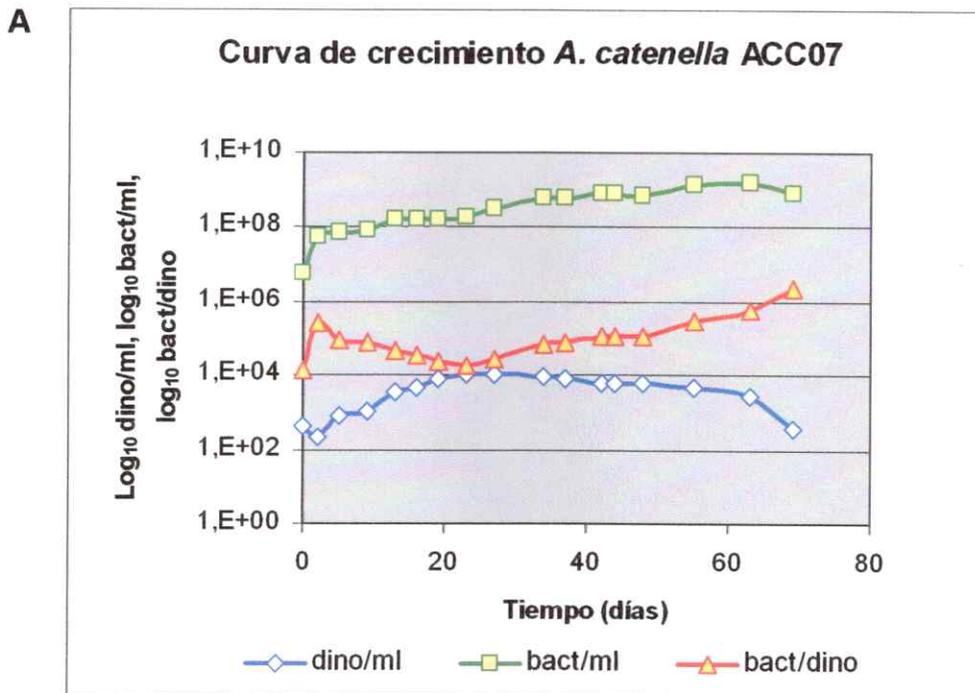
## 3.- RESULTADOS

### 3.1 Cultivo de *Alexandrium catenella*

#### 3.1.1 Curva de crecimiento del cultivo original

Normalmente los cultivos de *A. catenella* contienen una alta cantidad de bacterias marinas, su número varía de  $1.4 \times 10^4$  bacterias/dinoflagelado en la etapa exponencial de crecimiento, a  $2.3 \times 10^6$  bacterias/dinoflagelado en las etapas finales del cultivo (Figura 4, A). Estas bacterias están presentes en el cultivo desde el inicio del cultivo clonal, el cual proviene del aislamiento de una célula a partir de una muestra de fitoplancton marino (Guillard, 1995). Esta comunidad bacteriana se mantiene en el cultivo, conviviendo en asociación con los dinoflagelados (Uribe y Espejo, 2003).

Durante la etapa de crecimiento exponencial los dinoflagelados tienen un tiempo de duplicación mayor que las bacterias (Figura 4, B). En las etapas tardías del cultivo, la tasa de crecimiento bacteriano se estabiliza, manteniéndose similar incluso después del decaimiento de los dinoflagelados. Cabe destacar que las bacterias encontradas presentan una amplia variedad en cuanto a su morfología, tamaño, movilidad y agrupación entre ellas (datos no mostrados).



**B**

Parámetro	Dinoflagelados	Bacterias
Tasa de crecimiento	0.177	1.171
Tiempo de duplicación	3.9 días	0.59 días
Densidad máxima	$1.7 \times 10^4$ dino/ml	$1.5 \times 10^8$ bact/ml

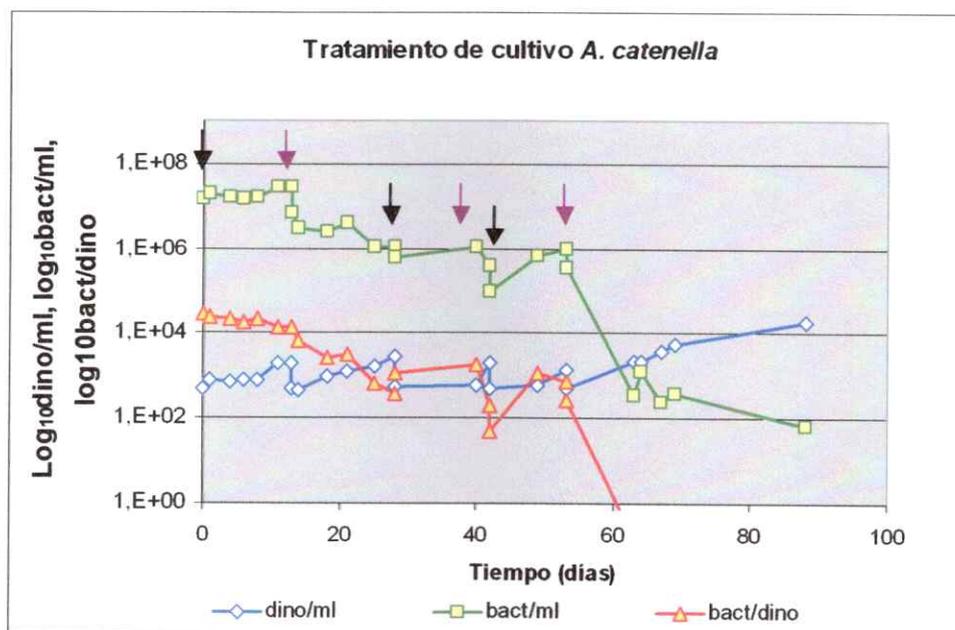
**Figura 4.** Crecimiento de cultivos de *A. catenella* y bacterias asociadas en cultivo original.

A) Curva de crecimiento de *A. catenella* y bacterias. B) Parámetros de crecimiento exponencial de *A. catenella* (0 a 19 días) y bacterias (0 a 5 días).

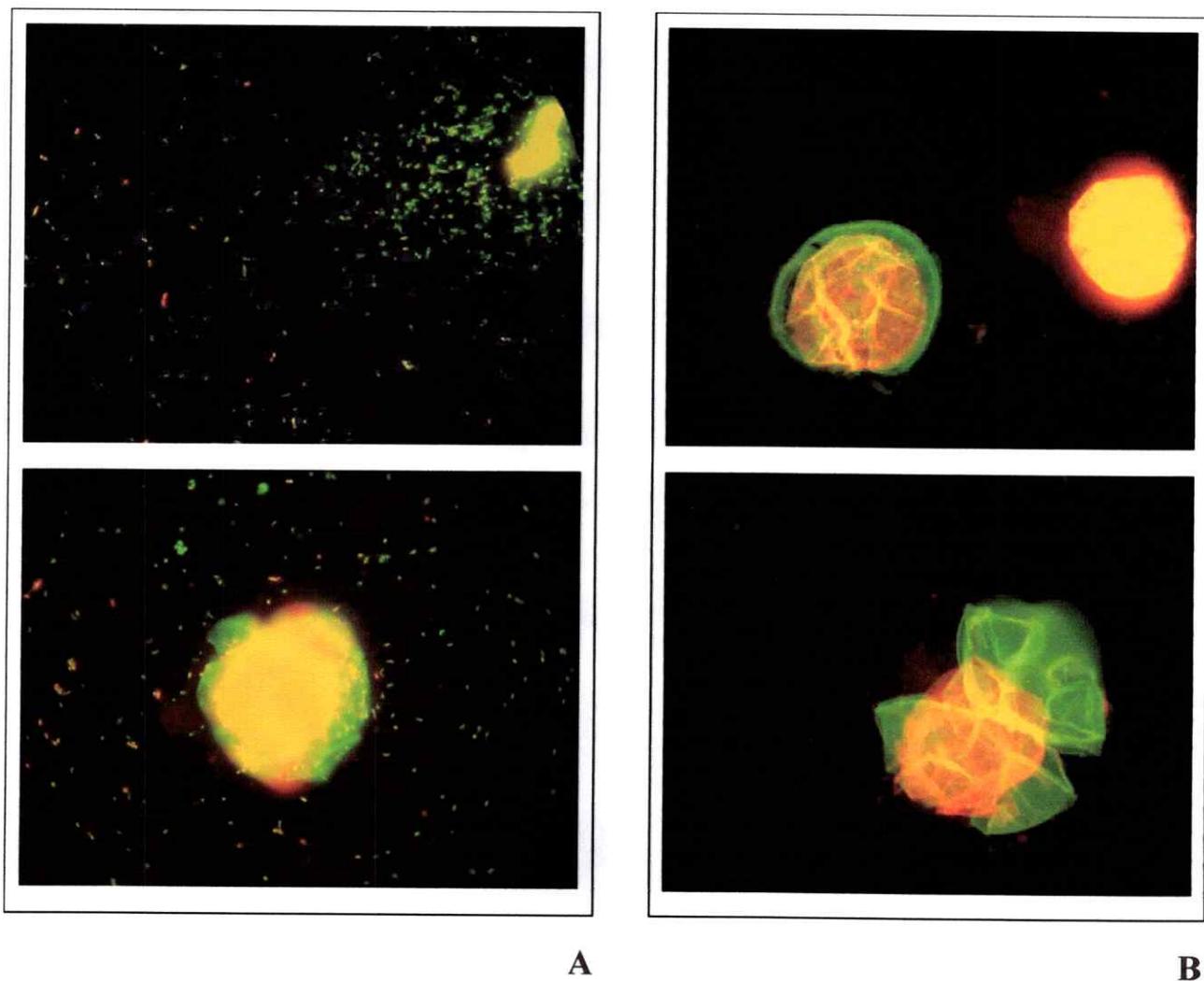
### 3.1.2 Obtención de cultivos axénicos

La obtención de cultivos axénicos se realizó mediante ciclos de lavados y aplicación de antibióticos al cultivo original (Uribe y Espejo, 2003). La Figura 5 muestra la disminución de la concentración de bacterias en estos tratamientos, el cultivo original poseía  $2.7 \times 10^4$  bacterias/dinoflagelado, y luego del proceso de limpieza, se obtuvo cultivos con un promedio de  $3.1 \times 10^{-2}$  bacterias/dinoflagelado.

Un ejemplo de la visualización de las bacterias presentes en los cultivos mediante microscopía de epifluorescencia se muestra en la Figura 6.



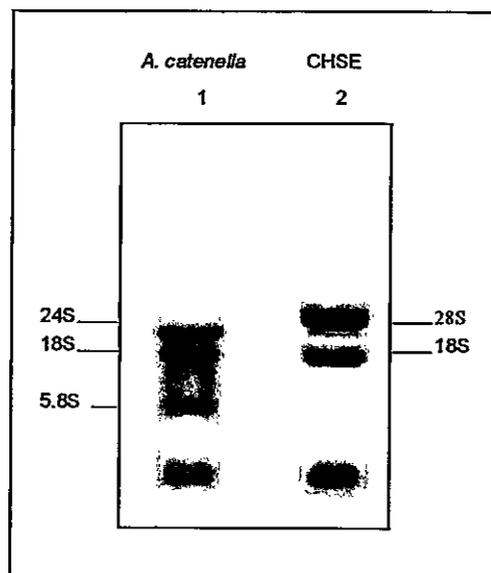
**Figura 5.** Disminución de la concentración de bacterias después de sucesivos lavados y aplicación de antibióticos. Las flechas muestran los 6 lavados realizados, las negras indican aplicación de gentamicina (0.05 mg/ml) y las púrpura aplicación de penicilina (0.2 mg/ml).



**Figura 6.** Epifluorescencia de cultivos *A. catenella* teñidos con Naranja de Acridina. A) Cultivo ACC07original. B) Cultivo ACC07 tratado para eliminar las bacterias (axénico).

### 3.2 Elaboración de las genotecas

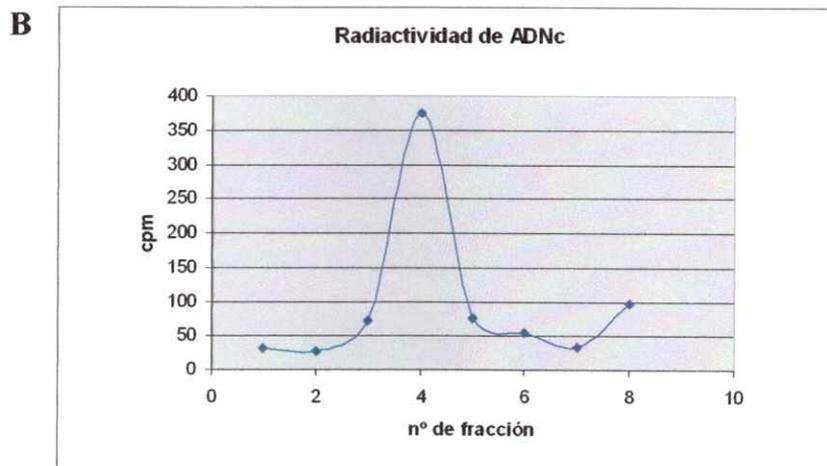
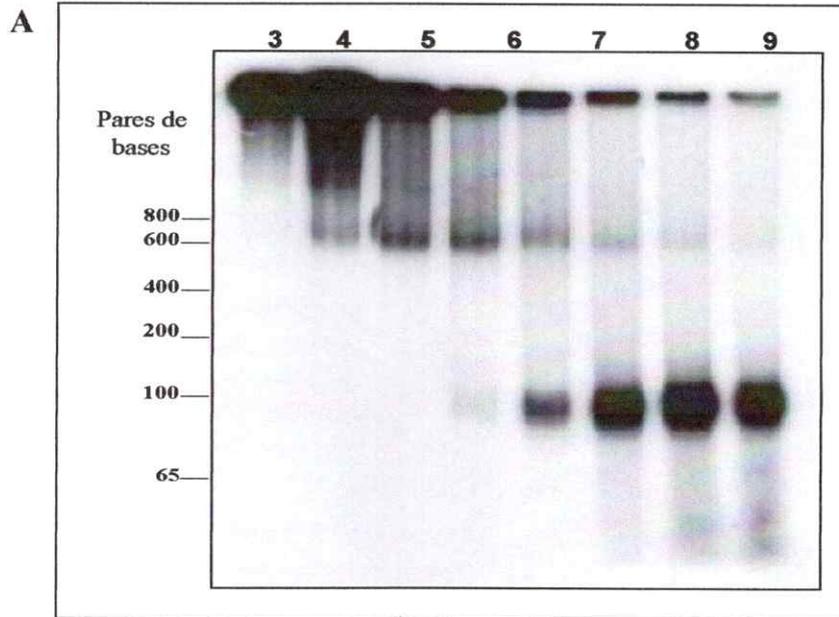
Se elaboraron 2 genotecas de ADNc de los dinoflagelados, la genoteca 1 a partir del cultivo original que contenía las bacterias asociadas y la genoteca 2 a partir del cultivo axénico. En ambos casos, se cosecharon las células de dinoflagelados y se extrajo su ARN total, que fue visualizado en geles de agarosa 1.4%, usando como control ARN total de células CHSE (embrión de salmón Chinook) (Figura 7). En la imagen se observan las bandas que corresponden a los ARN ribosomales (ARNr) de los diferentes organismos, en *A. catenella*, se distinguen las bandas de ARNr pertenecientes al 5.8S, 18S y 24S previamente descritas para el género (Scholin y Anderson, 1993; Adachi y col., 1994; Lenaers y col., 1991). Para comparación se muestran las bandas de ARNr 18S y 28S de células de embrión de salmón Chinook (CHSE).



**Figura 7.** Electroforesis del ARN total de *A. catenella* en gel de agarosa al 1.4% en condiciones desnaturalantes. Carril 1: 10µg de ARN total de *A. catenella*. Carril 2: 10µg de ARN total de células CHSE.

Después de purificar la fracción de ARN enriquecida en poliA+ se sintetizó el ADNc de doble hebra. El ADNc marcado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$  fue purificado en columnas de Sefarosa CL-2B, la concentración relativa de las fracciones obtenidas fue determinada en un contador de centelleo y fueron visualizadas mediante autoradiografía (Figura 8), observándose las bandas que corresponden a los ADNc sintetizados y purificados por la columna. Se seleccionaron las fracciones que poseían los ADNc de mayor tamaño, de la fracción 3 a la 6 en la genoteca 1 y de la fracción 3 a la 7 en la genoteca 2.

El ADNc de las fracciones fue ligado a vectores Uni-ZAP XR<sup>®</sup>, y los vectores fueron empaquetados en fago  $\lambda$  Zap II, luego se titularon mediante conteo de placas de lisis en células XL1-Blue MRF' (*E. coli*). Finalmente las genotecas se amplificaron, utilizando células XL1-Blue MRF', la genoteca 1 se amplificó en su totalidad (1ml) y la genoteca 2, sólo la mitad de la preparación obtenida (250 $\mu$ l). La Tabla II muestra un resumen de las etapas en la elaboración de las genotecas.



**Figura 8.** Fraccionamiento por tamaño de ADNc de *A. catenella* de la genoteca 1. A) Autoradiografía de fracciones de ADNc colectadas de la columna de Sefarosa CL-2B. B) Radiactividad de las fracciones registradas expresada en cuentas por minuto (cpm). Las fracciones 3-6 se combinaron y se clonaron en  $\lambda$  ZAP II.

**Tabla II.** Etapas en la elaboración de las genotecas de *A. catenella*.

	<b>Genoteca 1</b>	<b>Genoteca 2</b>
N° de células utilizadas	$4.5 \times 10^6$	$9.04 \times 10^6$
ARN total obtenido	400 $\mu\text{g}$	738 $\mu\text{g}$
Fracción PoliA+ purificada	11 $\mu\text{g}$	11 $\mu\text{g}$
ARN PoliA+ utilizado	5 $\mu\text{g}$	11 $\mu\text{g}$
Título de genoteca no amplificada	$7.2 \times 10^3$ Pfu/ml	$1.8 \times 10^5$ Pfu/ml
Pfu totales genoteca no amplificada	$7.2 \times 10^3$ Pfu	$9.1 \times 10^4$ Pfu
Título de genoteca amplificada	$1.8 \times 10^{11}$ Pfu/ml	$1.55 \times 10^{12}$ Pfu/ml
Pfu totales genoteca amplificada	$1.8 \times 10^{13}$ Pfu	$4.6 \times 10^{13}$ Pfu

### 3.3 Obtención de clones recombinantes

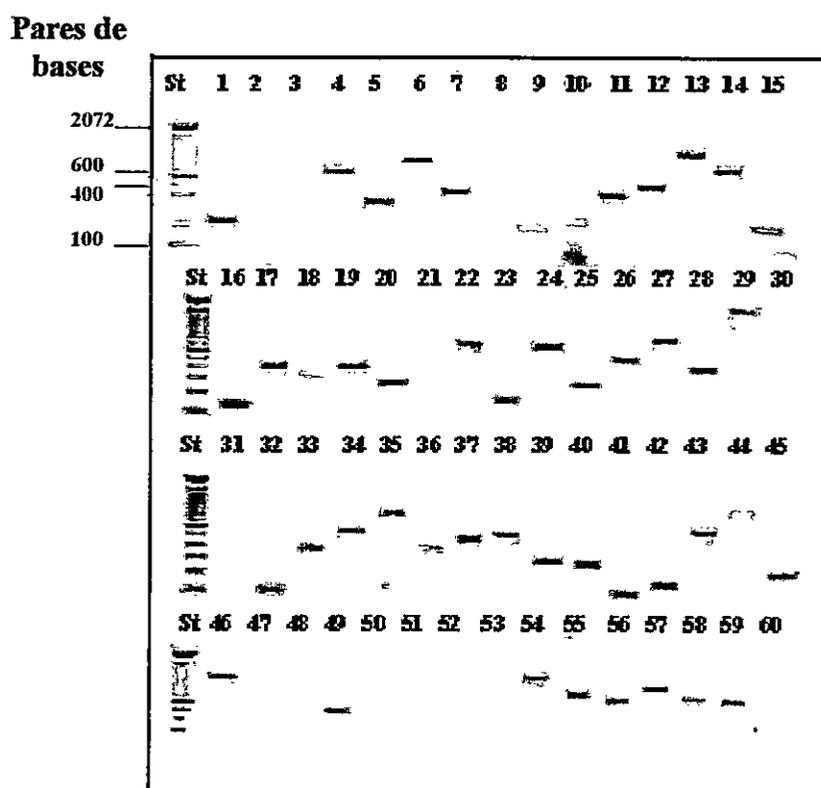
Las genotecas fueron generadas en su forma plasmidial mediante la excisión *in vivo* de los *stocks* de fagos de la genoteca amplificada en el caso de la genoteca 1 y sin amplificar en el caso de la genoteca 2. Las excisiones se realizaron periódicamente, pues cada preparación plasmidial posee una vida útil de aproximadamente 2 meses. Con estas preparaciones plasmidiales se transformaron células SOLR de *E. coli* y se crecieron en placas de LB-ampicilina (50 µg/ml) para la obtención de los EST.

La primera selección de clones recombinantes se realizó utilizando el cambio de color obtenido a través del sistema de complementación  $\alpha$  (Figura 9).



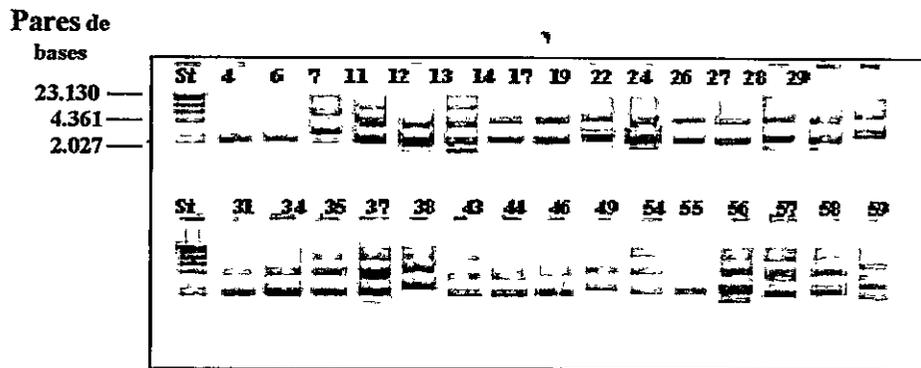
**Figura 9.** Primera selección de clones recombinantes mediante complementación  $\alpha$ . Siembra de células SOLR (*E. coli*) transformadas con plasmidios de genotecas de *A. catenella* en placas LB-ampicilina (50µg/ml). Las colonias blancas corresponden a clones recombinantes.

Posteriormente se realizó una segunda selección considerando el tamaño de los insertos lo que se determinó mediante amplificación por PCR y análisis en geles de agarosa (Figura 10). Se seleccionaron aquellos clones con amplificados de más de 400 pb (alrededor de 300 pb de inserto) los cuales normalmente correspondían al 50% del total. El tamaño promedio de los insertos fue de 400 pares de bases.



**Figura 10. Selección de clones recombinantes.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de PCR de clones seleccionados por complementación  $\alpha$ . Cada carril contiene 7  $\mu$ l de muestra. El carril St contiene 150ng de estándar de peso molecular 100 bp.

Posteriormente se extrajo el ADN plasmidial de los clones elegidos, los que fueron analizados en geles de agarosa como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. ADN plasmidial de los clones seleccionados.**

Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN plasmidial extraído de los clones seleccionados por el tamaño de su inserto. Cada carril contiene 1 $\mu$ l de ADN plasmidial, el carril St contiene 400 ng de estándar de peso molecular  $\lambda$ DNA/*Hind*III.

### 3.4 Secuenciación y análisis de los clones recombinantes

#### 3.4.1 Resultados generales

Este estudio fue realizado con un total de 1.264 clones recombinantes, 581 obtenidos de la genoteca 1 y 683 de la genoteca 2. Los insertos fueron secuenciados y comparados entre ellos, obteniéndose 526 (90.5%) secuencias únicas (no redundantes) de la genoteca 1 y 607 (88.9%) de la genoteca 2 (Tabla III).

Además se identificó 1 *contig* en la genoteca 1 y 6 *contigs* en la genoteca 2. Estas secuencias se alinearon obteniendo secuencias consenso que fueron consideradas para los análisis posteriores como secuencias únicas.

Las secuencias únicas fueron sometidas a una búsqueda de homólogas conocidas en la base de datos internacional del programa *Blast* (tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico, con *BlastN* y *BlastX* respectivamente). A partir de estos resultados, se seleccionaron aquellos clones cuyos insertos poseían una homología significativa con secuencias conocidas (identidad >30% y valor estadístico  $E < 10^{-3}$ ). Normalmente se considera estadísticamente significativo un valor de E menor a 0.5, pero en este caso, la versión del programa *Blast* utilizado subestima estos valores (Scala y col., 2002), es por ello que escogió un valor de E menor. Se determinó que un porcentaje de identidad mayor que 30% es suficiente para distinguir proteínas homólogas, como es el caso de la proteína Apaf1 de humano que posee un 21% de identidad con su homóloga CED-3 en *C. elegans* (Zou y col., 1997), así también, la proteína O-FucT-1 en humano y *C. elegans* presentan un 29.4% de identidad a nivel aminoacídico (Wang y col., 2001).

Los clones que cumplieron con los requisitos de homología significativa fueron 117 (22.2% del total de secuencias únicas) en la genoteca 1 y 99 (16.3% del total de secuencias únicas) en la genoteca 2 (Tabla III), esto implica que un 77.8% y un 83.7% de las secuencias únicas, de la genoteca 1 y 2 respectivamente, son no identificables.

Debido a que los resultados del *Blast* arrojan todas las secuencias homólogas encontradas, se seleccionó para cada clon sólo una de ellas, la más significativa tomando en cuenta su porcentaje de identidad y valor de E.

La mayoría de las secuencias no identificadas de ambas genotecas posee marcos de lectura abiertos, detallados en la tabla IV, alrededor de un 80% codifican potencialmente para proteínas de pesos moleculares mayores a 7 kDa. Por otro lado, un 3.7% en la genoteca 1 y un 11.6% en la genoteca 2 posee extremos 3' poliadenilados.

**Tabla III.** Resultados generales de la búsqueda de secuencias homólogas conocidas en bases de datos.

	Genoteca 1		Genoteca 2	
	Clones	Porcentaje	Clones	Porcentaje
Clones secuenciados	581	100,0%	683	100,0%
Secuencias redundantes	55	9,5%	76	11,1%
Secuencias únicas	526	90,5%	607	88,9%

Secuencias únicas	526	100,0%	607	100,0%
Secuencias homólogas*	117	22,2%	99	16,3%

\* valor de  $E < 10^{-3}$ , identidad >30%

**Tabla IV.** Marcos de lectura abiertos de las secuencias no identificadas.

Marcos de lectura abiertos (pb)	Genoteca 1		Genoteca 2	
	Clones	Porcentaje	Clones	Porcentaje
0-200	61	15.0%	92	18.3%
201-300	136	33.4%	204	40.7%
Sobre 300	210	51.4%	206	41%

### 3.4.2 Distribución de grupos taxonómicos

Se observó una gran diversidad en los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las secuencias conocidas encontradas en las genotecas (Tabla IV). Estos resultados se pueden apreciar gráficamente en las figuras 12 y 13, considerando los resultados generales (Figuras 12A y 13A) y la distribución de los grupos taxonómicos encontrados (Figuras 12B y 13B).

En la genoteca 1 los grupos más importantes corresponden a plantas, mamíferos y bacterias los cuales representan el 72.6% del total, en tanto que en la genoteca 2, plantas, mamíferos y dinoflagelados constituyen el 69.6% del total. Los grupos menos representados son muy diversos en ambas genotecas.

Cabe destacar que juntas, las secuencias de dinoflagelados, plantas y algas verdes (géneros filogenéticamente muy cercanos o de origen común) corresponden a un 58.5% de las secuencias en la genoteca 2 mientras son sólo 16.2% en la genoteca 1.

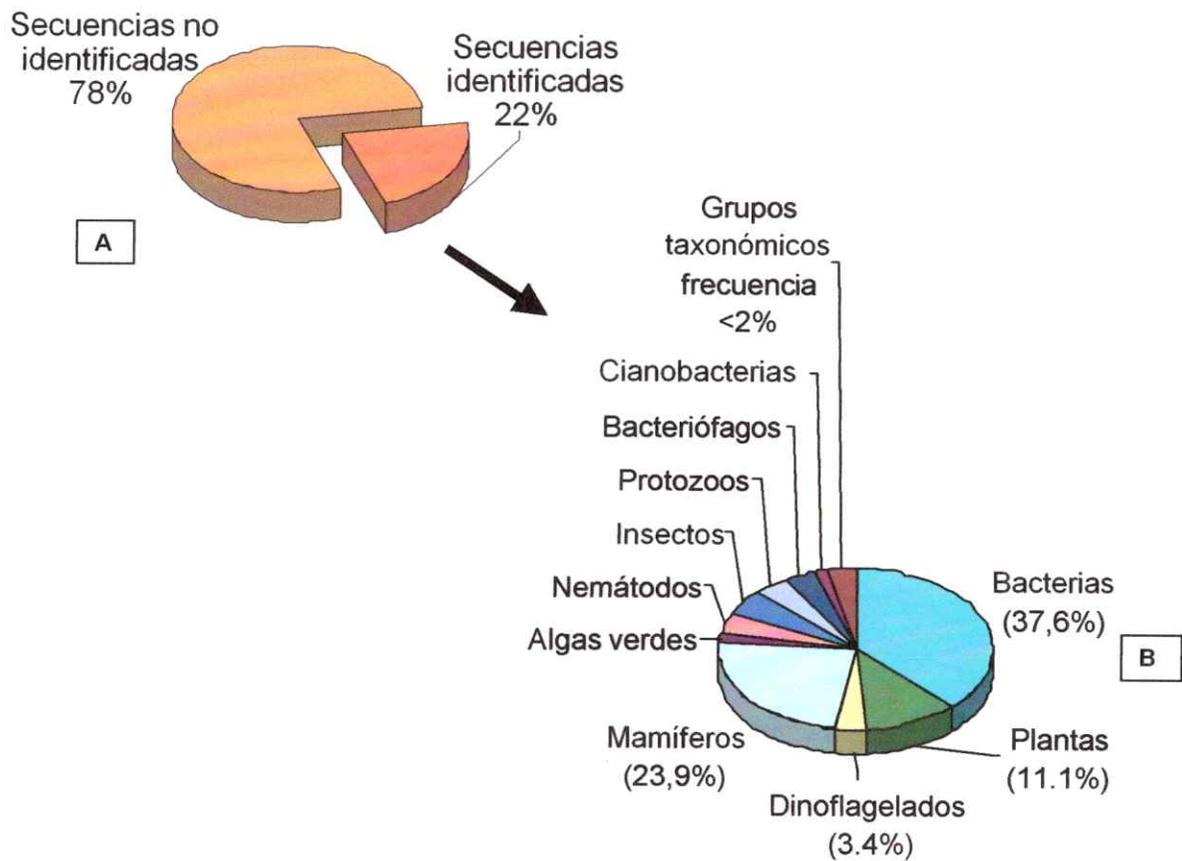
En particular, una de las diferencias más importantes entre las dos genotecas se refiere al porcentaje de secuencias de dinoflagelados propiamente tal, las que son 10 veces más en la genoteca 2 que en la genoteca 1 (3.4% y 33.3% respectivamente). Otra diferencia significativa corresponde al porcentaje de secuencias bacterianas, este es 6 veces menor en la genoteca 2 con respecto a la genoteca 1 (de un 37.6% a un 6.1% del total de secuencias).

Por otro lado, el porcentaje de secuencias de plantas es 2 veces mayor en la genoteca 2, mientras que el porcentaje de secuencias de mamíferos es 2 veces menor en comparación con la genoteca 1.

En cuanto a los grupos taxonómicos menos representados, se aprecia una mayor diversidad en la genoteca 2, en ésta, a diferencia de la genoteca 1, se encuentran secuencias homólogas a otras de peces, hongos y secuencias de muestras ambientales del Mar de los Sargazos, aunque no se encuentran homólogas a protozoos (Tabla IV).

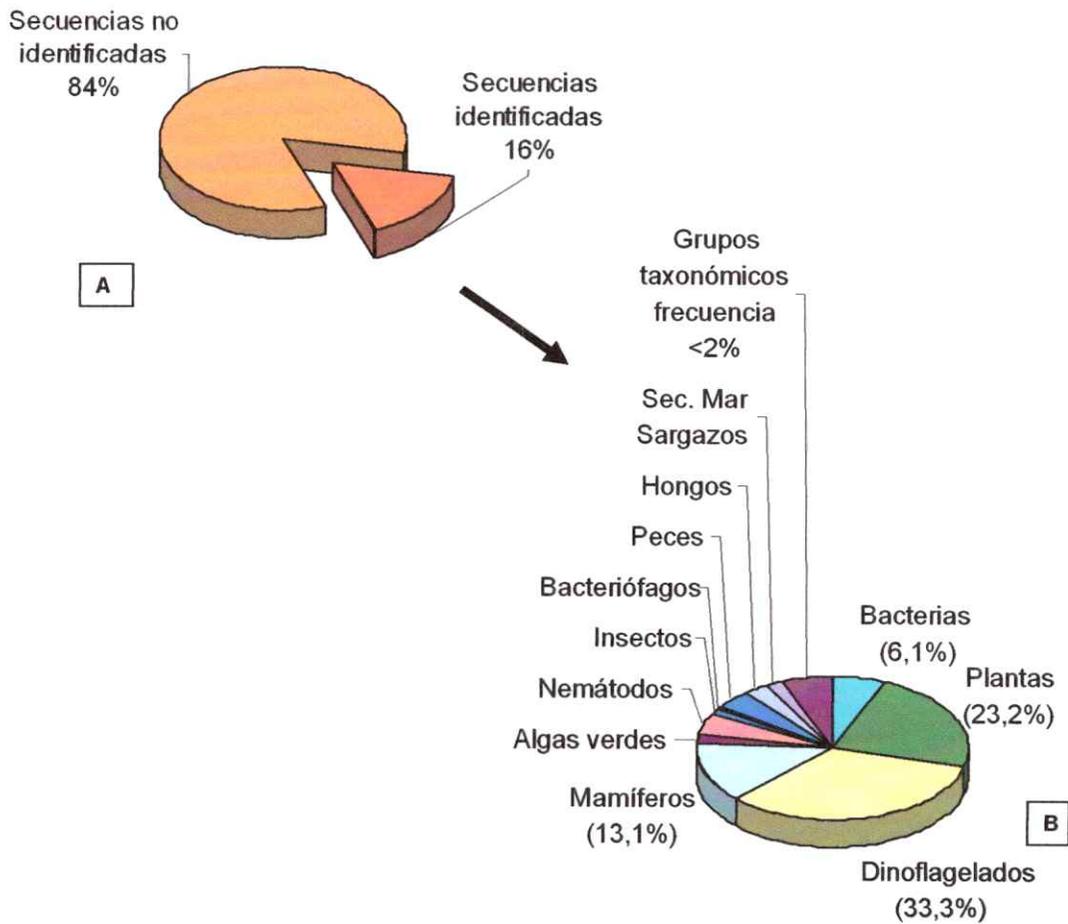
**Tabla V.** Distribución grupos taxonómicos de secuencias homólogas conocidas de genotecas de *A. catenella*.

Grupos taxonómicos	Genoteca 1		Genoteca 2	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Bacterias	44	37,6	6	6,1
Plantas	13	11,1	23	23,2
Dinoflagelados	4	3,4	33	33,3
Mamíferos	28	23,9	13	13,1
Algas verdes	2	1,7	2	2,0
Nemátodos	5	4,3	5	5,1
Insectos	6	5,1	1	1,0
Protozoos	5	4,3	0	0
Bacteriófagos	4	3,4	1	1,0
Peces	0	0,0	4	4,0
Hongos	0	0,0	3	3,0
Sec. Mar de los Sargazos	0	0,0	2	2,0
Cianobacterias	2	1,7	0	0
Grupos taxonómicos frecuencia <2%	4	3,4	6,00	6,1
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>100,0</b>	<b>99</b>	<b>100,0</b>



**Figura 12.** Porcentaje de secuencias significativas y su distribución en grupos taxonómicos en la genoteca 1.

A) Distribución de clones totales secuenciados identificados en las bases de datos.  
 B) Distribución de grupos taxonómicos de secuencias con homología significativa a otras conocidas.



**Figura 13.** Porcentaje de secuencias significativas y su distribución en grupos taxonómicos en la genoteca 2.

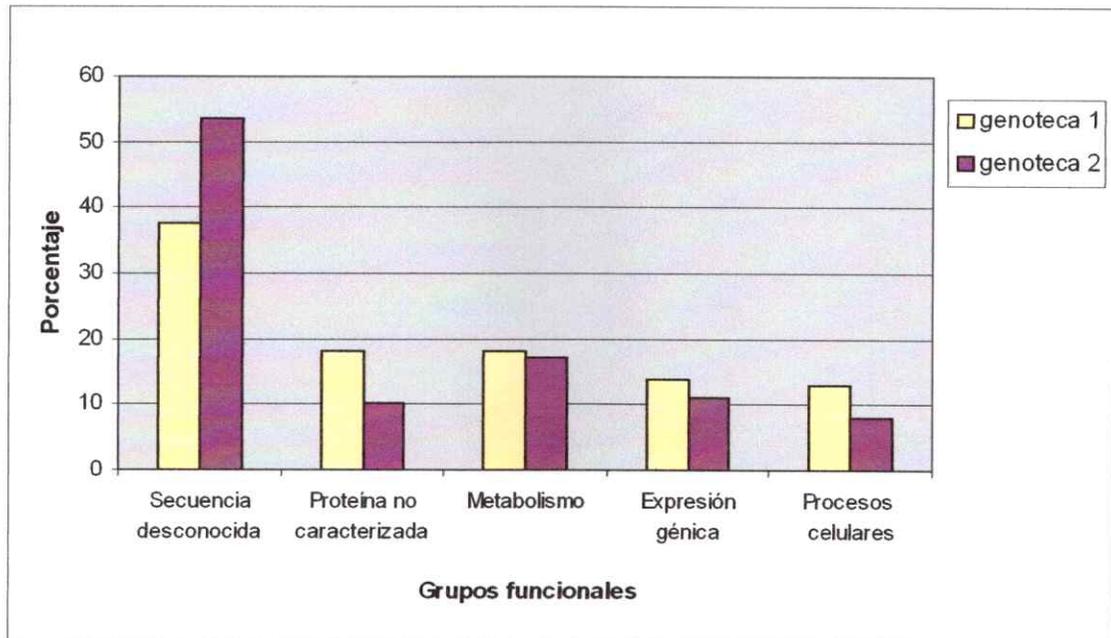
A) Distribución de clones totales secuenciados identificados en las bases de datos.  
 B) Distribución de grupos taxonómicos de secuencias con homología significativa a otras conocidas.

### 3.4.3 Comparación de los grupos de ortólogos de secuencias conocidas

Comparando la distribución de grupos de proteínas ortólogas a los cuales pertenecen las secuencias conocidas encontradas (Tabla V), se puede apreciar que la principal diferencia entre ambas genotecas es el mayor contenido de secuencias desconocidas en la genoteca 2 (53.5%) que en la genoteca 1 (37.6%). Por otro lado, las secuencias no caracterizadas son 7.8% menos en la genoteca 2 que en la genoteca 1, mientras que las diferencias en las otras categorías son menos significativas, en la Figura 14 se puede apreciar que los mayores porcentajes corresponden a funciones Metabolismo, luego Procesos Celulares y Expresión Génica .

**Tabla VI.** Distribución de grupos funcionales de las secuencias conocidas de genotecas de *A. catenella*.

Grupos de ortólogos de proteínas	Genoteca 1		Genoteca 2	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Secuencias desconocidas	44	37,6	53	53,5
Proteínas no caracterizadas	21	17,9	10	10,1
Metabolismo	21	17,9	17	17,2
Expresión génica	16	13,7	11	11,1
Procesos celulares	15	12,8	8	8,1
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>100,0</b>	<b>99</b>	<b>100,0</b>



**Figura 14.** Distribución de grupos funcionales de las secuencias conocidas de ambas genotecas de *A. catenella*.

### 3.4.4 Genes conocidos encontrados

Confirmando los resultados descritos en el análisis de grupos taxonómicos, en la genoteca 1 las secuencias bacterianas constituyen también un alto porcentaje de las secuencias identificadas con funciones conocidas (más del 50%) (Tabla VI). Destacan los grupos funcionales Metabolismo y Expresión Génica, ya que constituyen un 74% y un 57% de secuencias bacterianas respectivamente, en general, las secuencias encontradas son muy diversas y con bajos valores estadísticos de E, llegando incluso a 0 en las proteínas hidrogenasa-4, glutamina permeasa, malato sintasa, psiD, ADN fotoliasa, ADN polimerasa, Moa D, proteína periplasmática TorT y gen ycjX. Las secuencias de dinoflagelados de esta genoteca son sólo 4 y pertenecen a los grupos Expresión Génica (ARNr 24S y 5.8S) y Metabolismo (gliceraldehido-3P deshidrogenasa), en este caso, sólo las secuencias de ARNr poseen valores estadísticos de E iguales a 0.

En la genoteca 2 (Tabla VII) más del 50% de los genes de función conocida pertenecen a dinoflagelados, cabe destacar el grupo de Metabolismo donde estas secuencias constituyen el 86% y el grupo de Expresión Génica donde constituyen el 100%. Los genes de dinoflagelados encontrados son principalmente citocromo b y c, gliceraldehido-3P deshidrogenasa, ARNr y HSP90 (*Heat Shock Protein 90*), estos genes son normalmente utilizados para realizar estudios de filogenia de estas microalgas. Otra secuencia identificada es parte del gen que codifica para la PCP (proteína que une peridina-clorofila), su interés radica en la exclusividad del uso del pigmento carotenoide peridina

por parte de los dinoflagelados en su proceso de fotosíntesis y se utiliza normalmente en estudios de endosimbiosis secundaria.

Dentro de las secuencias identificadas, no se encontraron secuencias homologables a la proteína Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa).

En la genoteca 2 se encontró una secuencia homologable a la proteína Pherophorina del alga verde *Volvox carteri*, esta es una glicoproteína relacionada con la transducción de señales en procesos de diferenciación sexual (Godl y col., 1997).

Se observa en la genoteca 2 una reiteración en los genes a los cuales pertenecen las secuencias de dinoflagelados encontradas, estos insertos no son redundantes, sino que constituyen diferentes partes del gen conocido.

Fue posible identificar dos de los contigs encontrados, ellos corresponden a citocromo oxidasa subunidad 1 y ARNr 24S, los cuales luego de ensamblados, poseían 920 nucleótidos y 547 nucleótidos respectivamente.

**Tabla VII. Genes conocidos encontrados en la genoteca 1**

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Hidrogenasa-4 componente F	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	882	98%	0	M63654
Citrato liasa	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	557	96%	$1e^{-162}$	D90703
Aldehido dehidrogenasa	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	494	96%	$1e^{-136}$	AE000250
Glutamina permeasa	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	759	96%	0	X14180
Malato sintasa	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	775	99%	0	X12431
livJ (prot. periplasm. una leucina, isoleucina. y valina)	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	319	91%	$2e^{-84}$	U00039
ldhA (participa en fermentación)	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	555	95%	$1e^{-155}$	AE000235
1,4-alpha-glucan branching enzyme	Metabolismo	<i>S. aversmitilis</i>	bacteria	50	100%	$6e^{-03}$	AP005032
Glicosil transferasa	Metabolismo	<i>H. influenzae</i>	bacteria	49	78%	$4e^{-05}$	NP_438427
Esterasa lactona-específica	Metabolismo	<i>M. loti</i>	bacteria	120	73%	$9e^{-27}$	NP_102005
Succinato dehidrogenasa	Metabolismo	<i>B. pertussis</i>	bacteria	139	94%	$3e^{-32}$	CAE42632
Hippurato hidrolasa	Metabolismo	<i>R. solanacearum</i>	bacteria	108	64%	$1e^{-22}$	NP_520992
Prot. de membrana Ret. endoplasmático	Metabolismo	<i>C. elegans</i>	nemátodo	45	34%	$4e^{-04}$	XP_227801
gamma-glutamylcisteina sintetasa.	Metabolismo	<i>O. sativa</i>	planta	48	100%	$9e^{-03}$	BE040348
citrato sintasa	Metabolismo	<i>P. putida</i>	bacteria	151	64%	$3e^{-62}$	NP_746311
Gliceraldehido 3P dehidrogenasa	Metabolismo	<i>S.muscatinei</i>	dinoflagelado	52	96%	$3e^{-04}$	AY314974
Gliceraldehido 3P dehidrogenasa	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	77	67%	$7e^{-20}$	AAD01871
ATP sintasa subunidad Beta	Metabolismo	<i>Desmidium sp.</i>	planta	54	84%	$2e^{-04}$	AY093931

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
psiD (alkylphosphonate uptake)	Metabolismo	<i>E. coli</i>	bacteria	781	96%	0	J05260
ADN fotoliasa	Exp. génica	<i>E. coli</i>	bacteria	854	99%	0	X57399
ADN polimerasa	Exp. génica	<i>S. flexneri</i>	bacteria	773	97%	0	AE015400
Timidina kinasa	Exp. génica	<i>S. flexneri</i>	bacteria	119	94%	$8e^{-24}$	AE015150
Timidina kinasa	Exp. génica	<i>S. flexneri</i>	bacteria	180	92%	$2e^{-42}$	AE015150
Timidina fosforilasa	Exp. génica	<i>S. coelicolor</i>	bacteria	104	70%	$2e^{-21}$	NP_629043
Alx (Activador de transcripción de leukotoxin)	Exp. génica	<i>M. haemolytica</i>	bacteria	53	47%	$7e^{-07}$	AAC44666
ARNt sintasa	Exp. génica	<i>P. falciparum</i>	bacteria	49	36%	$3e^{-05}$	NP_703507
Prot. Putativa RecA/RadA recombinasa	Exp. génica	<i>N. aromaticivorans</i>	bacteria	90	60%	$5e^{-09}$	ZP_00094639
ARNr 24S	Exp. génica	<i>A. tamarensis</i>	dinoflagelado	880	97%	0	AB088279
ARNr 16S	Exp. génica	<i>C. campestris</i>	planta	50	100%	$4e^{-03}$	AJ401353
ARNr 5.8S	Exp. génica	<i>A. tamarensis</i>	dinoflagelado	1251	98%	0	AB088333
ARN polimerasa II	Exp. génica	<i>R. norvegicus</i>	mamífero	91	36%	$1e^{-17}$	XP_218480
Ribonucleo-proteína	Exp. génica	<i>X. laevis</i>	anfibio	43	36%	$2e^{-03}$	P09406
Six2 (factor de transcripción)	Exp. génica	<i>P. dumerilii</i>	nemátodo	82	91%	$2e^{-12}$	AJ316542
Putativa prot. Ena (une actina)	P. celulares	<i>D. Melanogaster</i>	insecto	54	96%	$3e^{-04}$	NM_166331
MoaD (biosíntesis de molibdopterin)	P. celulares	<i>E. coli</i>	bacteria	700	98%	0	X70420
hipotética AidA (adhesina)	P. celulares	<i>Magnetococcus sp</i>	bacteria	59	34%	$4e^{-08}$	ZP_00043272
comp. F de enterobactina sintetasa	P. celulares	<i>E. coli</i>	bacteria	553	93%	$1e^{-154}$	U82598
Proteína Periplasmática TorT	P. celulares	<i>E. coli</i>	bacteria	1146	96%	0	D90737
PAK2 (kinasa)	P. celulares	<i>H. sapiens</i>	mamífero	86	93%	$8e^{-14}$	AF092132
ATPasa (Na/K transporte)	P. celulares	<i>M. musculus</i>	mamífero	50	100%	$7e^{-03}$	XM_354790

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Zinc finger protein	P. celulares	<i>M. musculus</i>	mamífero	46	36%	2e <sup>-04</sup>	XP_232689
Prot. modular unida a calcio	P. celulares	<i>M. musculus</i>	mamífero	74	34%	2e <sup>-12</sup>	XP_218003
pherophorindz1	P. celulares	<i>V. carteri</i>	alga verde	57	44%	1e <sup>-07</sup>	CAD22154
Glicoprot. rica en hidroxiprolina	P. celulares	<i>V. carteri</i>	alga verde	79	47%	3e <sup>-14</sup>	CAB62280
Precursor de prot. de pared celular rica en glicina	P. celulares	<i>petunia</i>	planta	64	32%	2e <sup>-09</sup>	P09789
Kinasa relacionada con cdc2-r	P. celulares	<i>P. falciparum</i>	protozoo	62	42%	2e <sup>-09</sup>	NP_702803
Kinasa relacionada con cdc2-r	P. celulares	<i>P. falciparum</i>	protozoo	58	45%	1e <sup>-07</sup>	NP_702803
gen ycjX (enzima putativa)	No caracterizada	<i>E. coli</i>	bacteria	807	97%	0	AE000230
gen yzzU	No caracterizada	<i>E. coli</i>	bacteria	502	97%	1e <sup>-139</sup>	D90702
Fosfohidrolasa	No caracterizada	<i>S. flexneri</i>	bacteria	559	96%	1e <sup>-156</sup>	AE015141
yebQ (prot de transporte)	No caracterizada	<i>S. flexneri</i>	bacteria	565	93%	1e <sup>-158</sup>	AE015164
Receptor 7 hélices transmembrana	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	65	43%	1e <sup>-10</sup>	BAC05810
Receptor 7 hélices transmembrana	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	59	40%	1e <sup>-08</sup>	BAC05810
Receptor 7 hélices transmembrana	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	67	34%	1e <sup>-10</sup>	BAC05810
Receptor 7 hélices transmembrana	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	52	32%	1e <sup>-05</sup>	BAC05810
richohyalin (intermedio de prot. asoc. a filamento)	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	64	96%	5e <sup>-10</sup>	XP_195464
sclerostin	No caracterizada	<i>M. musculus</i>	mamífero	48	100%	4e <sup>-03</sup>	AF326737
Putativo componente de unión ATP (transporte)	No caracterizada	<i>E. coli</i>	bacteria	167	98%	4e <sup>-41</sup>	NP_417134

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Proteína Nuclear	No caracterizada	<i>E. minor</i>	molusco	46	34%	2e <sup>-04</sup>	AAA98076
Proteína Nuclear	No caracterizada	<i>C. elegans</i>	nemátodo	47	30%	4e <sup>-04</sup>	NP_493794
alpha/beta hidrolasa	No caracterizada	<i>N. punctiforme</i>	cianobacteria	56	38%	9e <sup>-07</sup>	ZP_0011200 5

**Tabla VIII. Genes conocidos encontrados en la genoteca 2**

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	65	56%	3e <sup>-10</sup>	AAL83616
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	113	95%	2e <sup>-22</sup>	AF357522
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	117	98%	1e <sup>-23</sup>	AF357522
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	56	93%	1e <sup>-04</sup>	AF357518
Citocromo b	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	74	95%	2e <sup>-07</sup>	AF142472
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	96	96%	1e <sup>-16</sup>	AF357518
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	113	91%	2e <sup>-22</sup>	AF357522
Citocromo c	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	101	96%	1e <sup>-18</sup>	AF142472
Citocromo c	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	96	95%	9e <sup>-17</sup>	AF142472
Citocromo c	Metabolismo	<i>S. mansoni</i>	platelminto	90	100%	3e <sup>-15</sup>	BE463400
Citocromo c	Metabolismo	<i>P. falciparum</i>	protozoo	86	78%	2e <sup>-16</sup>	NP_701926
Citocromo c	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	115	84%	1e <sup>-22</sup>	AF142472
Citocromo oxidasa subunidad 1	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	141	94%	1e <sup>-30</sup>	AF463413
PCP (prot. Peridinina-clorofila)	Metabolismo	<i>A. tamarensis</i>	dinoflagelado	338	96%	1e <sup>-108</sup>	AJ306426
Gliceraldehido - 3P dehidrogenasa	Metabolismo	<i>A. tamarensis</i>	dinoflagelado	250	81%	1e <sup>-63</sup>	CF948489
ARNr 24S	Exp. Génica	<i>A. affine</i>	dinoflagelado	317	93%	1e <sup>-83</sup>	L38631
ARNr 24S	Exp. Génica	<i>P. micans</i>	dinoflagelado	299	91%	2e <sup>-78</sup>	X15973
ARNr 24S	Exp. Génica	<i>A. catenella</i>	dinoflagelado	591	78%	1e <sup>-166</sup>	AF200667
ARNr 23S	Exp. Génica	<i>P. reticulatum</i>	dinoflagelado	80	94%	3e <sup>-12</sup>	AY004264
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	65	56%	3e <sup>-10</sup>	AAL83616
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	113	95%	2e <sup>-22</sup>	AF357522
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	117	98%	1e <sup>-23</sup>	AF357522
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	56	93%	1e <sup>-04</sup>	AF357518

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Citocromo b	Metabolismo	<i>G. polyedra</i>	dinoflagelado	74	95%	2e <sup>-07</sup>	AF142472
Citocromo b	Metabolismo	<i>P. piscicida</i>	dinoflagelado	96	96%	1e <sup>-16</sup>	AF357518
ARNr 23S	Exp. Génica	<i>P. reticulatum</i>	dinoflagelado	96	90%	1e <sup>-16</sup>	AY004264
ARNr 23S	Exp. Génica	<i>P. reticulatum</i>	dinoflagelado	96	90%	1e <sup>-16</sup>	AY004264
ARNr 16S	Exp. Génica	<i>H. triquetra</i>	dinoflagelado	202	90%	5e <sup>-49</sup>	AF130038
ARNr 16S	Exp. Génica	<i>H. triquetra</i>	dinoflagelado	70	85%	4e <sup>-09</sup>	AF130038
HSP90	P. celulares	<i>C. cohnii</i>	dinoflagelado	93	57%	3e <sup>-31</sup>	AAM02974
Prot. I3 específica de microspora	P. celulares	<i>B. napus</i>	planta	50	57%	3e <sup>-05</sup>	Q00650
Pherophorina	P. celulares	<i>V. carteri</i>	alga verde	52	36%	1e <sup>-05</sup>	T10798
tRNA-Arg(CCU)	P. celulares	<i>S. cerevisiae</i>	levadura	50	91%	3e <sup>-03</sup>	X55342
Ubiquitina	P. celulares	<i>G. cydonium</i>	porífera	76	91%	1e <sup>-10</sup>	X70917
Poliubiquitina	P. celulares	<i>B. natans</i>	cercozoas	50	57%	2e <sup>-05</sup>	AAM51225
Prot. asociada a fimbriae	P. celulares	<i>S. parasanguinis</i>	bacteria	56	31%	7e <sup>-07</sup>	T17451
Zinc finger protein	P. celulares	<i>O. sativa</i>	planta	54	32%	4e <sup>-06</sup>	NP_914841
Homóloga de Extensina	P. celulares	<i>A. thaliana</i>	planta	52	51%	5e <sup>-06</sup>	T01456
dehydrin	No caracterizada	<i>H. vulgare</i>	planta	50	96%	7e <sup>-03</sup>	AF181452
Putativa prot. nuclear	No caracterizada	<i>C. elegans</i>	nemátodo	51	30%	2e <sup>-05</sup>	NP_499936
Antígeno nuclear de proliferación celular	No caracterizada	<i>M. vison</i>	mamífero	50	100%	7e <sup>-03</sup>	AY013710
Receptor 7 hélices transmembrana	No caracterizada	<i>H. sapiens</i>	mamífero	44	56%	8e <sup>-04</sup>	BAC05810
Prot. hipotética hc1	No caracterizada	<i>M. musculus</i>	mamífero	47	45%	7e <sup>-05</sup>	S26689
Putativa aldehido-deshidrogenasa	No caracterizada	<i>E. coli</i>	bacteria	1243	97%	0	U00096
ATP sintasa subunidad beta	No caracterizada	<i>Desmidium</i> sp.	planta	54	89%	3e <sup>-04</sup>	AY093931

Gen	Función	Especie	Grupo taxonómico	Score	Identidad	Valor de E	Nº de acceso Genbank
Putativa polimerasa-proteínasa	No caracterizada	<i>S. flexneri</i>	bacteria	56	100%	$7e^{-05}$	AE005674

## 4.- DISCUSIÓN

En este estudio, se secuenciaron 1.264 ADNc obtenidos de dos genotecas preparadas a partir de cultivos de *Alexandrium catenella* (ACC07). En ambas genotecas se encontró alrededor de un 90% de secuencias únicas, las cuales fueron utilizadas para los análisis posteriores. Este porcentaje es mayor al esperado si se compara con resultados de genotecas de otras microalgas, donde estos valores alcanzan, por ejemplo 83% en una genoteca de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Scala y col., 2002) y un 44% en el dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (Bachvaroff y col., 2004).

La mayor parte (83%) de las secuencias únicas no pudieron ser homologadas con secuencias de las bases de datos internacionales (GenBank), utilizando los parámetros valor de  $E < 10^{-3}$  e identidad  $> 30\%$ . Este porcentaje es relativamente concordante con los descritos por otros autores en estudios similares, realizados en *Chrysochromulina polylepis* y *Karenia brevis*, quienes han obtenido alrededor de un 60% de secuencias no identificadas (John, 2003; van Dolah, 2003) utilizando valores similares en los parámetros de selección. Por otro lado, alrededor de un 80% de las secuencias no identificadas son, probablemente codificantes, ya que poseen marcos de lectura abiertos de más de 200 nucleótidos, por lo tanto la dificultad para identificarlos radica en la falta de secuencias en las bases de datos con las cuales comparar.

De acuerdo a lo esperado, en la producción de cultivos axénicos para la elaboración de la genoteca 2, se obtuvo un cultivo con alrededor de  $10^{-2}$  bacterias/dinoflagelado, después de 6 ciclos de lavados y tratamientos con

antibióticos. Estos resultados concuerdan con los de Uribe y Espejo (2003), que obtuvieron cultivos axénicos, para este mismo organismo, en similar período de tiempo de tratamiento.

Al comparar los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las secuencias identificadas, en la genoteca 1 se encontraron 6 veces más secuencias de origen bacteriano que en la genoteca 2 (37.6% en la primera *versus* 6.1% en la segunda). En cuanto a las secuencias de dinoflagelados, estas son 10 veces más en la genoteca 2 que en la 1 (3.4% en la primera *versus* 33.3% en la segunda). Estos resultados muestran la importancia de trabajar con cultivos axénicos en este tipo de estudios, ya que si bien se realiza una selección de los ARN poliadenilados mediante columnas de oligo(dt), aparentemente este proceso no es suficiente para obtener exclusivamente ARN de origen eucarionte, y por ello resulta imprescindible realizar procesos de eliminación de bacterias de los cultivos. Es importante notar que normalmente, en trabajos realizados por otros autores para la obtención de genotecas de dinoflagelados, no se especifican tratamientos previos de limpieza de los cultivos utilizados ni controles de ausencia de bacterias (Chan y col., 2002; Bae y Hastings, 1994; Lee y col., 1993).

Al comparar la distribución en grupos de ortólogos de proteínas de las secuencias encontradas, la mayor diferencia entre ambas genotecas está en la cantidad de secuencias con función desconocida, alcanzando un porcentaje de 37.6% en la genoteca 1 y un 53.5% en la genoteca 2, esto se debe probablemente a que, a través de la historia las bacterias han sido más estudiadas y secuenciadas que los eucariontes. A modo de ejemplo, existen

más de 150 genomas bacterianos secuenciados *versus* 20 genomas de eucariontes, de ellos 8 son de plantas, que han sido publicados en las bases de datos de NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub\\_g.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub_g.html)).

Los genes de dinoflagelados encontrados corresponden a citocromo b y c, gliceraldehido-3P deshidrogenasa, ARNr, HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) y PCP (*peridinin-chlorophyll protein*). Estos genes han sido muy importantes en estudios filogenéticos y de la evolución de los dinoflagelados y la endosimbiosis secundaria. Mientras que por otro lado, las secuencias bacterianas encontradas corresponden a genes diversos que participan mayoritariamente en metabolismo y expresión génica. La presencia de ARNr (ARN ribosomal) en las secuencias homologadas encontradas puede deberse a que si bien, la purificación por columna de oligo(dT) permite obtener una fracción enriquecida en ARN poliadenilado, ésta de todos modos puede poseer ARNr (ARN ribosomal) o eventualmente ARNt (ARN de transferencia).

Es importante destacar que la principal dificultad en la identificación de genes conocidos en dinoflagelados es la escasez de secuencias de estos organismos presentes en las bases de datos (John; van Dolah; Battacharya; Anderson, (2003) comunicación personal). Por otra parte, la identificación de proteínas conocidas podría verse disminuida por el hecho de que los dinoflagelados, debido a su posición evolutiva primitiva dentro de los eucariontes (Loeblich, 1984) posee proteínas con funciones similares, pero con una baja homología a nivel de secuencia a las encontradas en los demás eucariontes, tal es el caso de la enzima Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) de dinoflagelados. Esta proteína en la especie

*Symbiodinium* posee entre un 54% y un 65% de similitud a la forma II presente en proteobacterias (Narang y col., 1984) y solo un 25% a un 30% con la forma I presente en todos los demás eucariontes (Martín y col., 1992; Morden y col., 1992). Otro ejemplo, es la utilización dentro de los eucariontes del pigmento peridínina para la captación de luz en la fotosíntesis, esto implica la presencia de una proteína insoluble única que une este pigmento, la *Peridinin-chlorophyll protein* (PCP) (Norris y Miller, 1994). Como estas, es probable que existan un alto número de proteínas con baja homología con sus contrapartes secuenciadas en eucariontes.

Al analizar las proteínas de dinoflagelados encontradas, llama la atención que no se encontraron secuencias pertenecientes a genes de Rubisco, esto es extraño considerando que existe un trabajo reciente, en el cual, mediante la detección por anticuerpos anti-rubisco en "*protein gel blots*", muestran la presencia de esta proteína durante todo el ciclo circadiano en el dinoflagelado *Gonyaulax* (Nassoury y col., 2001).

Dentro de las proteínas encontradas pertenecientes a otros grupos taxonómicos relacionados, llama la atención la proteína pteroforina del alga verde *Volvox carteri*, esta es una glicoproteína de la matriz extracelular que está relacionada con la amplificación de señales de diferenciación sexual inducidas por feromonas (Godl y col., 1997). Los dinoflagelados poseen ambos tipos de reproducción, sexual y asexual, por lo tanto podrían utilizar mecanismos de señales similares a los de las algas verdes en algún estado de su ciclo de vida.

La aparición de secuencias homólogas a secuencias bacterianas, en especial cianobacterias, en la genoteca 2 es esperable desde la perspectiva de

que en los dinoflagelados existen 2 tipos de organelos, mitocondrias y cloroplastos, que fueron originalmente bacterias de vida libre, y que actualmente forman parte de los dinoflagelados. Debido a su origen, estos organelos poseen genes similares a cianobacterias que se están expresando habitualmente en los dinoflagelados, ya que constituyen los sistemas de respiración y fotosíntesis de estas microalgas (Gray y col., 1999; Simpson y Stern, 2002).

Dentro de las secuencias de genes conocidos de las genotecas no se encontraron secuencias homologables con genes participantes en la biosíntesis de toxinas u otros metabolitos secundarios de otros sistemas, como por ejemplo, la familia de las poliketidos sintasas que están relacionadas con la síntesis de diversos grupos de productos naturales que incluyen antibacterianos, antihongos, anticáncer, entre otros (O'Hagan, 1991). En dinoflagelados, la familia de poliketidos sintasas se ha relacionado con la síntesis de diferentes toxinas, algunos ejemplos son brevetoxina B, amphidinolido J y ácido okadaico, producidos por *Karenia brevis*, *Amphidinium carterae* y *Prorocentrum lima* respectivamente (Synder y col., 2003). Es importante destacar que las proteínas involucradas en la síntesis de saxitoxina son aun desconocidas. En el trabajo de Synder y col. se encontró un tipo de poliketido sintasa, específicamente el tipo I en la especie *Gymnodinium catenatum* productora de saxitoxina, los cultivos utilizados en este trabajo no eran axénicos pero se entrega evidencia que soportaría el origen dinoflagelar de estos genes (Synder y col., 2003).

Finalmente, es importante destacar que la falta de información en genómica de dinoflagelados es una piedra de tope para muchos trabajos destinados estudiar a nivel molecular y celular estas microalgas y tratar de esclarecer aspectos de su funcionamiento como metabolismo y otros procesos celulares, especialmente aquellos relacionados con la producción de saxitoxinas que ayuden a mitigar los efectos dañinos de estas microalgas y que resultan ser, hasta ahora un misterio. Considerando la importancia nacional y mundial de este tipo de organismos, tanto en sus aspectos beneficiosos como perjudiciales, es que este estudio aporta con información que contribuye, junto con los aportes de los otros grupos a nivel mundial, a la búsqueda de respuestas y soluciones a estos problemas.

## 5.- CONCLUSIONES

En este trabajo, han sido obtenidas 1.264 secuencias de clones recombinantes de dos genotecas de ADNc preparadas a partir de ARNm de *Alexandrium catenella*.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian la importancia de utilizar cultivos de dinoflagelados libres de bacterias en la realización de este tipo de estudios. Comparando los grupos taxonómicos de las secuencias homólogas encontradas en ambas genotecas (la primera de ellas preparada a partir de un cultivo de *A. catenella* original y la segunda a partir de un cultivo axénico), se observa que en la genoteca 1, la cantidad de secuencias de origen bacteriano es mucho mayor (alrededor de 6 veces) y la cantidad de secuencias de dinoflagelados es mucho menor (cerca de 10 veces) que en la genoteca 2, ya que si bien se utilizan métodos de purificación de ARN poliadenilado, estos parecen no ser suficientes para obtener exclusivamente ARN de origen eucarionte.

Por otro lado, en este estudio queda en evidencia la falta de información molecular de dinoflagelados en las bases de datos internacionales, específicamente a nivel de genes secuenciados, ya que la mayor parte de las secuencias en ambas genotecas no pudo ser homologada con otras conocidas de las bases de datos internacionales (un 83%). Esta carencia se manifiesta también en la alta cantidad de secuencias homólogas, de las cuales no se conoce la función que cumplen dentro del organismo original.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos por otros autores en genotecas de dinoflagelados, principalmente en la dificultad de identificar las secuencias obtenidas por la falta de información molecular sobre estas microalgas en general. Este trabajo junto con los de los otros grupos buscan contribuir al nivel de información que se posee de estos organismos para poder así acercarse al esclarecimiento de aquellas características y procesos celulares que los hacen ser tan especiales y a la vez tan nocivos.

## 6.- Bibliografía

Adachi, M., Sako, Y. e Ishida, Y. (1994). Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.* 30:857-863.

Allen, J.R., Roberts, T.M., Loeblich, A.R. III y Klotz, L.C. (1975). Characterization of the DNA from the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* and implications for nuclear organization. *Cell* 6:161-169.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Alvial, A. (1980). Estudio ecológico de la proliferación de primavera del fitoplancton de la Bahía de Valparaíso. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Biología, Universidad de Chile.

Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S. y Lee, C. (1990). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* 104:511-524.

Anderson, D.M. (2003). Comunicación personal. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.

Avaria, S. y Muñoz, P. (1986). Fenómenos de Marea Roja en Valparaíso. *Revista Geográfica de Valparaíso*, Nº 17.

Bachvaroff, T., Concepción, G., Rogers, C., Herman, E. y Delwiche, C. (2004). Dinoflagellate expressed sequence tag data indicate massive transfer of chloroplast genes to the nuclear genome. *Protist.* 155:65-78.

Bae, Y.M. y Hastings J.W. (1994). Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1219:449-456.

Bell, W.H. y Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143:265-277.

Bhattacharya, D., Su Yoon, H. y Hackett, J.D. (2003). Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *BioEssays* 26:50-60.

Bhattacharya, D. (2003). Comunicación personal. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.

Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M. y Bolch, C.J. (1989). Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.* 25:577-590.

Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.

Bougis, P. (1974). Ecologie du plancton marine. Tome I. *Le Phytoplancton*. Masson & Cie. Ed., Paris.

Campodónico, I., Guzmán, L. (1974). Marea Roja producida por *Anphidoma* sp. En el Estrecho de Magallanes. *Ans. Ins. Pat., Punta Arenas (Chile)*, Vol V, Nos 1-2.

Campodónico, I., Guzmán, L. y Lembeye, G. (1975). Una discoloración causada por el ciliado *Mesodinium rubrum* (Lohmann) en Ensenada Wilson, Magallanes. *Ans. Inst. Prat. Punta Arenas (Chile)*, Vol. VI, Nos. 1-2.

Cavalier-Smith, T. (1981). The origin and early evolution of the eukaryotic cell. *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* 32: 33-84.

Cavalier-Smith, T. (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358:109-133.

Chan, K.L., New, D., Ghandhi, S., Wong, F., Lam, C.M.C. y Wong J.T.Y. (2002). Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G<sub>1</sub> phase of the cell cycle in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *App. Environ. Microbiol.* 68:2278-2284.

Comité oceanográfico nacional-Chile. Plan Nacional sobre Floraciones de Algas Nocivas en Chile. (1999).

Doucette, G.J. y Trick, C.G. (1995). Characterization of Bacteria Associated with Different Isolates of *Alexandrium tamarense* In: Lassus, P., Arzul, G., Evard, E., Gentren, P., Manailou, C. (eds.) Harmful Marine Algal Bloom. Lavoissier Science, Paris.

Gaines, G. y Taylor, F.J.R. (1986). A Mariculturist's Guide to Potentially Harmful Marine Phytoplankton of the Pacific Coast of North America. Report N° 10. Prepared for the Marine Resources Section Fisheries Branch, B.C. Ministry of Environment.

Gallacher, S., Smith, E.A. (1999). Bacteria and Paralytic Shellfish Toxins. *Protist.* 150:245-255.

Gish, W. y States, D.J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* 3:266-272.

Gold, K., Hallmann, A., Wenzl, S. y Sumper, M. (1997). Differential targeting of closely related ECM glycoproteins: The pherophorin family from *Volvox*. *EMBO J.* 16: 25-34.

Gray, M.W., Burger, G. y Lang B.F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science*, 283:1476-1481.

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of marine invertebrate animals. W.L. Smith y M.H. Chanley (Eds.). 29-60.

Guillard, R.R.L (1995). Culture Methods. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission (of UNESCO). Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A.D. (eds.) IOC Manuals and Guides N° 33 UNESCO.

Guillebault, D., Sasorith, S., Derelle, E., Wurtz, J.M., Lozano, J.C., Bingham, S., Tora, L. y Moreau, H. (2002). A new class of transcription initiation factors, intermediate between TATA box-binding proteins (TBPs) and TBP-like factors (TLFs), is present in the marine unicellular organism, the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *J. Biol. Chem.* 277:40881-40886.

Guzmán, L. (1976). Estudio sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. V.-El probable Cisto ecdísico de *G. catenella*. *Ans. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)*, Vol 7.

Guzmán, L. y Campodónico, I. (1975). Marea Roja en la región de Magallanes. *Pub. Inst. Pat. Ser. Monogr. Punta Arenas (Chile)* 9:44.

Guzmán, L. y Campodónico, I. (1978). Mareas Rojas en Chile. *Interciencia* 3: 144-151.

Guzmán, L., Campodónico, I. y Hermsilla, J. (1975). Estudio sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. I.-Distribución espacial y temporal de *G. catenella*. *Ans. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)*, Vol VI, N° 1-2.

Herzog, M., Von Boletzky, S. y Soyer, M.O. (1984). Ultrastructural and biochemical nuclear aspects of eukaryote classification: independent evolution of the dinoflagellates as a sister group of the actual eukaryotes. *Orig. Life.* 13:205-215.

Himes, M. y Beam, C. (1975). Genetic analysis in the dinoflagellate *Cryptothecodinium (Gyrodinium) cohnii*: evidence for unusual meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4546-4549.

Hosie, A.H.F. (1998). The application of molecular technics to investigate the production of sodium channel blocking toxins by heterotrophic marine bacteria. PhD thesis, University of Glasgow, UK.

Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989.

John, U. (2003). Molecular ecology of the ichthyotoxic prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.

John, U. (2003). Comunicación personal. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.

Kao, C.Y. (1993). Paralytic shellfish poisons. En I. R. Falconer (ed.), *Algal toxins in seafood and drinking water*. pp. 75-86. Academic Press, London, United Kingdom.

Lagos, N. (1998). Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* 31:375-386.

Lee, D.H., Mittag, M., Sczekans, S., Morse, D. y Hastings, J. (1993). Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *J. Biol. Chem.* 268:8842-8850.

Lenaers, G., Scholin, C., Bhaud, Y., Saint-Hilaire, D. y Herzog, M. (1991). A molecular phylogeny of dinoflagellate protist (Pyrrhophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8, *J. Mol. Evol.* 32:53-63.

Lembeye, G. (1981a). Segunda aparición del Veneno Paralítico de los Mariscos (VPM) asociado a *Gonyaulax catenella*, en Magallanes (Chile), 1981. *Ans. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)*. 1981. vol 12.

Lembeye, G. (1981b). Estructura del fitoplancton asociado a la presencia del Veneno Paralítico de los Mariscos en Seno Unión y áreas adyacentes (Magallanes, Chile), 1981. *Ans. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)*, Vol 12.

Lembeye, G. y Guzmán, L. (1982). ¿Qué son las Mareas Rojas? Publicaciones del Instituto de la Patagonia. Serie de Divulgaciones Técnicas. Punta Arenas, Chile, N°1, pp 12.

Liu, L., Im, H., Cegielski, M., LeMagueres, P., Schultz, L.W., Krause, K.L. y Hastings, J.W. (2003). Characterization and crystallization of active domains of a novel luciferase from a marine dinoflagellate. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 59:761-764.

Loeblich, A.R. III. (1976). Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J. Protozool.* 23:13-28.

Loeblich, A.R. (1984). Dinoflagellate evolution. In *Dinoflagellates* (ed. D. L. Spector), 481-522. Academic Press, New York and London.

Madden, T.L., Tatusov, R.L. y Zhang, J. (1996). Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* 266:131-141.

Margalef, R. (1958). Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. In: Bussati – Traverso (ed-), *Perspectives in marine biology*, Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles, California.

Martin, W., Somerville, C.C. y Loiseaux-de Goer, L. (1992). Molecular phylogenies of plastid origins and algal evolution. *J. Mol. Evol.* 35:385-404.

Morden, C.W., Delwiche, C.F., Kushel, M. y Palmer, J.D. (1992). Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. *BioSystems.* 28:75-90.

Muñoz, P. y Alvial, A. (1988). Proliferación de Microalgas. Origen, dinámica e impactos en Pisciculturas. En: *Técnicas de cultivo y manejo del salmón: Desarrollos recientes*. Seminario internacional organizado por Fundación Chile, Santiago, Chile.

Narang, F., McIntosh, L., y Somerville, C. (1984). Nucleotide sequence of the ribulosebiphosphate carboxylase gene from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol. Gen. Genet.* 193:220-224.

Nassoury, N., Fritz, L. y Morse, D. (2001). Circadian changes in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase distribution inside individual chloroplasts can account for the rhythm in dinoflagellate carbon fixation. *Plant. Cell.* 13:923-934.

Norman, J.E., Gray, M.W. (1997). The cytochrome oxidase subunit 1 gene (cox1) from the dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *FEBS Lett.* 413:333-338.

Norris, B.J. y Miller, D.J. (1994). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant Mol. Biol.* 24:673-677.

Okamoto, O.K., Liu, L., Robertson, D.L. y Hastings, J.W. (2001). Members of a dinoflagellate luciferase gene family differ in synonymous substitution rates. *Biochemistry* 40:15862-15868.

O'Hagan, D. (1991). *The Polyketide Metabolites*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK.

Rae, P.M. (1973). 5-Hydroxymethyluracil in the DNA of a Dinoflagellate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 4:1141-1145.

Rae, P.M. (1976). Hydroxymethyluracil in eukaryotic DNA: a natural feature of the *Pyrrophyta* (dinoflagellates). *Science* 194:1062-1064.

Rae, P.M. y Steele, R.E. (1978). Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: an examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. *BioSystems* 10:37-53.

Raikov, I.B. (1995). The Dinoflagellate nucleus and chromosomes: mesokaryote concept reconsidered. *Acta Protozool.* 34:238-247.

Sala-Rovira, M., Géraud, M.L., Caput, D., Jacques, F., Soyer-Gobillard, M.O., Vernet, G. y Herzog, M. (1991). Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the mayor basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Phyrophyta) *Chromosoma* 100:510-518.

Saldarriaga, J.F., McEwan, M.L., Fast, N.M., Taylor, F.J. y Keeling, P.J. (2003). Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:355-365.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning" A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 74:5463-5467.

Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M.L. y Bowler, C. (2002). Genome properties of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 129:993-1002.

Scholin, C.A. y Anderson, D.M. (1993). Population analysis of toxic and non-toxic *Alexandrium* species using ribosomal RNA signature sequences. In: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* (Ed. by T.J. Smayda & Shimizu), pp. 95-102. Elsevier, New York.

Scholin, C.A., Hallegraeff, G.M. y Anderson, D.M. (1995). Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* 'Species complex' (dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. *Phycologia.* 34:472-485.

Shimizu, Y. (1993). Microbial metabolites. *Chem. Rev.* 93:1685-1689.

Shimizu, Y. (1996). Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:431-465.

Shumway, S.E. (1990). A review of the effects of algal bloom on shellfish and aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society.* Vol 21, Nº2.

Sigee, D.C. (1984). Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. *Biosystems* 16:203-210.

Simpson, C.L. y Stern, D.B. (2002). The treasure trove of algal chloroplast genomes. Surprises in architecture and gene content, and their functional implications. *Plant Physiol.* 129:957-966.

- Synder, R.V., Gibbs, P.D.L., Palacios, A., Abiy, L., Dickey, R., López, J.V. y Rein K.S. (2003). Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Mar. Biotechnol.* 05: 1-12.
- Soyer, M.O. y Puiseux-Dao, S. (1968). La structure fibrillaire et l'orientation des chromosomes chez les Dinoflagellés. *Chromosoma* 24: 251-287.
- Soyer, M.O. y Haapala, O.K. (1974). Division and function of dinoflagellate chromosomes. *J. Microsc.* 19: 137-146.
- Soyer-Gobillard, M.O. (1996). The genome of the primitive eukaryote dinoflagellates: organization and functioning. *Zoological Studies* 35: 78-84.
- Taroncher-Oldenburg, G. y Anderson, D.M. (1998). Identification by Differential Display of Genes Expressed concurrently with Saxitoxin biosynthesis in the Red Tide dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. In Reguera B., Blanco J., Fernández ML., Wyatt T (eds) Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO. Grafisan, Spain, 331-332.
- Taroncher-Oldenburg, G. y Anderson, D.M. (2000). Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding S-adenosylhomocysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2105-2112.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V. y Lipman, D.J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science.* 278:631-637.
- Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. y Koonin, E.V. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29:22-28.
- Uribe, P., Suárez-Isla, B.A. y Espejo, R.T. (1999). Ribosomal RNA heterogeneity and identification of toxic dinoflagellate cultures by heteroduplex mobility assay. *J. Phycol.* 35:884-888.
- Uribe, P. y Espejo R.T. (2003). Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *App. Environ. Microbiol.*, 69:659-662.
- Van Dolah, F. (2003). Functional genomics studies in the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.
- Van Dolah, F. (2003). Comunicación personal. International Symposium, "Genomic studies on toxic microalgae". October 27, 2003, Santiago, Chile.
- Vernet, G., Sala-Rovira, M., Maeder, M., Jacques, F. y Herzog, M. (1990). Basic nuclear proteins of the histone-less eukaryote *Cryptecodinium cohnii*

(*phyrophyta*): two dimensional electrophoresis and DNA-binding properties. *Biochem. Biophys. Acta* 1048:281-289.

Von Stosch, HA. (1972). La signification cytologique de la "cyclose nucleaire" dans le cycle de vie des Dinoflagellé. *Soc. Bot. Fr. Mem.* 201-212.

Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P. y Haltiwanger, R.S. (2001). Modification or epidermal growth factor-like repeats with O-Fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-Fucose protein O-Fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276:40338-40345.

Werner, D. (1992). In symbiosis of plants and microbes. Chapman and Hall, London.

Zardoya, R., Costas, E., López-Rodas, V., Garrido-Pertierra, A. y Bautista, J.M. (1995). Revised dinoflagellate phylogeny inferred from Molecular Analysis of Large-Subunit ribosomal RNA Gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41: 637-645.

Zhang, H. y Lin, S. (2004). Molecular cloning of the major basic nuclear protein genes (MBNP) from 3 dinoflagellates. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=37543011>

Zhang, J. y Madden, T.L. (1997). PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 7: 649-656.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. y Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90:405-413.