



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EFECTO ALELOPÁTICO DE *Chattonella marina*  
var. *marina* (RAPHIDOPHYCEAE) SOBRE  
*Gymnodinium catenatum* (DINOPHYCEAE) EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**LEYBERTH JOSÉ FERNÁNDEZ HERRERA**

**LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2013**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EFECTO ALELOPÁTICO DE *Chattonella marina* var. *marina* (RAPHIDOPHYCEAE)  
SOBRE *Gymnodinium catenatum* (DINOPHYCEAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO"

Presentada por el alumno:

**FERNÁNDEZ**

Apellido paterno

**HERRERA**

materno

**LEYBERTH JOSÉ**

nombre(s)

Con registro: 

A	1	2	0	3	3	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

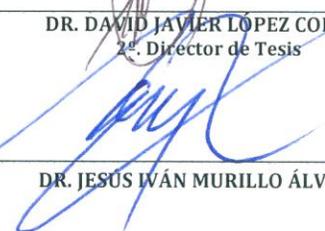
**LA COMISION REVISORA**

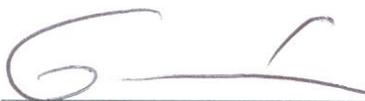
Directores de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT  
Directora de Tesis

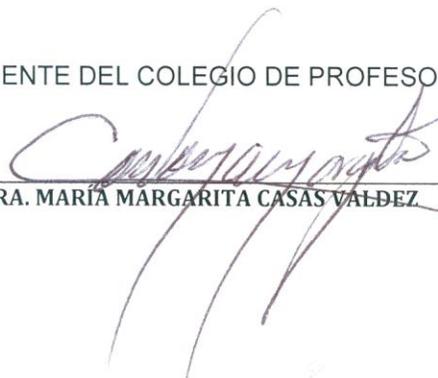
  
\_\_\_\_\_  
DR. DAVID JAVIER LOPEZ CORTÉS  
2º. Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

  
\_\_\_\_\_  
DR. JESÚS IWÁN MURILLO ÁLVAREZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ JESÚS BUSTILLOS BUZMÁN

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 25 del mes Noviembre del año 2013

el (la) que suscribe BM. LEYBERTH JOSÉ FERNÁNDEZ HERRERA alumno(a) del

Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A120335 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT Y DR. DAVID JAVIER LÓPEZ CORTÉS

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EFECTO ALELOPÁTICO DE *Chattonella marina* var. *marina* (RAPHIDOPHYCEAE)

SOBRE *Gymnodinium catenatum* (DINOPHYCEAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: leypiero@hotmail.com - cjband@yahoo.com - dlopez04@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. LEYBERTH JOSÉ FERNÁNDEZ HERRERA

*nombre y firma*

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada gracias al apoyo de las Beca **(CONACyT – 267363)** a las Becas **(PIFI – 1296, 2277 y 1145)** y los Proyectos **(SIP: 20110590, 20121152, 20130942 y 30120868)**, **(SEP- CONACyT 178227)** además de los proyectos **(CIBNOR PC. 0.11 y CIBNOR PC. 0.12)**.

Agradezco igualmente la dirección y apoyo de las personas que integran mi comité tutorial por hacer todo lo necesario para el buen término de esta investigación a mis directores; Dra. Christine Johanna Band Schmidt y Dr. David Javier López Cortés, a los revisores por sus acertadas observaciones; Dr. David Alfaro Siqueiros Beltrones, Dr. José Jesús Bustillos Guzmán, Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez y la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero.

Agradezco el apoyo brindado durante el desarrollo la parte experimental a los responsables de los laboratorios de; Oceanografía Química, Dr. Griselda Margarita Rodríguez Figueroa. A el laboratorio de Microbiología, Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero Dra. Bárbara González Acosta, en CICIMAR. De igual manera a los laboratorios de Pigmentos, Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval y al B.M. Erick Julián Nuñez Vazquez responsable del laboratorio de cromatografía en CIBNOR por dar todas las facilidades durante el desarrollo de los experimentos.

## Contenido

Glosario .....	vii
Lista de figuras .....	¡Error! Marcador no definido.
Lista de tablas.....	xiii
Abstract .....	xvi
Resumen .....	17
1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del problema.....	3
3. Hipótesis.....	4
4. Objetivo general .....	5
4.1 Objetivos particulares.....	5
5. Métodos.....	6
5.1 Cepas de experimentación y condiciones de cultivo.....	6
5.2 Escalamiento y curvas de crecimiento .....	6
5.3 Experimentos de interacción entre <i>Chattonella marina</i> var <i>marina</i> y <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	6
5.3.1 Cultivos con contacto celular.....	6
5.3.2 Cultivos sin contacto celular.....	8
5.3.4 Experimentos de alelopatía con filtrados celulares .....	8
5.4 Conteos y observaciones morfológicas de las cepas.....	10
5.5 Prueba de actividad hemolítica de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> .....	10
5.6 Pruebas estadísticas.....	11
6. Resultados .....	12
6.1 Curvas de crecimiento .....	12
6.2 Efectos alelopáticos en cultivos con contacto celular.....	13
6.2.1 Cambios morfológicos de <i>Gymnodinium catenatum</i> en experimentos de competencia en cultivos con contacto celular con <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	16
6.2.2 Porcentajes células individuales y cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	20
6.3 Cultivos mixtos sin contacto celular .....	22
6.3.1 Cambios celulares y morfológicos de <i>Gymnodinium catenatum</i> experimentos de competencia sin contacto celular con <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> .....	25

6.3.2 Porcentaje de células individuales y en cadenas .....	27
6.4 Efecto alelopático por filtrados celulares .....	29
6.4.1 Cambios celulares y observaciones morfológicas de <i>Gymnodinium catenatum</i> por exposición a filtrados celulares de <i>Chattonella marina var. marina</i> .....	31
6.4.2 Formación de cadenas.....	34
6.5 Actividad hemolítica.....	37
7. Discusiones .....	38
8. Conclusiones.....	46
9. Bibliografía .....	46

## Glosario

**ADN:** El ácido desoxirribonucleico, es un ácido nucleico que contiene la información genética usada para el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

**ARN:** El ácido ribonucleico es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

**Alelopatía:** Un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos químicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos.

**Brevetoxina:** Es una potente neurotoxina de origen marino identificada por primera vez en el dinoflagelado *Ptychodiscus breve* ahora llamado *Karenia brevis* esta toxina provoca la intoxicación neurotóxica por consumo de mariscos (por sus siglas en inglés NSP).

**Cariogamia:** Proceso celular durante la reproducción sexual de algunos dinoflagelados que hace referencia a la fusión de núcleos.

**Cíngulo (o cingulum):** Surco transversal en las células de los dinoflagelados que rodea a toda la célula y que aloja al flagelo transversal.

**Citoplasma:** Es la parte del protoplasma, que en una célula eucariota que aloja al núcleo; consiste en una emulsión coloidal fina de aspecto granuloso conocido como citosol o hialoplasma y en una diversidad de organelos celulares que desempeñan diferentes funciones.

**Cromosomas:** Cada uno de los pequeños cuerpos en forma de bastoncillos en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares (mitosis y meiosis).

**Daño citológico:** Referente a los daños propios de las células tales como la ruptura de la membrana plasmática, deformaciones estructurales que desencadena al mal funcionamiento fisiológico.

**Dinoflagelado:** Propios del filum *Dinoflagellata* son organismos del fitoplancton principalmente marinos de carácter cosmopolita, son protistas, principalmente planctónicos que se mueven en el agua por la acción de dos flagelos desiguales y contienen pigmentos rojo-anaranjados utilizados en el proceso de fotosíntesis.

**Epicono (o episoma):** Nombre que recibe la estructura superior celular de los dinoflagelados atecados o desnudos, esta estructura es de alto valor taxonómico para distinguir entre las especies.

**Flagelo:** Es un apéndice móvil con forma de látigo, presente en muchos organismos unicelulares y en algunas células reproductivas de organismos pluricelulares. En eucariotas la proteína activa es la tubulina y en procariotas es la flagelina.

**Fotoperiodo:** Conjunto de procesos mediante los cuales se regulan las funciones biológicas de los organismos (como por ejemplo su reproducción y crecimiento) en parámetros de la alternancia de los días y noches del año y su duración según las estaciones del año y el ciclo solar.

**Glicolípidos:** Son esfingolípidos compuestos por una ceramida (esfingosina + ácido graso) y un glúcido de cadena corta; carecen de grupo fosfato.

**Hemolisinas:** Proteínas y lípidos que causan la lisis de eritrocitos al dañar su membrana celular.

**Hipnocitogoto:** Cigoto que atraviesa un periodo de reposo antes de germinar, generalmente rodeado de una cubierta protectora formada de celulosa.

**Hipocono (o hiposoma):** Nombre que recibe la estructura inferior celular de los dinoflagelados atecados o desnudos.

**Lisis celular:** Rompimiento de la membrana célula provocado por daños estructurales que se desencadenan estrés fisiológico en su interior principalmente por diferencias isotónicas en el citoplasma.

**Membrana celular:** También llamada membrana plasmática o plasmalema es una bicapa lipídica que delimita las células. Es una estructura laminada formada por fosfolípidos, glicolípidos y proteínas que rodea, limita, da forma y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de la célula.

**Mucocistos:** Masa mucosa que participa en la formación de quistes o provee de una cubierta protectora.

**Núcleo celular:** Orgánulo membranoso que se encuentra en las células eucariotas. Contiene la mayor parte del material genético celular, organizado en múltiples moléculas lineales de ADN de gran longitud formando complejos con una gran variedad de proteínas como las histonas, para formar los cromosomas.

**Pelicle:** Célula protegida por una delgada capa principalmente hecha de celulosa formada por la membrana celular también llamado quiste temporal.

**Péptido:** Son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

**pH:** Medida de acidez o basicidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidronio  $[H_3O^+]$  presentes en determinadas sustancias.

**Planocigoto:** Es un cigoto resultante de la unión de dos gametos flagelados a través de un tubo de conjugación. El cigoto continúa conservando los dos flagelos y es por tanto móvil.

**Ácidos grasos poliinsaturados:** (PUFA) por sus siglas en inglés (Poly Unsaturated Fatty Acids) son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos, entre los más importantes están los de cadenas larga alguno son esenciales para el metabolismo de algunas moléculas importantes por ejemplo el colesterol. El exceso en la producción de estos ácidos grasos contribuye a la producción de metabolitos.

**Quelante:** Sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos (Fe y P) de un determinado complejo molecular.

**Rafidofícea:** Grupo de algas de agua dulce y marina unicelulares, desprovistas de pared celular, presentan un par de flagelos, organizados de tal manera que ambos proceden de la misma invaginación.

**Especies reactivas del oxígeno:** Compuestos denominados (ROS) por sus siglas en inglés (reactive oxygen species) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones libres.

**Saxitoxina:** Es una ficotoxina hidrofílica con más de 20 análogos producida por bacterias, cianobacterias y el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, se une con alta afinidad a los canales de sodio de las membranas celulares esto contribuyen a la intoxicación parálitica por mariscos en humanos PSP (*paralytic shellfish poisoning*)

**Sulcus:** Surco longitudinal que aloja al flagelo longitudinal en los dinoflagelados.

**Toxina:** Sustancia venenosa producida por células vivas u organismos, como animales, plantas, bacterias y otros organismos biológicos, para destacar su origen orgánico, se denomina biotoxina.

**Tricocistos:** Son orgánulos baciliformes, situados en filas y perpendicularmente a la superficie de la célula de ciertos protistas. El tricocisto se dispara en forma de filamento que termina en una punta barbada con aspecto de flecha.

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema del diseño experimental de alelopatía en cultivos mixtos con contacto celular a diferentes densidades celulares. Cepas <i>G. catenatum</i> BAPAZ-5 vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> CMPV-1 (Gc+Ch) Cultivos Controles (Gc) y (Ch). .....	7
Figura 2. Esquema del diseño experimental de cultivos mixtos sin contacto. ....	8
Figura 3. Esquema diseño experimental alelopatía a diferentes volúmenes de filtrados de medio de cultivo cepas de <i>G. catenatum</i> BAPAZ-5 vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> CMPV-1 (Gc+Ch). Controles (Gc) y (Ch). .....	9
Figura 4. Curva de crecimiento <i>Gymnodinium catenatum</i> medio GSe, 35 ups, 24 °C, 12:12 oscuridad/luz, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Con un total de 0.07 divisiones diarias. 12	
Figura 5. Curva de crecimiento <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> medio GSe, 35 ups, 24 °C, 12:12 oscuridad/luz 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Con un total de 0.15 divisiones diarias.....	13
Figura 6. Concentraciones celulares en experimento de competencia cultivos con contacto celular <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> (proporción 1:1).....	14
Figura 7. Concentraciones celulares experimento de competencia <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> proporción 1:2. Se observa un 100% de mortalidad a las 72 horas de exposición. ....	15
Figura 8. Concentraciones celulares en experimentos de competencia <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> proporción 1:2. Se observa un 100% de mortalidad de <i>G. catenatum</i> a las 48 horas de exposición. ....	16
Figura 9. De izquierda a derecha en las microfotografías se observa ruptura de células tanto individuales y en cadena (a) 24 h y (b) 48 h. (c) 24 h interacción células en cadenas <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> . (e) Deformación y (f) lisis de células de <i>G. catenatum</i> 48-72 h. (g,h e i) controles células típicas sin cambios de <i>G. catenatum</i> controles, escala de barrido 20 $\mu\text{m}$ .....	17
Figura 10. Microfotografías cadena de cuatro células de <i>G. catenatum</i> cultivo interactuando con <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> mixto (a), células lisadas (b y c) 24 y 48 h. Mayor abundancia de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> cultivo mixto (e) 48 h. 72 h células muertas de <i>G. catenatum</i> . Controles células sin cambios de <i>G. catenatum</i> (g, h, i).Escala de barrido 20 $\mu\text{m}$ .....	18

Figura 11. a) Células de <i>G. catenatum</i> interactuando con <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> 24 horas, b y c) cadenas formada por dos células (flechas) muestran perdida de los flagelos, desarreglos del cíngulo, sulcus y núcleos prominentes. ....	19
Figura 12. Se muestran a partir de un tiempo de observación a) 0min la secuencia en el desarreglo de la célula de <i>G. catenatum</i> . b) 10 min célula redondeada se pierde completamente la forma de la célula (flecha) aún se observa el flagelo cingular. c) 20 min Cromosomas condensados en el núcleo (flecha) d) 30 min lisis celular. ....	20
Figura 13. Porcentaje de número de células individuales y células en cadenas <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> (proporción 1:1) .....	21
Figura 14. Porcentaje número de células individuales y células en cadenas <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> (proporción 2:1). ....	22
Figura 15. Porcentaje número de células individuales y células en cadenas <i>G. catenatum</i> vs <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> (proporción 1:2). ....	22
Figura 16. Densidades celulares en cultivos mixtos sin contacto interacción <i>G. catenatum</i> y <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> , sin diferencias significativas (Kruskas-Wallis, $p < 0.05$ ), entre los tratamientos y el control.....	23
Figura 17. Densidades celulares en cultivos mixtos sin contacto interacción <i>G. catenatum</i> y <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> , sin diferencias significativas (Kruskas-Wallis, $p < 0.05$ ), entre los tratamientos y el control.....	24
Figura 18. Densidades celulares en cultivos mixtos sin contacto interacción <i>G. catenatum</i> y <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> , ( * ) muestra diferencias significativas (Kruskas-Wallis, $p < 0.05$ ), entre el tratamiento de exposición (Ch) y el tratamientos control (Gc). ....	25
Figura 19. <i>Gymnodinium catenatum</i> morfología celular co-cultivos mixtos sin contacto de <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> proporción (1:2). a) Células individual sin cambios a las 24 y 72 horas b) Control, típica forma dos células en cadena. c) Dos célula en cadena membrana celular rota. d) Célula individual redondeada evidente material nuclear. e-f) Células protegidas por una membrana típico de un quiste temporal.....	26
Figura 20. Proporción porcentual de número de células individuales, cadenas formadas por 2, 3 y 4 células. 100% lo representan la abundancia celular de <i>G. catenatum</i> y su control, experimento cultivo mixto sin contacto. (Proporción 1:1). ...	27

Figura 21. Proporción porcentual de número de células individuales, cadenas formadas por 2, 3 y 4 células. 100% lo representan la abundancia celular de <i>G. catenatum</i> y su control, experimento cultivo mixto sin contacto. (Proporción 2:1). ...	28
Figura 22. Proporción porcentual de número de células individuales, cadenas formadas por 2, 3 y 4 células. 100% lo representan la abundancia celular de <i>G. catenatum</i> y su control, experimento cultivo mixto sin contacto. (Proporción 1:2). ...	28
Figura 23. Abundancias celulares de <i>G. catenatum</i> por exposición a filtrados celulares de <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> . (proporción 1:1).....	29
Figura 24. Número de células de <i>G. catenatum</i> expuestas a diferentes volúmenes de filtrados celulares de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> . a y b) sin diferencias significativas. c) Muestra disminución del 48 % en la densidad celular de <i>G. catenatum</i> y ( * )muestra diferencias significativas (Kruskas-Wallis, $p<0.05$ ) comparando con los controles a las 24 horas de exposición, a 50 mL de volumen de filtrado celular de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> con $10 \times 10^3$ Cél/mL. ....	30
Figura 25. Número de células de <i>G. catenatum</i> expuestas a diferentes volúmenes de filtrados celulares de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> a y b) sin diferencias significativas. c) Muestra disminución del 47 % en la densidad celular de <i>G. catenatum</i> y ( * )muestra diferencias significativas (Kruskas-Wallis, $p<0.05$ ) comparando con los controles a las 24 horas de exposición, a 50 mL de volumen de filtrado celular de <i>C. marina</i> var. <i>marina</i> con $20 \times 10^3$ Cél/mL. ....	31
Figura 26. <i>Gymnodinium catenatum</i> morfología celular por exposición a filtrados celulares de <i>Chattonella marina</i> proporción (1:1) a 10, 20 y 50 mL. a) Control, típica forma dos células en cadena. b) Células sin cambios c) Célula individual sin cambio de forma, con núcleo evidente (flecha). d) Célula individual redondeada evidente membrana propia de un quiste temporal.....	32
Figura 27. <i>Gymnodinium catenatum</i> a y b) Control, típica forma dos células en cadena. Células sin cambios. c) Dos células en cadena muestran deformación del cíngulo y sulcus (flecha) d) Célula individual muestra (flecha) una ligera depresión de epícono e y f) Células individuales alongadas formando quistes temporales, núcleo con cromosomas evidentes.....	33

Figura 28. a, b y c) Diferentes morfologías de células individuales de *G. catenatum*, d y g) células individuales lisada, con material nuclear condensado en el centro, e y h) Cadenas de dos células protegidas por una membrana (flechas) similar a quiste temporal, f) Cadena de 4 células cada célula cada una con forma diferente-a) nucleo con cromosomas, f-b) célula lisada membrana celular rota, f-c) quiste temporal. i) Dos células en cadena, similar a quiste temporal formado en estadios reproductivos. .... 34

Figura 29. Porcentaje células individuales y células en cadenas de *Gymnodinium catenatum*  $20 \times 10^3$  cél/mL, a) 10 mL de filtrado celular, b) 20 mL de filtrados celulares y b) 50 mL de volumen filtrado. Densidad celular de *Chattonella marina* var. *marina*  $20 \times 10^3$  cél/mL. Son cambios en la proporción con los controles. .... 35

Figura 30. Porcentaje células individuales y células en cadenas de *Gymnodinium catenatum*  $20 \times 10^3$  cél/mL, a) 10 mL de filtrado celular, b) 20 mL de filtrados celulares y b) 50 mL de volumen filtrado. Densidad celular de *Chattonella marina* var. *marina*  $10^3$  cél/mL. Sin cambios en la proporción con respecto a los controles. .... 36

Figura 31. Porcentaje células individuales y células en cadenas de *Gymnodinium catenatum*  $10^3$  cél/mL, a) 10 mL de filtrado celular, b) 20 mL de filtrados celulares y b) 50 mL de volumen filtrado. Densidad celular de *Chattonella marina* var. *marina*  $20 \times 10^3$  cél/mL. Son cambios en la proporción con los controles. .... 37

**Lista de tablas**

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 1:1). .... 29

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 2:1). .... 30

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 1:2). .... 31

Tabla 4. Actividad hemolítica de *C. marina* var. *marina* densidad celular  $20 \times 10^3$  cél/mL<sup>-1</sup> ..... 38

## Abstract

In the last years, the co-existence of Raphidophyceae species of genus *Chattonella* and the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* has been reported, both are harmful algal blooms (HABs)-forming algae and produce toxic metabolites. Apparently *Chattonella* species tend to dominate over *G. catenatum*. This particular co-occurrence phenomenon reflect changes in phytoplankton communities, probably due to differences in its growth rate, selective predation, competition for light, nutrients, parasitism, life cycle characteristics, and/or chemical interactions. This latter phenomenon is known as allelopathy, it can cause a decrease in cellular abundance, morphological changes, cyst formation, and changes on the chain length of the affected species. In the present research, it is assumed that *Chattonella marina* var. *marina* may have an allelopathic effect over *G. catenatum*. In order to constrat the aforementioned assumption, strains of *Chattonella marina* var. *marina* (CMPV-1) and *G. catenatum* (BAPAZ-5) were used, both isolated from Bahía de La Paz. Experiments were made placing both species in a mixed crop with and without contact between them, from monoalgal cultures in GSe medium. During the late stationary phase each species was exposed to different cellular proportions from  $20 \times 10^3$  Cells/mL (1:1; 1:2, and 2:1), for 24, 48, and 72 hours. Another experiment consisted in exposure to cellular filters of *C. marina* var. *marina* (10, 20 y 50 mL) over *G. catenatum* with the same cellular proportions but reducing treatment time to 2, 12, and 24 hours. Samples were taken for observation and cell count in all cases. Results showed an evident mortality on the cell number of *G. catenatum* regarding *C. marina* var. *marina*, being 18% at 72 h for 1:1 proportion, for proportions 2:1 and 1:2 a mortality of 100% was found at 48 and 72 h. Ninety percent of live cells formed chains of 2 to 4 cells. Concerning the mixed crops without contact, there were no statistical differences (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) in cell density for 1:1 and 2:1 proportions, contrary to the 1:2 interaction where 33% of mortality was found at 72 h, without any dominant pattern at individual cells nor chains. By exposing *G. catenatum* to filters of *Chattonella* sp., only one significant effect was observed in proportions 2:1 and 1:2 with 50 mL, decreasing in almost 50% of cell number at 24 h. Images show that the interaction with *C. marina* var. *marina* causes cellular lysis and deformations in *G. catenatum*, besides promoting young cysts formation similar to those described for changes in reproductive strategy from vegetative to sexual.

**Keywords:** allelopathy, *Chattonella marina*, *Gymnodinium catenatum*, mortality, cysts

## Resumen

En los últimos años se ha reportado la coexistencia de especies de Raphidophyceae del género *Chattonella* y el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*; ambas especies son formadoras de floraciones algales nocivas (FAN) y producen metabolitos tóxicos. Al parecer especies de *Chattonella* sp. tienden a dominar sobre *G. catenatum*. Estos fenómenos de coexistencia implican cambios en la estructura de las comunidades de fitoplancton que pueden darse por diferencias en sus tasas de crecimiento, depredación selectiva, competencia por luz, nutrientes, por parasitismo, características del ciclo de vida, e interacciones químicas. Este último fenómeno se conoce como alelopatía que puede provocar una disminución en la abundancia celular, cambios morfológicos, formación de quistes y cambios en la longitud de las cadenas de las especies que las forman. En esta investigación se hipotetizó que *Chattonella marina* var. *marina* podría tener un efecto alelopático sobre *G. catenatum*. Para contrastar esto, se utilizó una cepa de *Chattonella marina* var. *marina* (CMPV-1) y una cepa de *G. catenatum* (BAPAZ-5), ambas aisladas de la Bahía de La Paz. Se realizaron experimentos colocando ambas especies en un cultivo mixto con y sin contacto entre ellas a partir de cultivos monoalgales en medio GSe. Durante la fase celular estacionaria tardía se expuso cada especie a diferentes proporciones celulares a partir de  $20 \times 10^3$  Céls/mL (1:1; 1:2 y 2:1), durante 24, 48 y 72 horas. Otro experimento consistió en exponer a filtrados celulares de *C. marina* var. *marina* (10, 20 y 50 mL) sobre *G. catenatum* a las mismas proporciones celulares, reduciendo el tiempo del tratamiento a 2, 12 y 24 horas. En todos los casos se tomaron muestras al final de cada tiempo de observación para observaciones de su morfología y conteos celulares. Los resultados mostraron una evidente mortalidad con respecto al número de células de *G. catenatum* con respecto al 100% de *C. marina* var. *marina* del 18% a las 72 h para la proporción 1:1; en el caso de la proporción 2:1 y 1:2 se encontró una mortalidad del 100% a las 48 y 72 h, respectivamente. El 90 % de las células vivas formaron cadenas de 2 a 4 células. En el caso de los cultivos mixtos sin contacto no hubo diferencias estadísticas (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) en la densidad celular para la proporción 1:1 y 2:1, solamente para la interacción 1:2 donde se obtuvo un 33% de mortalidad a las 72 h, sin que existiera un patrón dominante de células individuales y en cadenas. Al exponer a *G. catenatum* a los filtrados de *Chattonella* sp., únicamente se observó un efecto significativo en la proporciones 2:1 y 1:2 con 50 mL de volumen, disminuyendo un 48% el número de células a las 24 h. La microfotografías muestran que la interacción con *C. marina* var. *marina* provoca lisis celular y deformaciones en *G. catenatum*, además de promover la formación de quistes jóvenes similares a los descritos por cambios en la estrategia de reproducción vegetativa a sexual.

**Palabras Claves:** alelopatía, *Chattonella marina*, *Gymnodinium catenatum*, mortalidad, quistes.

## 1. Introducción

Los florecimientos algales nocivos (FAN) o mareas rojas son eventos comunes en la Bahía de La Paz (Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008). La mayoría de estos eventos han tenido consecuencias inocuas, sin embargo, en los últimos años se ha reportado la presencia de especies del género *Chattonella* (Raphidophyceae) y el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, tanto en la Bahía de La Paz como en otras regiones del litoral mexicano (Barraza- Guardado *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2008; 2009; Hernández-Sandoval *et al.*, 2009, Band-Schmidt *et al.*, 2010). Las especies de *Chattonella* y *G. catenatum* producen metabolitos secundarios nocivos. Las primeras producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oda *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994; Ishimatsu *et al.*, 1996; Twiner & Trick, 2000; Kim *et al.*, 2010), ácidos grasos poliinsaturados libres (Okaichi, 1987), hemaglutininas, hemolisinas (Kuroda *et al.*, 2005) y sustancias tipo brevetoxinas (Band-Schmidt *et al.*, 2012) que han contribuido a la mortalidad de peces al afectar el tejido branquial, causando la muerte por asfixia (Kim *et al.*, 1999; Tiffany *et al.*, 2001). Por otra parte *G. catenatum* produce toxinas paralizantes, siendo responsable de la muerte en humanos a través del consumo de moluscos bivalvos que pueden acumular grandes cantidades, v.gr., hasta 80 mg en 100 mg/gr de carne de moluscos de estas toxinas (Mee *et al.*, 1986; Hernández-Sandoval *et al.*, 2009).

Uno de los aspectos de interés dentro del estudio de especies formadoras de FAN, está enfocado la impacto ecológico que tienen en la composición del plancton (Sellner *et al.*, 2003). Se conoce que las interacciones bióticas que se desarrollan entre especies fitoplanctónicas durante los FAN son dinámicas y complejas ya que estas se desarrollan a escalas espacio temporales cortas (Donaghay & Osborn, 1997; Zingone & Wyatt, 2005; Franks, 2006; Labry *et al.*, 2008; Prince *et al.*, 2008).

La competencia entre especies de fitoplancton puede implicar interacciones directas o indirectas; indirecta se da por las diferencias en sus tasas de crecimiento, características del ciclo de vida, densidades celulares, competencia por la luz, nutrientes (Prince *et al.*, 2008). Directas algunas son la depredación selectiva,

parasitismo y la liberación de productos químicos tales como péptidos extra celulares, quelantes hidroxamatos, aldehídos poliinsaturados y toxinas que pueden inhibir el crecimiento, la movilidad o causar daños celulares en otras especies; este fenómeno es conocido como alelopatía (Lampert & Sommer, 1997; Fistarol *et al.*, 2004; Granéli *et al.*, 2008; Labry *et al.*, 2008). El concepto de alelopatía fue creado por Molisch en 1937 (Rizvi *et al.*, 1992), para describir el efecto negativo en las interacciones entre todas las especies de plantas incluyendo microorganismos. El efecto alelopático fue observado por primera vez en fitoplancton en 1917 por Harder (citado por Wolfe & Rice, 1979), quienes reportan la autoinhibición en agua dulce de la cianobacteria *Nostoc punctiforme*. Actualmente para el fitoplancton, el concepto de alelopatía se refiere a los efectos negativos de aleloquímicos producidos por algunas algas sobre otros grupos taxonómicos de algas (Granéli *et al.*, 2008).

Si bien el concepto de alelopatía para organismos del fitoplancton es generalmente aceptado por los científicos, sigue siendo sumamente complicado deducir sus mecanismos de acción en el campo, por la complejidad del ecosistema marino, además de que la diversidad de formas y estructuras de las especies de fitoplancton, es mayor, comparado con plantas terrestres (Inderjit & Del Moral, 1997; Cembela, 2003). Esto sumado a que en sí, el proceso de la alelopatía es complicado en el océano; no solo porque se desarrolla en una escala de corto tiempo sino por la dilución de los aleloquímicos en el medio acuoso que hace que estos estén presentes en cantidades nanomolares o menores (Legrand *et al.*, 2003).

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la interacción alelopática en condiciones de laboratorio, es el cultivo de dos especies juntas en condiciones controladas, generalmente con el medio de cultivo enriquecido para un óptimo crecimiento de ambas especies. El efecto de los metabolitos secundarios se evidencia empleando filtrados de los exudados liberados al medio de cultivos; tanto la técnica de cultivos mixtos como de filtrados celulares; permiten detectar cambios en el crecimiento y la inhibición del mismo en las especies que coexisten y en

algunas ocasiones permite elucidar específicamente al aleloquímico en cuestión (Windust *et al.*, 1996; Arzul *et al.*, 1999; Van Dolah, 1999).

Prince *et al.* (2008) examinaron los efectos de los exudados de *Karenia brevis* sobre la diatomea *Skeletonema costatum* y encontraron que tienen un efecto alelopático variable cuando se expuso a diferentes condiciones de cultivo, sin embargo, no tuvo relación con la abundancia de *K. brevis*, ni con la concentración de brevetoxinas. La variación, según estos autores, se debe a la presencia de especies que compiten con *K. brevis*, particularmente la presencia de *S. costatum* que disminuye el efecto inhibitor de los exudados de brevetoxinas tipo II; debido a la sucesión misma de los FAN de *K. brevis* y a que no siempre se produce la misma cantidad del aleloquímico. En diferentes cepas del dinoflagelado *Alexandrium tamarense* se ha observado que la producción de sustancias alelopáticas varía de cepa a cepa y no está influenciada por la presencia de depredadores; esto puede ser una explicación plausible del papel de los aleloquímicos en poblaciones naturales de *Alexandrium* y su éxito en la formación de florecimientos algales (John *et al.*, 2010). También se han observado efectos de alelopatía de *Alexandrium minutum* hacia *Chaetoceros neogracile*, disminuyendo la actividad fotosintética. Así, midiendo las diferencias en el contenido de clorofila-a la células, se ha concluido que esta fotoinhibición probablemente afecta a nivel del fotosistema II (Lelong *et al.*, 2010). Una crisofita *Ochromonas* sp. ocasionó una disminución significativa de la tasa de crecimiento de la cianofita *Microcystis aeruginosa* y su toxicidad disminuyó en un 90% con respecto a los controles: estos datos fueron comparados con los obtenidos en campo y ambos resultados mostraron situaciones similares que describen claramente la interacción de ambas especies en sistemas naturales (van Donk, 2010). En condiciones de laboratorio el dinoflagelado *Fragilidium duplocampanaeforme* presentó efectos alelopáticos sobre varias especies fitoplanctónicas, observándose diferentes respuestas con cada especie, tales como disminución de la longitud de cadenas, muerte celular y la formación de quistes temporales (Kim & Park, 2010) demostrando que la alelopatía puede modificar completamente la estructura de la comunidad fitoplanctónica.

## 2. Planteamiento del problema

Para la Bahía de La Paz, se encuentra documentada la presencia de *Chattonella* spp. y *G. catenatum* (Cortés-Altamirano *et al.*, 2006, López-Cortés *et al.*, 2011). El primer registro de *Gymnodinium catenatum* se observó en 2002 (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004), y nuevamente en 2007, cuando se registró la presencia de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2008; Hernández-Sandoval *et al.*, 2009). Las mayores concentraciones de  $79 \times 10^3$  cél. L<sup>-1</sup> de *G. catenatum* se estimaron en Junio de 2008 en la Bahía de La Paz (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2008). También se ha registrado la capacidad de este dinoflagelado de coexistir en el ambiente con organismos de otros grupos planctónicos, como son el ciliado *Myrionecta rubra*, los dinoflagelados *Cochlodinium polykrikoides* y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, la diatomea *Pseudo-nitzschia* sp., y las rafidofíceas *Chattonella marina* y *Chattonella ovata* (Barraza-Guardado *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a, 2009b, 2011). A la fecha, sólo existe un evento de *C. marina* reportado en la Bahía con un rango de concentración celular de  $1.9$  a  $2.5 \times 10^6$  cél/L<sup>-1</sup> (Band-Schmidt *et al.*, 2005). En 2011 se reportó por primera vez la coexistencia en la Bahía de La Paz de *C. marina* (Raphidophyceae) en concentraciones celulares de  $14 \times 10^3$  a  $36 \times 10^3$  cél/L<sup>-1</sup> y de *G. catenatum* con densidades de  $1 \times 10^3$  a  $19 \times 10^3$  cél/L<sup>-1</sup>; se describieron los factores hidrográficos (nutrientes, temperatura, clorofila a y vientos) durante su presencia y, al parecer, *Chattonella marina* tiende a dominar sobre *G. catenatum*. Aun cuando existen reportes de la presencia de *G. catenatum* y *Chattonella* spp. a nivel mundial, no existe información sobre las posibles interacciones bióticas entre *G. catenatum* y *Chattonella*, y se desconoce si existe algún efecto alelopático entre ambas especies. Por lo anterior es necesario comprender los mecanismos o estrategias potenciales para que determinan la dominancia de una especie sobre otra para inferir en los roles ecológicos que pueden resultar de esta interacción ya que la alelopatía puede ser uno de los factores clave, que promueve la dominancia en las especies ya que no existen estudios sobre efectos alelopáticos de Rafidofíceas sobre *G. catenatum*.

### **3. Hipótesis**

Reconociendo que el fenómeno de alelopatía promueve la dominancia de algunas especies cuando coexisten y, con base en las características nocivas y la dominancia de *Chattonella marina* var. *marina* durante florecimientos algales se espera que esta tenga un efecto alelopático sobre el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* bajo condiciones de cultivo.

### **4. Objetivo general**

Determinar el efecto alelopático de *C. marina* var. *marina* en el dinoflagelado tóxico *G. catenatum* en condiciones de cultivo.

#### **4.1 Objetivos particulares**

Determinar si las densidades celulares de *G. catenatum* se ven afectadas en presencia de células de *C. marina* var. *marina*.

Describir los cambios morfológicos, longitud de cadenas y producción de quistes de *G. catenatum* por su interacción con *C. marina* var. *marina*.

Evaluar los efectos provocados por filtrados del medio del cultivo de *C. marina* var. *marina* en *G. catenatum*.

## 5. Métodos

### 5.1 Cepas de experimentación y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa de *C. marina* var. *marina* (**CMPV-1**) y una de *Gymnodinium catenatum* (**BAPAZ-5**), ambas aisladas de Bahía de La Paz. Las cepas se mantuvieron por triplicado en medio GSe con extracto de lombricompostaje (Blackburn *et al.*, 2001), a 35 ups, 24 °C ± 1°C con iluminación continua de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ciclo luz-obscuridad 12:12, en tubos de polietileno de 50 mL de capacidad con 20 mL de cultivo. El desdoblamiento de los cultivos se realizó cada 15 días.

### 5.2 Escalamiento y curvas de crecimiento

Se llevó a cabo un escalamiento progresivo de las cepas de *C. marina* var. *marina* y *G. catenatum* desde 20 mL de cultivo hasta 150 mL, desdoblando los cultivos en la fase exponencial tardía con un volumen del 5%. Partiendo de una densidad celular de 500 cél/mL en matraces de 250 mL: Se realizaron conteos cada tercer día por triplicado, se registraron las densidades celulares y se calculó la tasa de crecimiento en la fase estacionaria, según Guillard (1979), donde  $\mu = \text{Ln}(N/N_0)/(t-t_0)$ ,  $t$  y  $t_0$  son el tiempo de inicio, para  $N$  y  $N_0$  representan Cél/mL respectivamente,  $t_0$  y  $N_0$  corresponde al momento inicial. El resultado corresponde al número de divisiones por día. Para los conteos las células de *G. catenatum* fueron fijadas con una solución de Lugol mientras que para *C. marina* var. *marina* fueron contadas vivas, ambas especies se contaron en una cámara Sedgwick-Rafter de 1.0891 mL de capacidad en un microscopio invertido (Zeiss).

### 5.3 Experimentos de interacción entre *Chattonella marina* var. *marina* y *Gymnodinium catenatum*

#### 5.3.1 Experimento de cultivos con contacto celular

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase exponencial tardía, se iniciaron los cultivos monoespecíficos de cada especie para posteriormente realizar los cultivos mixtos y así poder evidenciar los efectos de dominancia entre ambas especies. Los cultivos monoespecíficos se iniciaron con una densidad celular de 500 cél/mL de

cada especie. Se diseñaron tres experimentos de cultivo mixto iniciando con una concentración inicial de  $20 \times 10^3$  cél/mL de *G. catenatum* y de *C. marina* var. *marina* en las siguientes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2). Estas concentraciones fueron asignadas con base en las concentraciones reportadas para *Chattonella* y *G. catenatum* en campo y de manera ascendente para verificar si existe relación entre la concentración celular-efecto. Todos los cultivos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio GSe bajo las condiciones de cultivo descritas. Se inocularon ambas especies con las diferentes proporciones a manera de tratamientos, con ambas especies interactuando de manera directa. Como tratamientos control se utilizaron las mismas concentraciones celulares en cultivos monoalgales para descartar cualquier posible auto-inhibición. Se tomaron 5 mL de muestra a las 24, 28 y 72 horas para determinar los cambios en la densidad celular, el número de células por cadena y la formación de quistes (Fig.1).

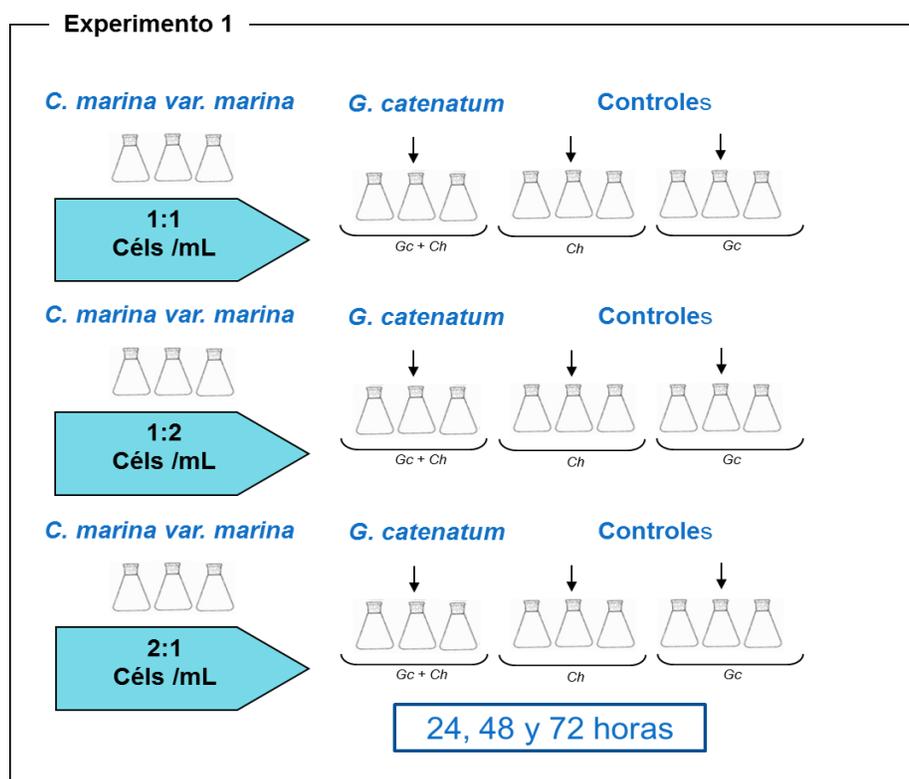


Figura 1. Esquema del diseño experimental de alelopatía en cultivos mixtos con contacto celular a diferentes densidades celulares. *G. catenatum* vs *C. marina* var. *marina* (*Gc+Ch*). Controles (*Gc* y *Ch*).

### 5.3.2 Cultivos sin contacto celular

Este experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL; dentro de este se colocó un dispositivo construido con un tubo tipo falcon de 15 mL con una membrana de Nylon de 25  $\mu\text{m}$  Millipore<sub>TM</sub> (Fig. 2); en el matraz se inocularon 150 mL de cultivo de *G. catenatum* con una densidad celular de  $20 \times 10^3$  cél/mL y dentro del tubo se inocularon 15 mL de *C. marina* var. *marina* con densidades celulares de  $20 \times 10^3$  cél/mL en proporciones de 1:1, 2:1 y 1:2. Los tratamientos control se iniciaron con las mismas densidades y proporciones celulares pero de cada especie por separado, todos por triplicado. Se tomaron 5 mL de muestra para observaciones y conteos celulares a las 24, 48 y 72 horas.

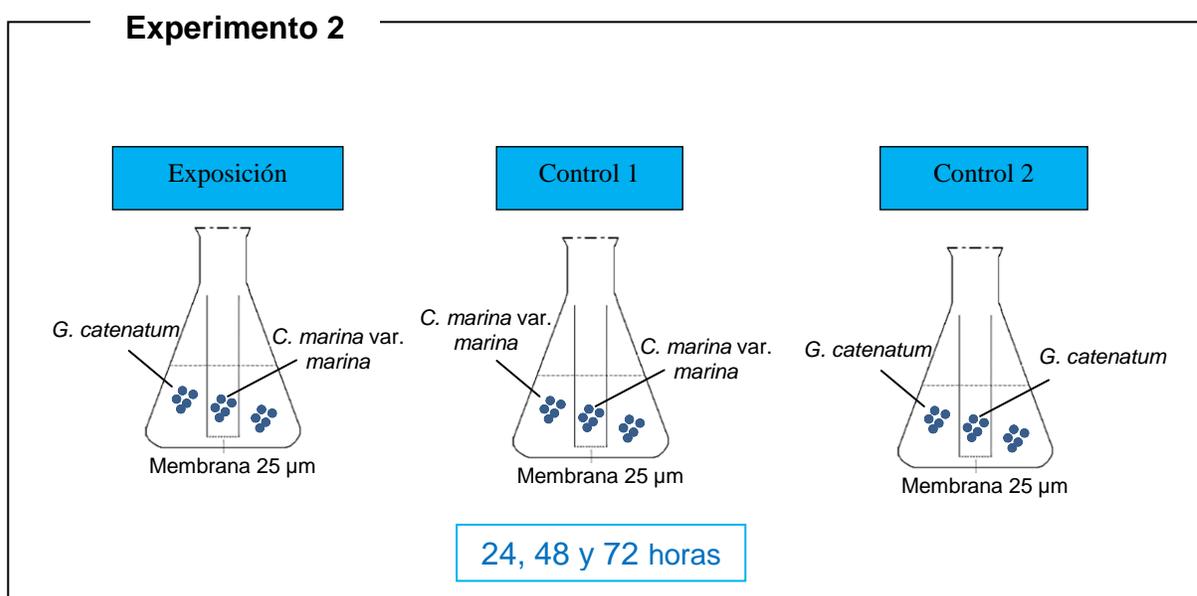


Figura 2. Esquema del diseño experimental de cultivos sin contacto celular de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*.

### 5.3.4 Experimentos de alelopatía con exposición a filtrados celulares

Para determinar que la posible actividad alelopática de *C. marina* var. *marina* hacia *G. catenatum* es provocada por sustancias químicas o exudados celulares liberados en el medio de cultivo como parte de sus metabolismo, se mantuvo a *Chattonella* en un cultivo de lote hasta que alcanzó la fase exponencial tardía, y se retiraron o extrajeron las células utilizando microfiltros de fibra de vidrio de 0.7  $\mu\text{m}$

GF/F Whatman International Ltd., con una bomba de vacío manual Nalgen-6130. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se inocularon 150 mL de cultivo de *G. catenatum* estas células se expusieron a diferentes volúmenes (10, 20 y 50 mL) de los filtrados de medio cultivo con exudados celulares de *C. marina* var. *marina* por triplicado. Como tratamiento control, a los mono cultivos se les añadió el mismo volumen, pero de sus propios filtrados y uno más al que solo se le agregó medio de cultivo estéril. Se tomó el mismo volumen de muestra que en los cultivos mixtos, para conteos celulares, medición de pH y observaciones morfológicas a partir de las 2, 12 y 24 h (Fig. 3).

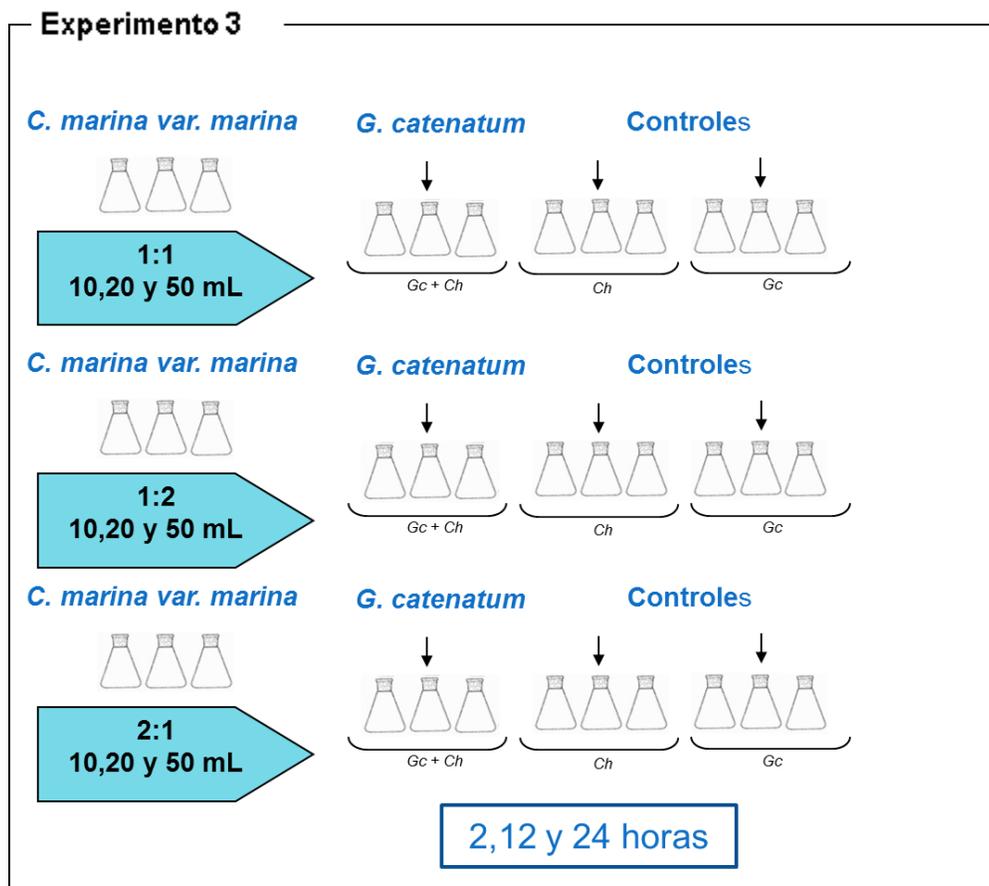


Figura 3. Diseño experimental de alelopatía con diferentes volúmenes de filtrados de medio de cultivo de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina* (GC+Ch). Controles (*Gc* y *Ch*).

Durante las fases del crecimiento en laboratorio algunas especies de fitoplancton modifican el valor del pH del medio de cultivo; cuando otras especies son expuestas a este medio, la modificación del pH provoca la inhibición de su crecimiento. (Schmidt & Hansen, 2001; Hansen, 2002; Granéli *et al.*, 2008). De acuerdo a lo descrito por estos autores, se registraron los valores de pH durante el desarrollo de los experimentos para determinar si este se veía modificado y descartar algún efecto negativo entre las especies a competir.

#### **5.4 Conteos y observaciones morfológicas de las cepas**

Para obtener los datos de abundancia de cada especie en cada uno de los tratamientos se tomaron 5 mL de cada lote experimental. Los conteos se realizaron con células vivas de *C. marina* var. *marina*; para *G. catenatum* se realizó con células vivas y fijadas en lugol utilizando una cámara de Sedgwick-Rafter en un microscopio invertido (Zeiss). En el caso de *G. catenatum* se registró la longitud de las cadenas, formación de quistes, células lisadas, deformadas o pérdida de movilidad. Todas las observaciones, así como el seguimiento de la interacción *in vivo* de todos los experimentos se realizó en un microscopio óptico (Zeiss Axioscop). Se tomaron microfotografías con una cámara (ScopePhoto 3.0) a diferentes aumentos.

#### **5.5 Prueba de actividad hemolítica de *C. marina* var. *marina***

De un cultivo de *C. marina* var. *marina* durante la fase exponencial tardía, con una densidad celular de  $20 \times 10^3$  cél/mL, se obtuvo 1 mL de filtrado separando las células por filtración mediante una membrana estéril GF/F de 0.7  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante fue utilizado inmediatamente en la prueba de actividad hemolítica por el método sugerido por Yamasaki *et al.*, 2011. Alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante por triplicado se colocaron en cajas de Petri con TSA agar sangre, se dejaron en incubación por 72 horas a temperatura ambiente y se registró el halo de inhibición como prueba de la actividad hemolítica.

## **5.6 Pruebas estadísticas**

Los datos de los conteos de abundancias celulares el número de células individuales y las que formaban cadenas se registraron en una base de datos en el programa (Microsoft Excel profesional 2010), los datos se exportaron al programa (R 2.12.2). Se realizaron las pruebas de normalidad y al término de esto nuestros datos no cumplieron los criterios de ajustes paramétricos. De esta manera se corrió la prueba de (Kruskal-Walis) en el programa (R) con un valor de significancia ( $p < 0.05$ ) para observar diferencias significativas entre los tratamientos.

## 6. Resultados

### 6.1 Curvas de crecimiento

Partiendo de una concentración celular de 500 cél/mL se distinguen las etapas de típicas de crecimiento para *G. catenatum* (Fig. 4): fase lag (1-2 días), fase aceleramiento (2-10 días), fase exponencial (10-20 días) con una densidad máxima de  $4,300 \pm$  cél/mL y el inicio de la fase de decaimiento entre los días 22 y 25.

Para *C. marina* var. *marina* (Fig. 5), iniciando con una concentración de 500 cél/mL se obtuvo una curva de crecimiento que tiene expresadas los días similares en cuanto a sus etapas, pero con un mayor número de células, con un valor máximo de  $30,000 \pm$  cél/mL. Los conteos se encuentran dentro de los intervalos óptimos reportados para esta especie en condiciones de laboratorio (Imai & Yamaguchi 2010).

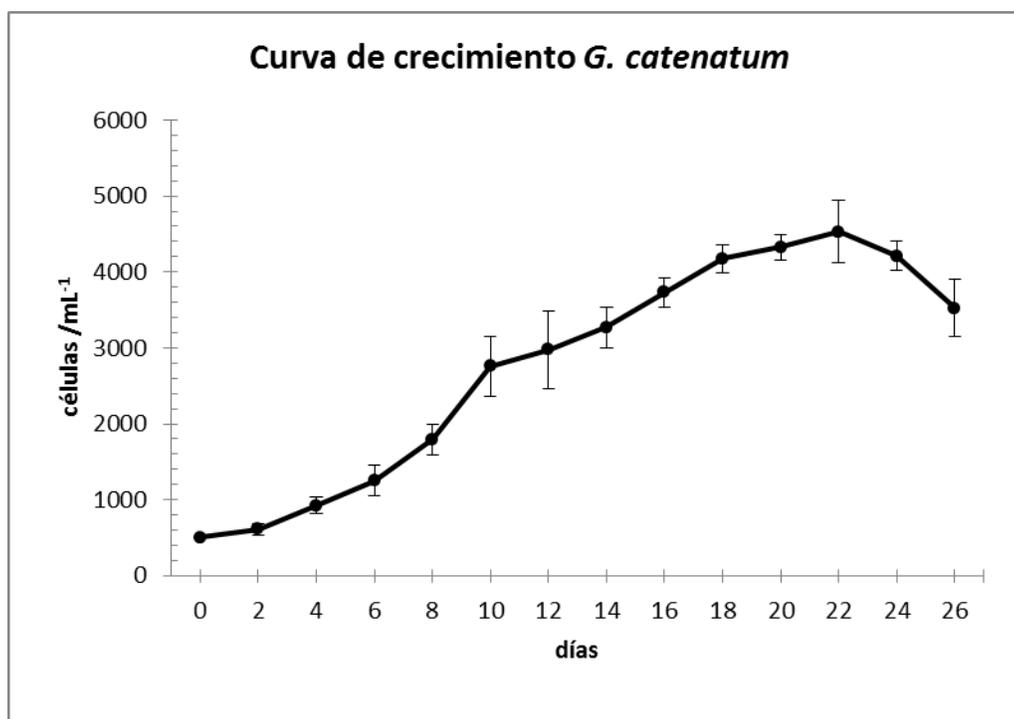


Figura 4. Curva de crecimiento *Gymnodinium catenatum* medio GSe a 35 ups, 24 °C, 12:12 oscuridad/luz  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8.

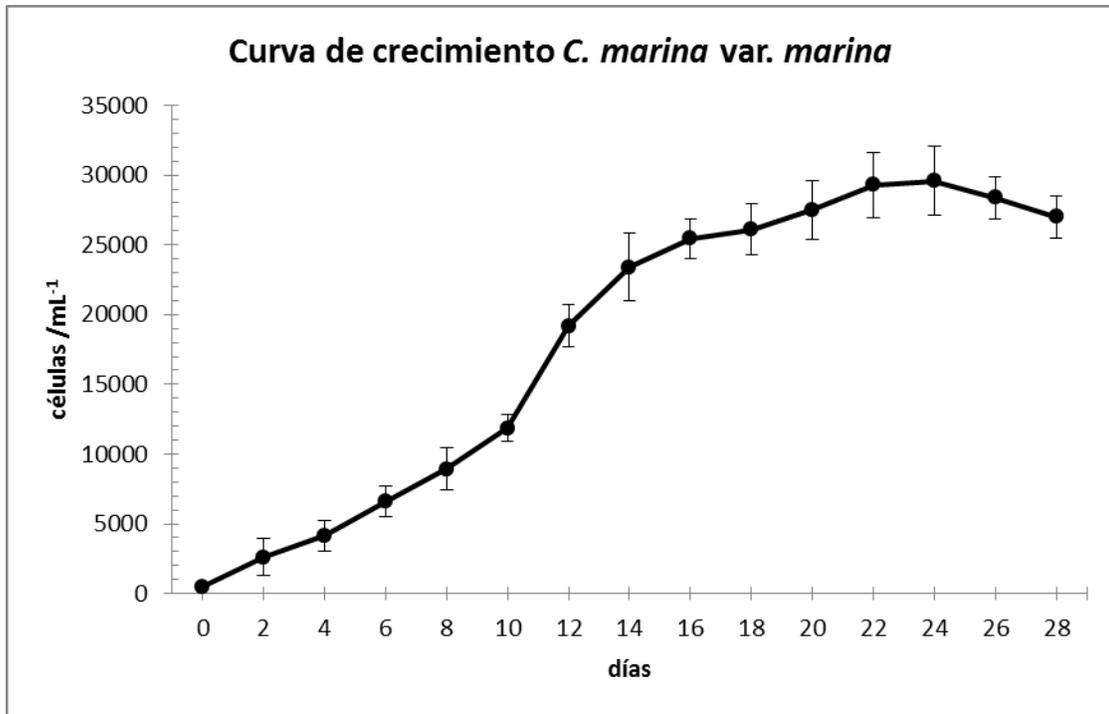


Figura 5. Curva de crecimiento *Chattonella marina* var. *marina* medio GSe a 35 ups, 24 °C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8.

## 6.2 Efectos alelopáticos en cultivos con contacto celular

Se obtuvieron un total de 81 muestras en los experimentos de interacción de cultivos con contacto celular de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*, con los siguientes resultados; para la proporción (1:1) a las 24 h la densidad celular de *C. marina* var. *marina* fue de  $21 \times 10^3 \text{ cél/mL}^{-1}$  y de *G. catenatum*  $20 \times 10^3 \text{ cél/mL}^{-1}$  partiendo de concentraciones iguales  $20 \times 10^3 \text{ cél/mL}^{-1}$ . A las 48 h no hubo un aumento en el número de células/mL de *G. catenatum*, mientras que *Chattonella* incrementó alcanzando una biomasa máxima de  $40 \times 10^3 \text{ cél/mL}^{-1}$  a las 72 h, mientras que la biomasa de *G. catenatum* disminuyó a  $15 \times 10^3 \text{ cél/mL}^{-1}$  (figura 6).

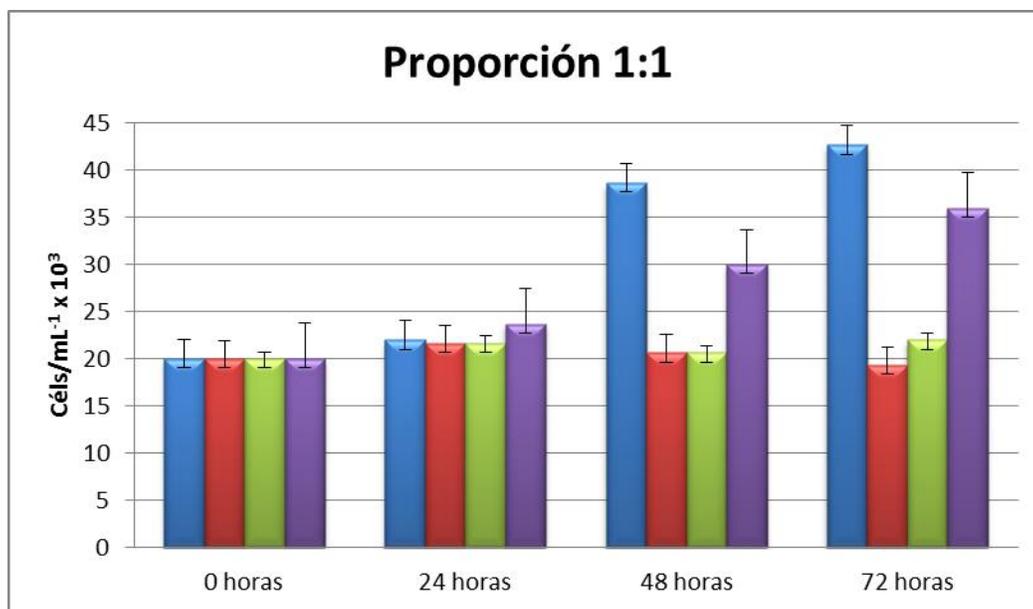


Figura 6. Concentración celular de *G. catenatum* (barra roja) y *C. marina* var. *marina* (barra azul) en experimentos de competencia cultivos con contacto celular. La barra verde el control de *G. catenatum* y la barra morada la del control de *C. marina* var. *marina*. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

Para la proporción 2:1 (Fig. 7) solo sobrevivieron células de *G. catenatum* hasta las 48 horas con abundancia de  $15$  y  $6 \times 10^3$  cél/mL; hasta las 72 horas solo se encontraron células de *C. marina* var. *marina* con abundancias de  $11$ ,  $21$  y  $28 \times 10^3$  cél/mL a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. De la abundancia máxima inoculada hasta el final de cada tiempo de observación *G. catenatum* tuvo una disminución de un 18% a un 100% de mortalidad por el efecto de *C. marina* var. *marina*. Los controles de *G. catenatum* mantuvieron una densidad celular de  $20$  a  $26 \times 10^3$  cél/mL<sup>-1</sup> durante las 72 horas de observación.

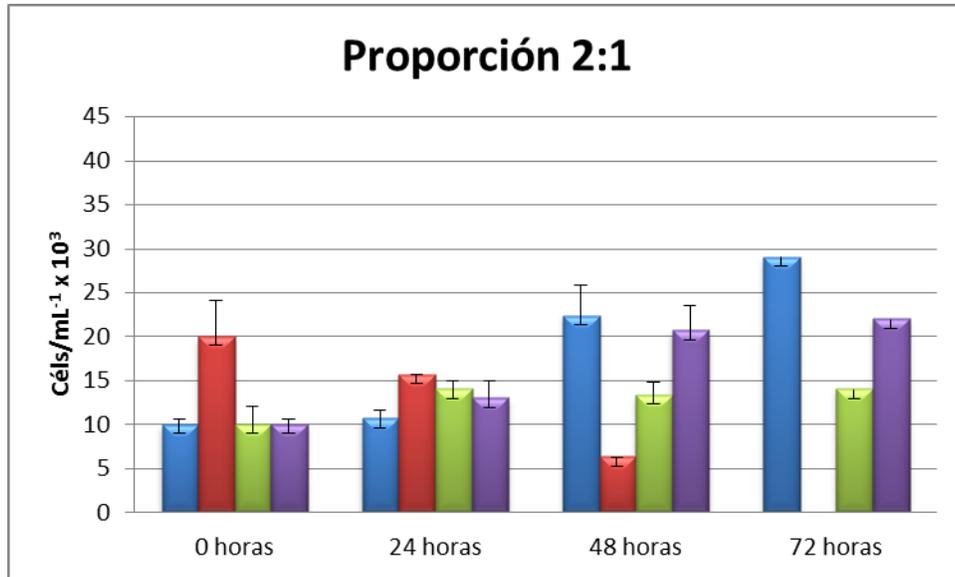


Figura 7. Concentración celular de *G. catenatum* (barra roja) y *C. marina var. marina* (barra azul) experimento de competencia con contacto celular. La barra verde representa el control de *G. catenatum* y la barra morada el control de *C. marina var. marina*. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

En el experimento con contacto celular en la proporción 1:2 (Fig. 8) *G. catenatum* vs *C. marina var. marina*, la dominancia de la rafigidofícea se observó en menor tiempo con respecto al cultivo 2:1; únicamente se cuantificaron células vivas de *G. catenatum* a las 24 horas, después de ese tiempo todas las células cuantificadas estaban muertas. Los controles no tuvieron una disminución en las densidades celulares. Con respecto a los tratamientos de cultivos mixtos, *G. catenatum* tuvo una mortalidad de un 34% a 100% y *C. marina var. marina* tuvo un aumento de casi el 84%.

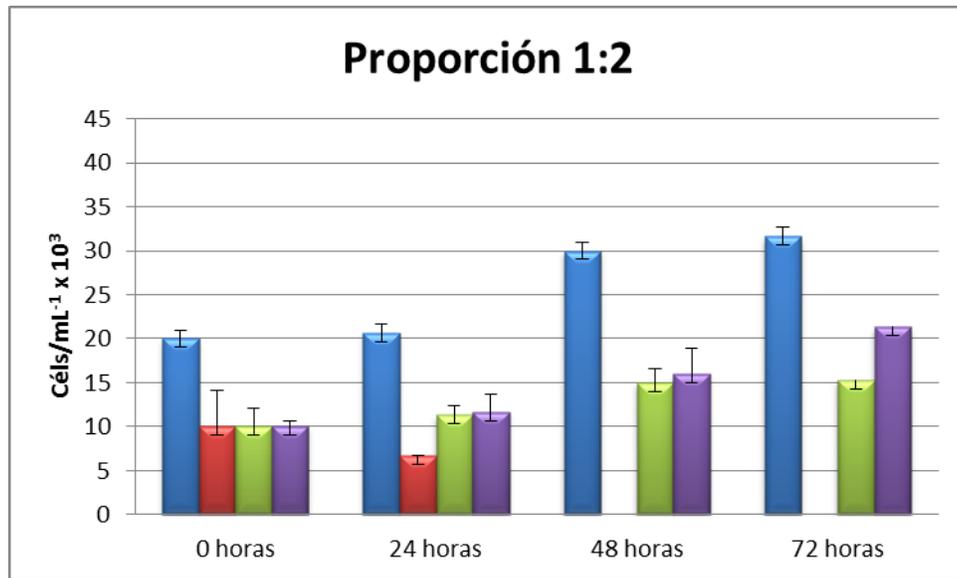


Figura 8. Concentración celular de *G. catenatum* (barra roja) y *C. marina var. marina* (barra azul) en experimento de competencia con contacto celular. La barra verde el control de *G. catenatum* y la barra morada la del control de *C. marina var. marina*. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

### 6.2.1 Cambios morfológicos de *Gymnodinium catenatum* en experimentos de competencia en cultivos con contacto celular con *Chattonella marina var. marina*

Al estar *G. catenatum* en contacto con células de *C. marina var. marina* se identificaron los siguientes patrones en la deformación de las células *G. catenatum*; células redondeadas con núcleos prominentes, ruptura de la membrana células y lisis. Estos cambios fueron evidentes en todas las proporciones de interacción siendo más notables a las 24 horas en las proporciones 2:1 y 1:2. (Figs. 9, 10 y 11).

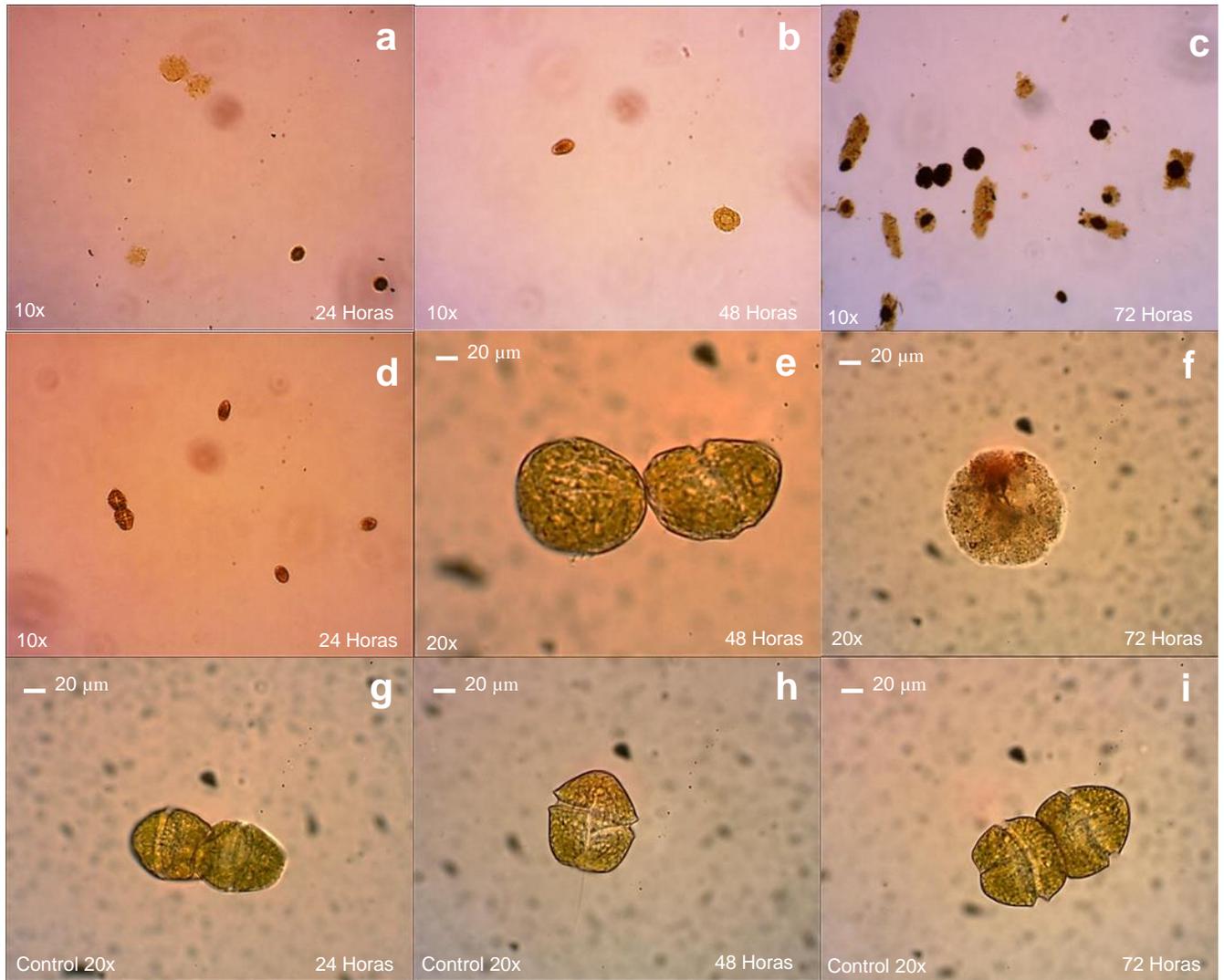


Figura 9. De izquierda a derecha en las microfotografías se observa ruptura de células tanto individuales como en cadena a las 24 h (a) y 48 h (b). Células de *C. marina* var. *marina* interactuando con *G. catenatum* (d). (c) 24 h interacción de células en cadenas *G. catenatum* con *C. marina* var. *marina*. (e) Deformación y (f) lisis de células de *G. catenatum* a las 48 y 72 h., escala de barrido 20 µm. Controles células típicas de *G. catenatum* controles (g, h, i).

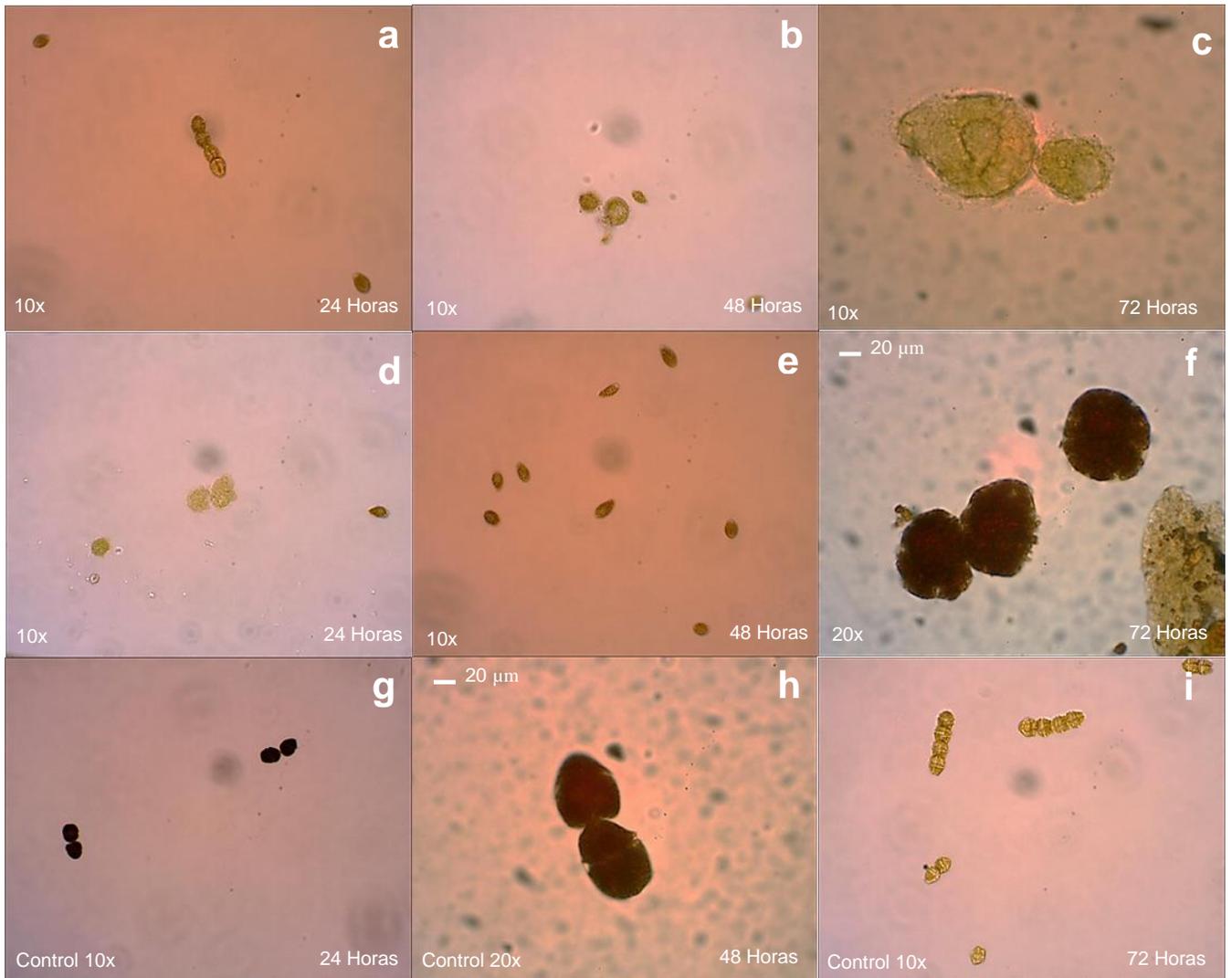


Figura 10. Cadenas de cuatro células de *G. catenatum* en cultivos con *C. marina* var. *marina* (a), células lisadas de *G. catenatum* (b y c) 24 y 48 h. Mayor abundancia de *C. marina* var. *marina* en cultivo mixto (e) cultivo a las 48 h. 72 h células muertas de *G. catenatum*. Cultivo control de *G. catenatum* sin cambios sin cambios morfológicos observados en los controles (g, h, i). Escala de barrido 20  $\mu$ m.

Las pocas células encontradas a las 24 horas en el tratamiento con la proporción (1:2) de *Chattonella* fueron semejantes en cuanto al patrón de cambios y deformación de la células de *G. catenatum* observado en los tratamientos anteriores. Observaciones puntuales a mayor aumento (63x) en las únicas células visas encontradas. En las células dañadas se apreciaron núcleos prominentes con cromosomas visibles (Figs.11 y 12).

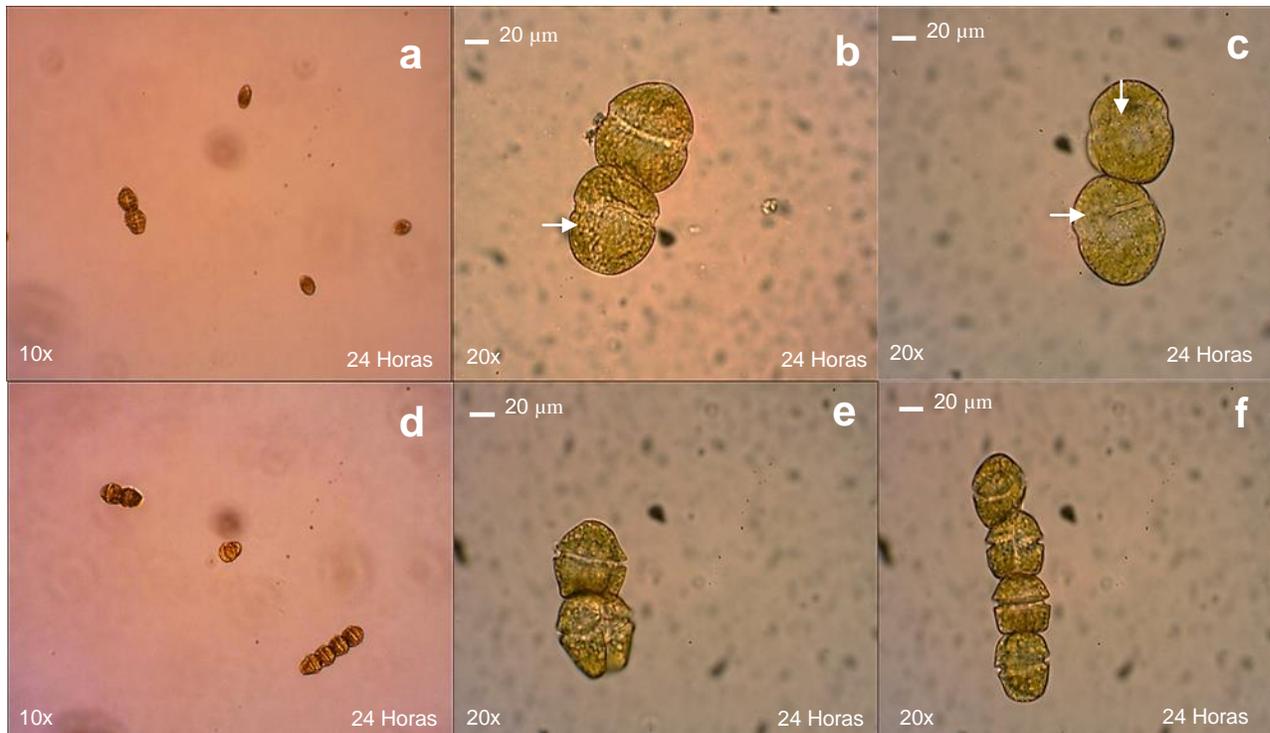


Figura 11. a) Células de *G. catenatum* en cultivos con contacto celular de *C. marina* var. *marina* 24 horas, b y c) cadenas de dos células (flechas) muestran pérdida de los flagelos, desarreglo de cíngulo y sulcus y núcleo prominente; (e y f) controles de *G. catenatum* con cambios morfológicos.

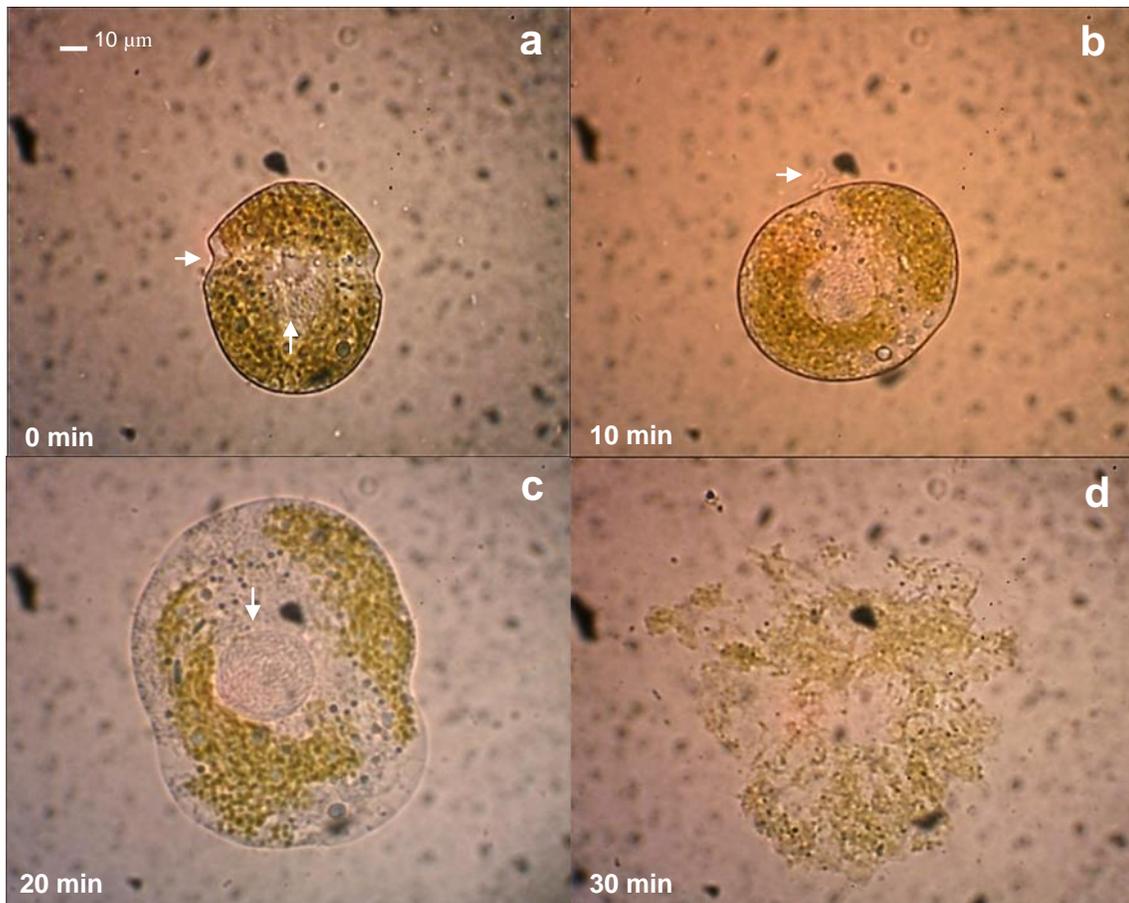


Figura 12. *G. catenatum* a diferentes tiempos de observación; a) desarreglo de la célula de *G. catenatum*; b) célula redondeada donde se pierde completamente la forma de la célula (flecha) pero aún se observa el flagelo cingular; c) se observan cromosomas condensados en el núcleo (flecha); d) lisis celular.

### 6.2.2 Porcentajes células individuales y cadenas de *G. catenatum*

Del número total de células contadas en el experimento con la proporción 1:1 de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*, 60, 20 y 10 % fue representado por células individuales mientras que 40, 80 y 88 % de la muestra fue integrado por células en cadena de 2, 3 y 4 células de longitud para las 24, 48 y 72 h respectivamente (Fig.13). Mientras que en los controles se observaron a las 48 h las células individuales representando el 20 %. A las 24 y 72 h las células individuales en los controles representaron entre el 42% y 46 %, respectivamente.

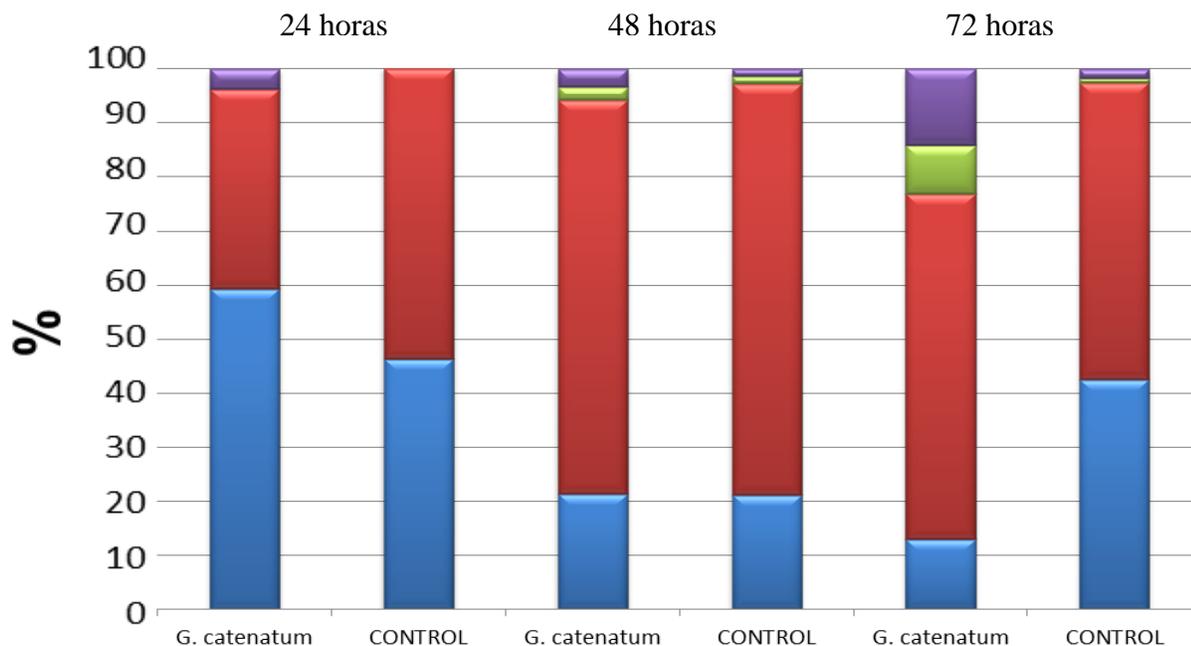


Figura 13. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 1:1. Tratamiento control, a 24, 48 y 72 horas de incubación. La barra azul representa el número de células individuales, barra roja cadenas formadas de dos células, barra verde cadenas de 3 células y barra morada cadenas de 4 células

Para las proporciones de interacción *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina* (proporción 2:1 y 1:2) solo se observan (Figs. 14 y 15) cadenas de 2 y 4 células 50-50% a las 24 h y 80-20% a las 48h, no se encontraron células individuales vivas. La abundancia total del 90 % de las células sobrevivientes de *G. catenatum* formaban cadenas de 2 y 4 células mientras que en los controles el 45% eran células individuales y el 55% de las células formaban cadenas de dos, tres a cuatro células de largo.

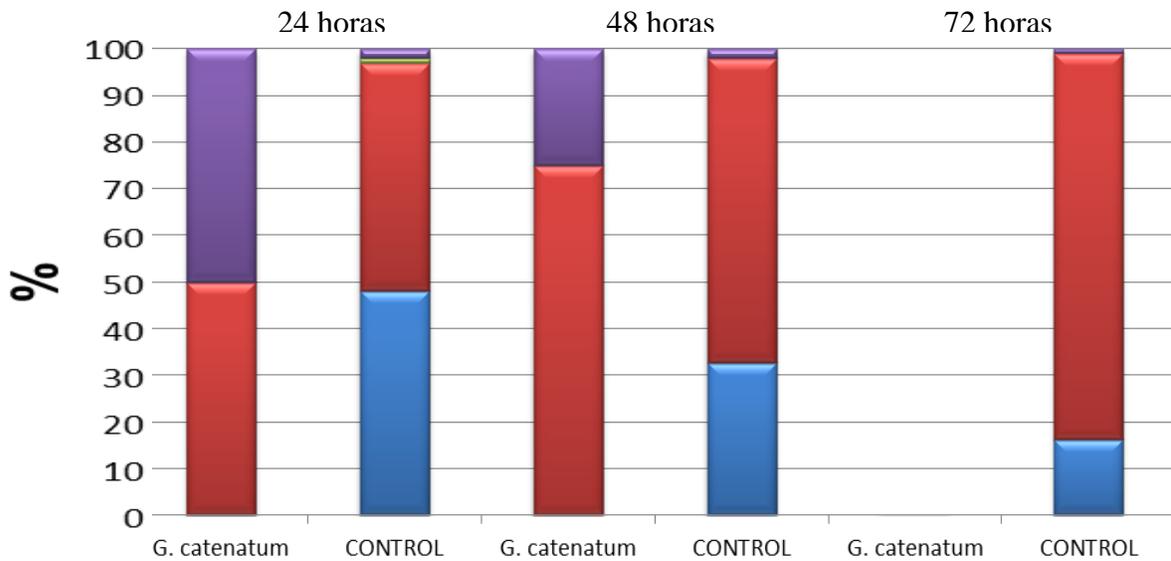


Figura 14. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 2:1. Tratamiento control, a 24, 48 y 72 horas de incubación. Barra azul representa el porcentaje de células individuales, la barra roja cadenas formadas por dos celula, la barra verde cadenas de 3 células y la barra morada cadenas de 4 células.

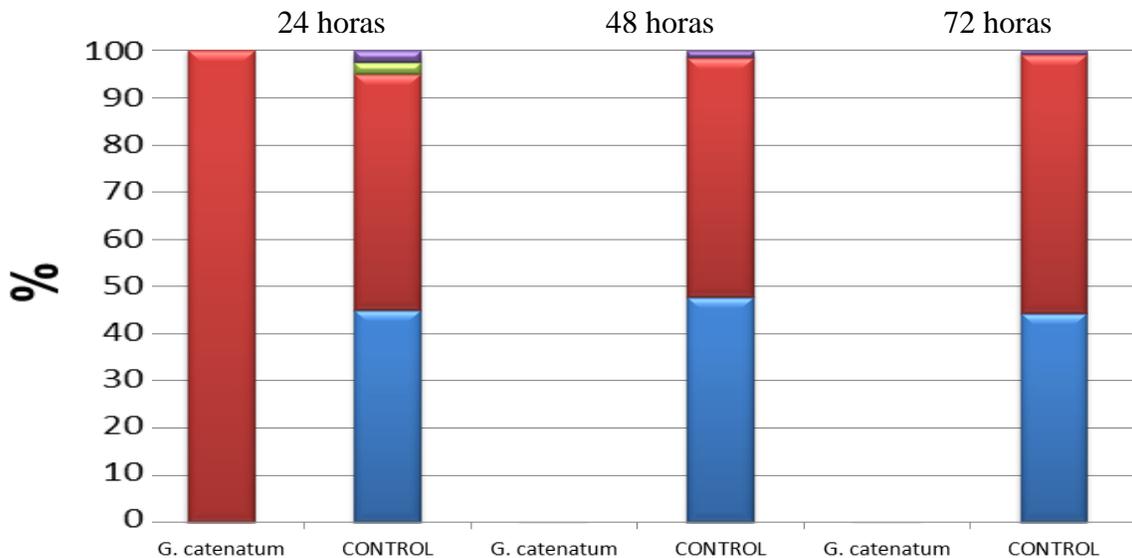


Figura 15. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 1:2. Tratamiento control, a 24, 48 y 72 horas de incubación. Barra azul representa el número de células individuales, la barra roja cadenas formadas por dos células, la barra verde cadenas de 3 células y la barra morada cadenas de 4 células.

### 6.3 Cultivos mixtos sin contacto celular

Para el caso de los cultivos mixtos sin contacto, con las densidades iniciales utilizando el mismo número de células ( $20 \times 10^3$  cél/mL) en proporción 1:1, no se observó una dominancia por ninguna de las dos especies, las densidades celulares de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*, al tiempo de las 12 y 24 horas fueron entre  $20$  y  $22 \times 10^3$  cél/mL mientras que a las 72 horas hubo una disminución en las células de *G. catenatum* a  $18 \times 10^3$  cél/mL por  $22 \times 10^3$  cél/mL de *Chattonella marina* var. *marina*, sin que esta disminución representara una diferencia significativa (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) entre sí ni con respecto a los controles (Fig. 16).

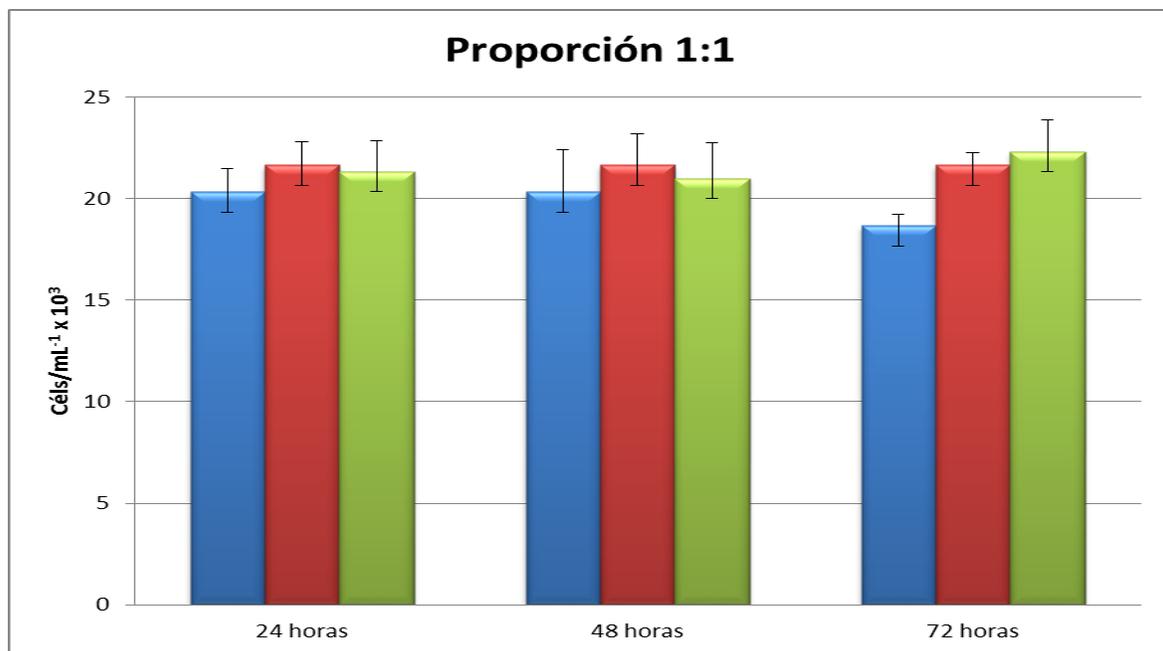


Figura 16. Densidades celulares en cultivos de interacción *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina* sin contacto celular. La barra azul representa la densidad celular de *G. catenatum*, la roja la densidad celular de *G. catenatum* en el tratamiento control y la barra verde representa la densidad de *C. marina* var. *marina* en cultivo sin contacto.

Un comportamiento similar ocurrió en el experimento donde las densidades celulares inoculadas de *G. catenatum* fueron el doble ( $20 \times 10^3$  cél/mL) de la concentración de *C. marina* var. *marina* ( $10 \times 10^3$  cél/mL) (Fig. 17), no se registraron diferencias significativas en la densidades celulares de ninguna de las dos especies entre los tratamientos, ni con los controles en los tiempos de observación de 12, 24 y 48 horas.

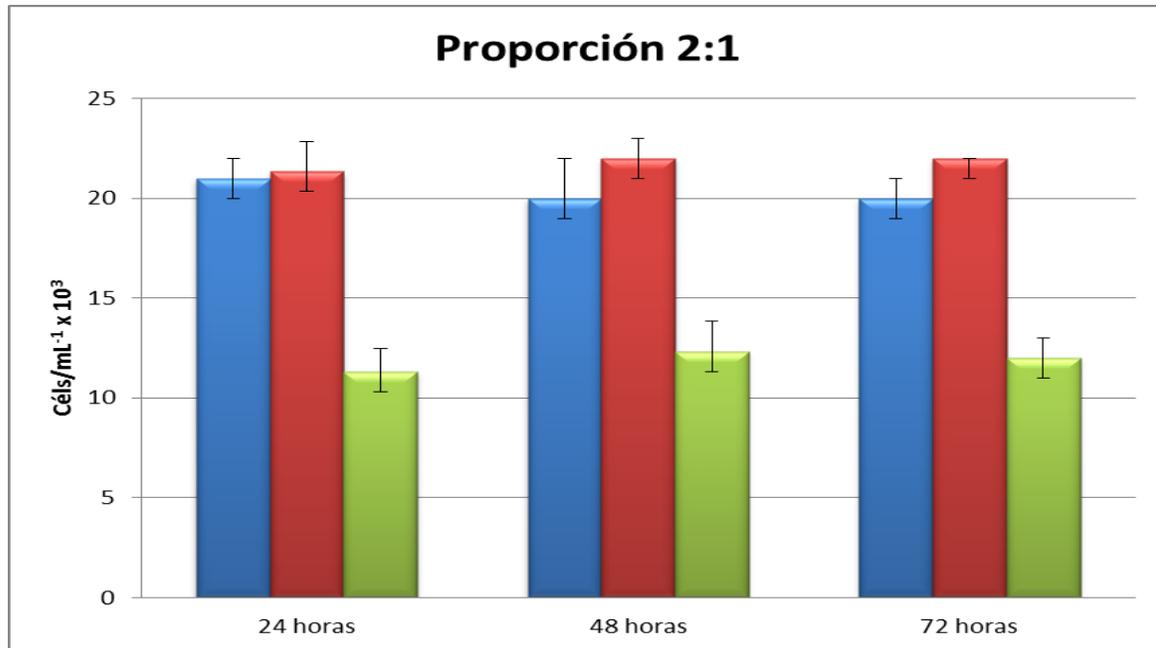


Figura 17. Densidades celulares en cultivos de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*, sin contacto celular (sin diferencias significativas, Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ), entre los tratamientos y el control. La barra azul representa la densidad celular de *G. catenatum*, la roja la densidad celular de *G. catenatum* en el tratamiento control y la barra verde representa la densidad de *C. marina* var. *marina* en cultivo sin contacto.

Para la proporción 1:2 se muestra en la figura 18, el crecimiento de *G. catenatum* (densidades iniciales  $10 \times 10^3$  cél/mL) en cultivos mixtos sin contacto fue inhibido por *C. marina* var. *marina* (densidad celular inicial  $20 \times 10^3$  cél/mL) después de 72 horas de exposición, reduciendo su abundancia celular a  $6 \times 10^3$  cél/mL, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

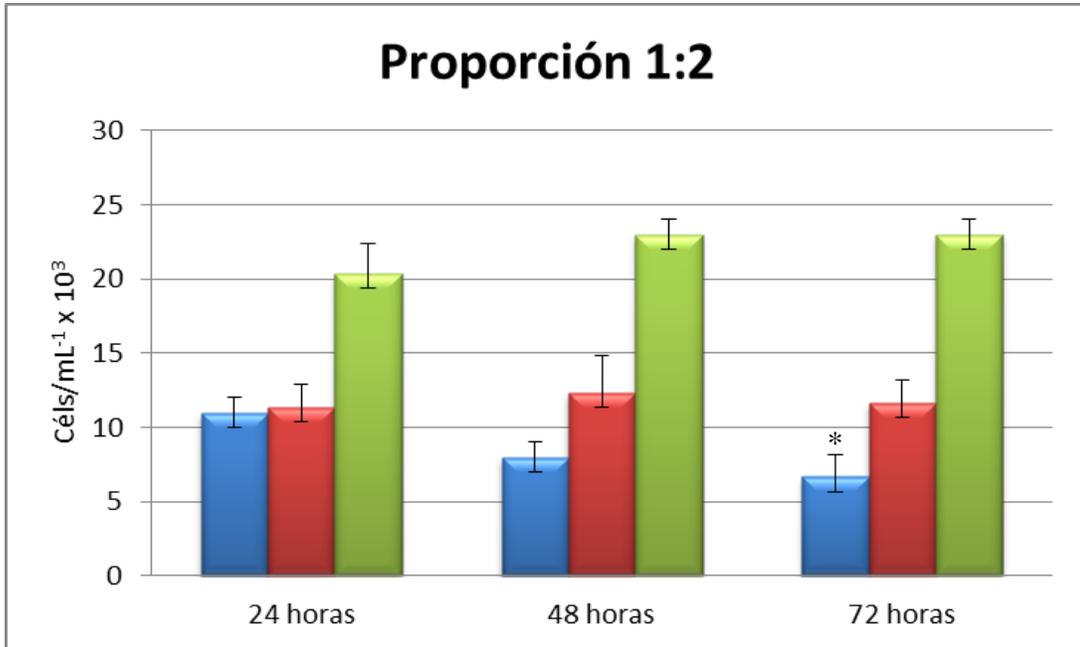


Figura 18. Densidades celulares en cultivos mixtos sin contacto interacción *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina*, ( \* ) La barra azul representa la densidad celular de *G. catenatum*, la roja la densidad celular de *G. catenatum* en el tratamiento control y la barra verde representa la densidad de *C. marina* var. *marina* en cultivo sin contacto.

### 6.3.1 Cambios celulares y morfológicos de *Gymnodinium catenatum* experimentos de competencia sin contacto celular con *Chattonella marina* var. *marina*

Los principales cambios celulares observados en *G. catenatum* en los experimentos sin contacto célula-célula, fueron desarreglos en el sulco y el cíngulo, ruptura de la membrana celular, formas trapezoides o aplanadas en células individuales, se presentaron también quistes temporales cubiertas por un membrana, así como desarreglos en el material citoplasmático disperso alrededor de núcleos prominentes (Fig. 19).

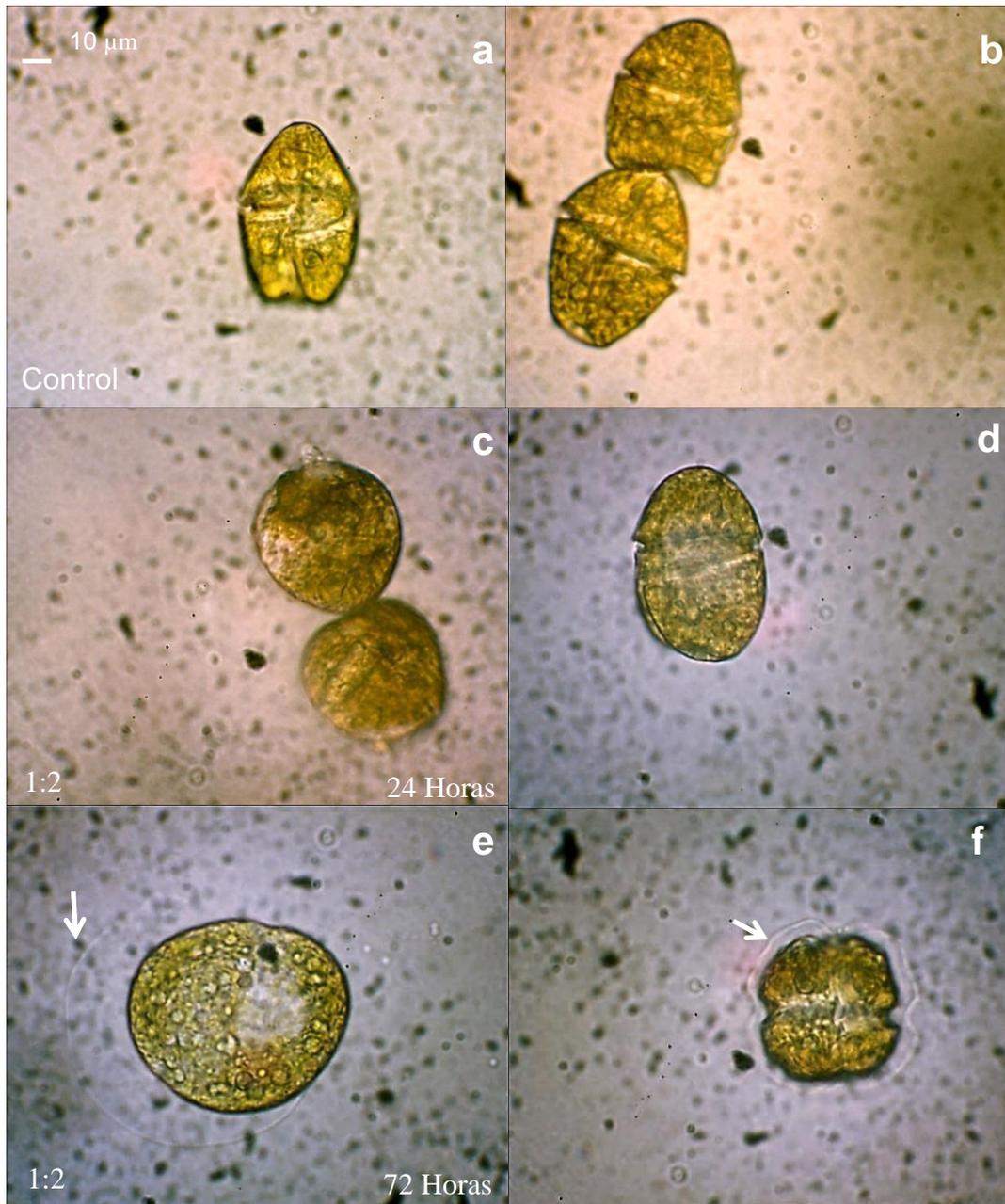


Figura 19. *Gymnodinium catenatum* morfología celular en cultivos sin contacto con *Chattonella marina* var. *marina*. (a) Forma típica de célula individual sin cambios a las 24 y 72 horas b) Control, forma típica de dos células en cadena. (c) Dos células en cadena con lisis en la membrana celular. (d) Célula individual redondeada con material nuclear evidente. (e-f) Células rodeadas por una membrana (flechas) característico de un quiste temporal.

### 6.3.2 Porcentaje de células individuales y en cadenas

Los tratamientos a diferentes proporciones de *G. catenatum* y *C. marina* var. *marina* (1:1, 2:1 y 1:2) en cultivos mixtos sin contacto, mostraron porcentajes similares en la longitud de células de *G. catenatum*.

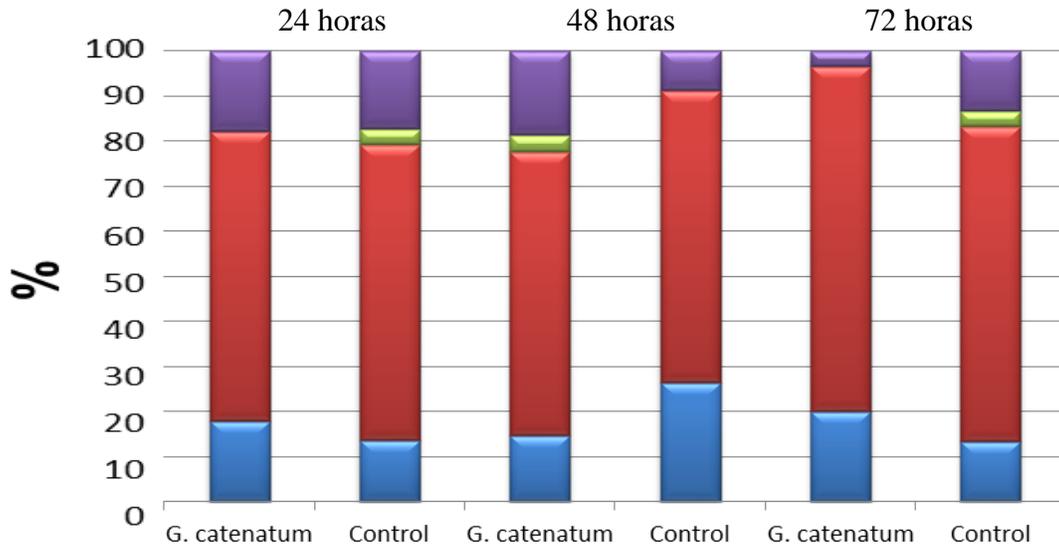


Figura 20. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 1:1. Tratamiento control, a 24, 48 y 72 horas de incubación. La barra azul representa el porcentaje de células individuales, la barra roja cadenas formadas por dos células, la barra verde cadenas de 3 células y la barra morada cadenas de 4 células.

En todos los casos hubo mayor porcentaje de cadenas de 2 células representado por el 60 y 70 % de la población; seguido por las células individuales 18 %, cadenas de 4 células 20 % y cadenas de 3 células 4 % (Figs. 20, 21 y 22).

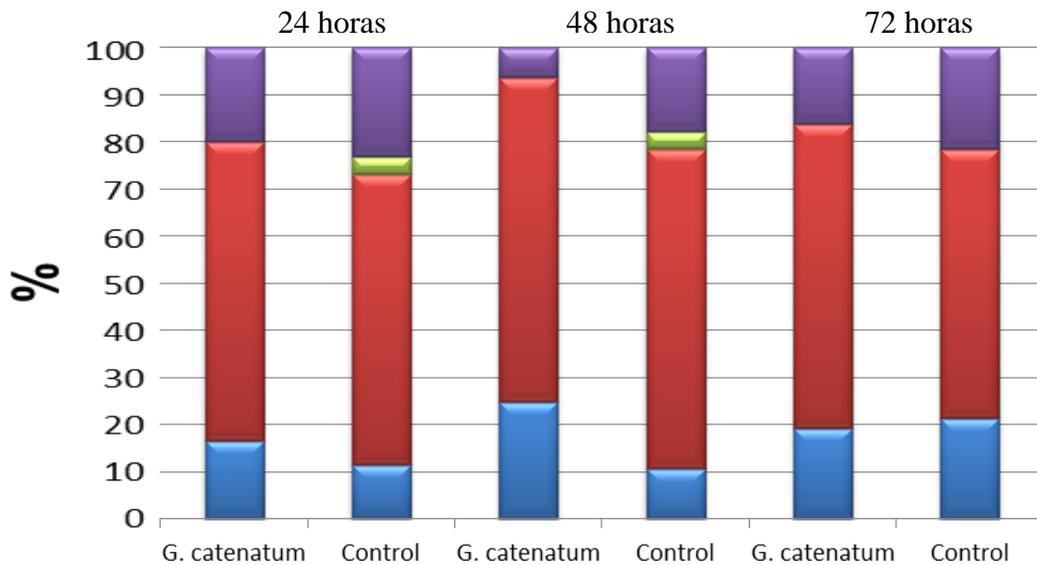


Figura 21. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 2:1. Tratamiento control, a 24, 48 y 72 horas de incubación. La barra azul representa el porcentaje de células individuales, la barra roja cadenas formadas por dos células, la barra verde cadenas de 3 células y la barra morada cadenas de 4 células.

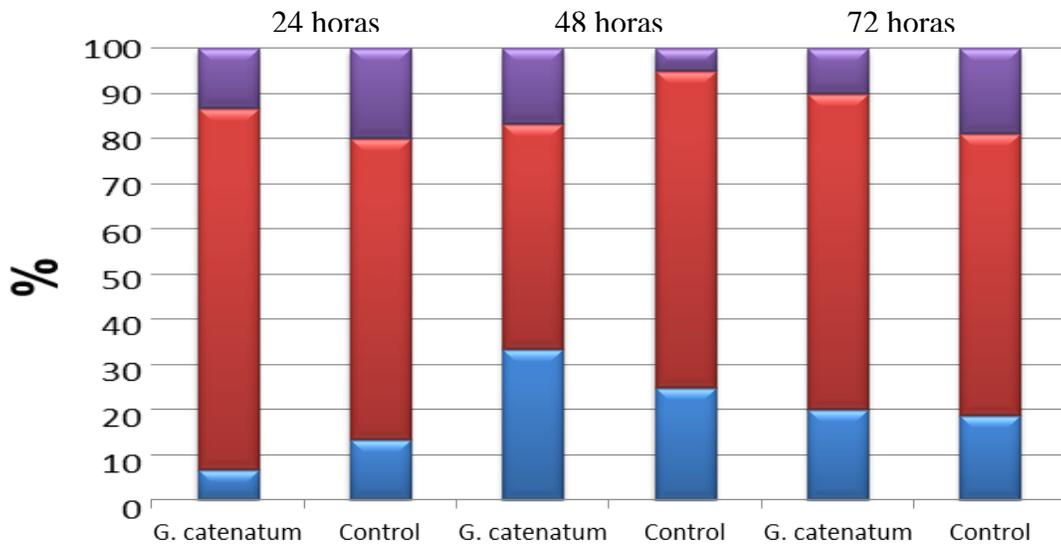


Figura 22. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto (Gc) a *C. marina* var. *marina* en cultivos sin contacto celular en una proporción 1:2. Tratamiento control (C), a 24, 48 y 72 horas de incubación. La barra azul representa el porcentaje de células individuales, la barra roja cadenas formadas por dos células, la barra verde cadenas de 3 células y la barra morada cadenas de 4 células.

## 6.4 Efecto alelopático por filtrados celulares

Las densidades celulares del tratamiento con los volúmenes filtrados celulares de *C. marina* var. *marina* utilizados fueron de 10, 20 y 50 mL en células de *G. catenatum* utilizando la proporción 1:1 ( $20 \times 10^3$  cél/mL) (Fig. 23). En este experimento no se encontraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) en ningún tiempo de observación, con los siguientes valores de abundancia celular para *G. catenatum* ( $20$ ,  $19$  y  $18 \times 10^3$  cél/mL) con un 95, 98 y 84 % de supervivencia, respectivamente (Fig. 23).

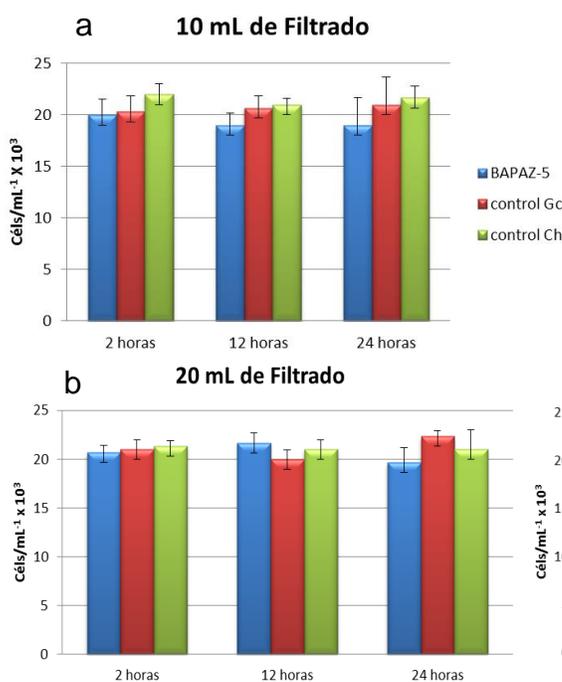


Tabla 1. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 1:1).

Tratamiento	% Mortalidad	% Supervivencia
10 mL	5 %	95 %
20 mL	2%	98 %
50 mL	16%	84 %

Figura 23. Abundancias celulares de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *Chattonella marina* var. *marina*. (proporción 1:1). Barra azul representa a *G. catenatum*, barra roja su tratamiento control y la barra verde representa a *C. marina* var. *marina*.

En los tratamientos con filtrados celulares con una concentración 2:1 y 1:2 de *G. catenatum* - *C. marina* var. *marina* con un volumen de 10 y 20 mL durante los tiempos de observación, no se encontró ninguna disminución o inhibición en el

crecimiento de las células de *G. catenatum*. Únicamente se registraron cambios en la densidad celular en el tratamiento con 50 mL hasta el tiempo máximo de observación de 24 horas, con una mortalidad máxima cerca del 50 % (Fig. 24 y 25).

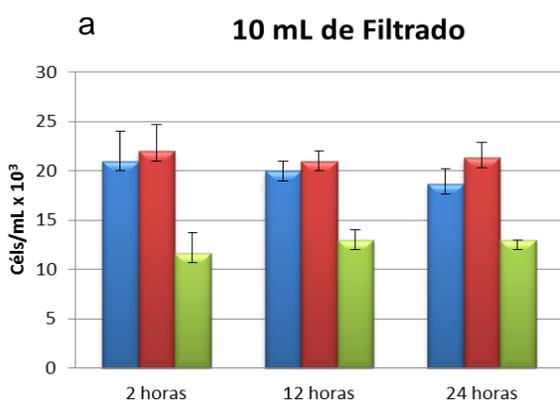


Tabla 2. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 2:1).

Tratamiento	% Mortalidad	% Supervivencia
10 mL	6 %	94 %
20 mL	18 %	82 %
50 mL	48 %	52 %

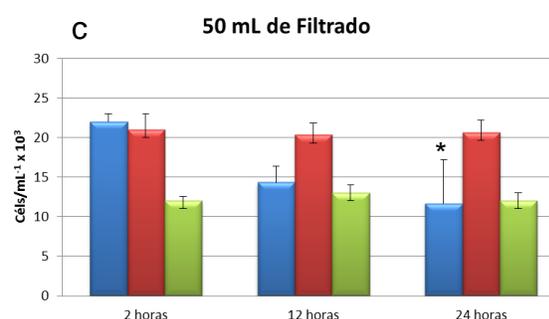
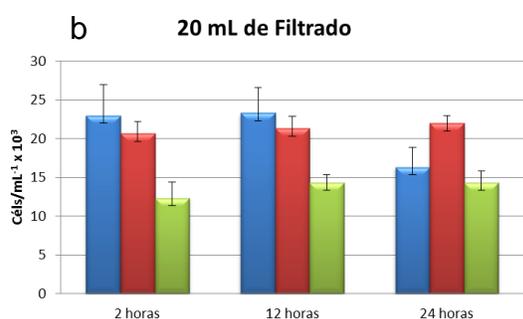


Figura 24. Abundancia de *G. catenatum* al exponerse a diferentes volúmenes de filtrados celulares de *C. marina* var. *marina*. a y b) sin diferencias significativas. c) Se muestra disminución del 48 % en la densidad celular de *G. catenatum* y ( \* ) muestra diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) comparando con los controles a las 24 horas de exposición, a 50 mL de volumen de filtrado celular de *C. marina* var. *marina* con  $10 \times 10^3$  Cél/mL. Barra azul representa a *G. catenatum*, barra roja su tratamiento control y la barra verde representa a *C. marina* var. *marina*.

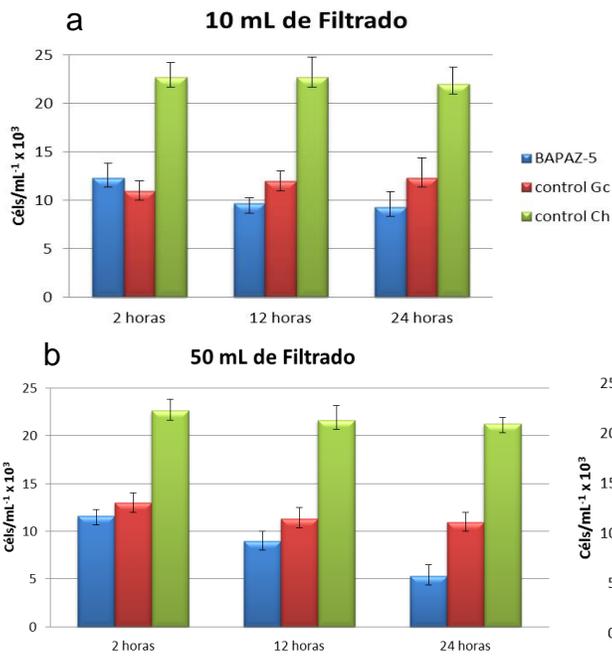


Tabla 3. Porcentaje de mortalidad y supervivencia *G. catenatum* a filtrados de *C. marina* var. *marina* (proporción 1:2).

Tratamiento	% Mortalidad	% Supervivencia
10 mL	6 %	94 %
20 mL	10 %	90 %
50 mL	47 %	53 %

Figura 25. Abundancia de *G. catenatum* al exponerse a diferentes volúmenes de filtrados celulares de *C. marina* var. *marina* a y b) sin diferencias significativas. c) muestra disminución del 47 % en la densidad celular de *G. catenatum* y ( \* ) muestra diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ) comparando con los controles a las 24 horas de exposición, a 50 mL de volumen de filtrado celular de *C. marina* var. *marina* con  $20 \times 10^3$  Cél/mL. Barra azul representa a *G. catenatum*, barra roja su tratamiento control y la barra verde representa a *C. marina* var. *marina*.

#### 6.4.1 Cambios celulares y observaciones morfológicas de *Gymnodinium catenatum* por exposición a filtrados celulares de *Chattonella marina* var. *marina*

En los experimentos de exposición a los filtrados celulares de *Chattonella*, se observó una mayor cantidad cambios en las células de *G. catenatum*, con un patrón similar a los antes descritos, sin que exista relación directa con el número de células de los filtrados de *C. marina* var. *marina* de un cultivo con una densidad de  $20 \times 10^3$  cél/mL en sus diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2) y el volumen inoculado, pero sí, con el tiempo de exposición 2, 12 y 24 horas. Aunque que para la proporción (1:1)

no se registró inhibición en el crecimiento de *G. catenatum*, en la evaluación morfológica, se logró evidenciar la presencia de un quiste temporal y deformaciones morfológicas similares a los descritos en los cultivos con y sin contacto celular (Fig. 26, 27 y 28).

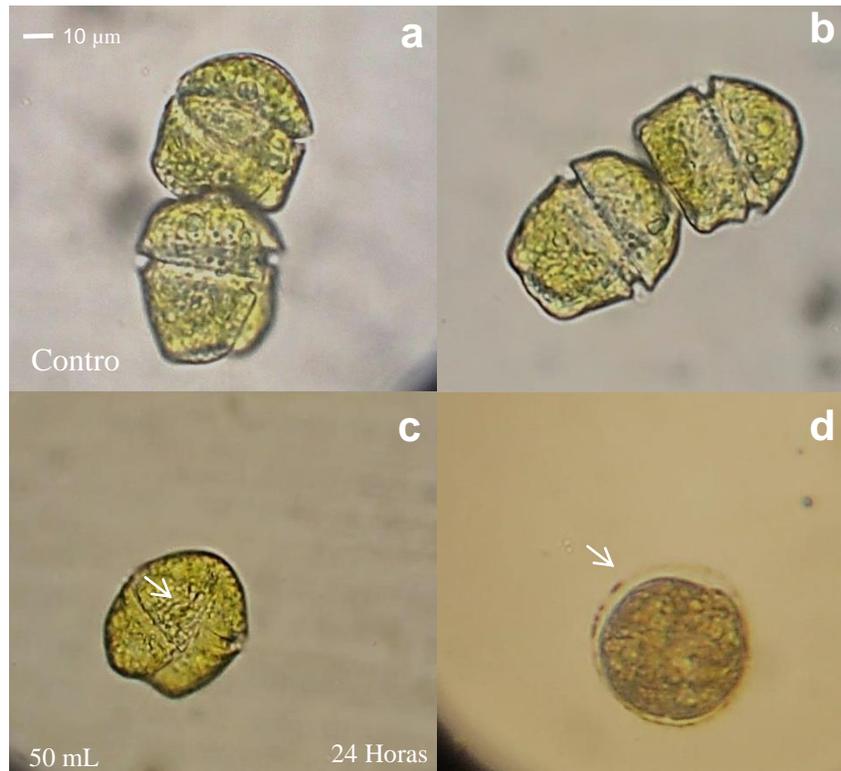


Figura 26. *Gymnodinium catenatum*; variación en morfología celular por exposición a filtrados celulares de *Chattonella marina* proporción 1:1 a y b) Control, forma típica de cadena de dos células. c) Célula individual sin cambio de forma, con núcleo evidente (flecha) d) Célula individual redondeada mostrando una membrana propia de un quiste temporal.

Durante el primer tiempo de observación (a las 2 horas) no se encontraron cambios de forma en las células de *G. catenatum* con ninguno de los volúmenes de filtrados 10, 20 y 50 mL utilizando la menor densidad de *Chattonella marina* var. *marina* ( $10^3$  cél/mL).

Después de 12 y 24 horas de exposición con 50 mL de filtrado se registraron cambios en la morfología de *G. catenatum*, i.e., ensanchamiento de la zona sulcal y diferentes desarreglos de la zona apical además de quistes temporales (Fig. 27).



Figura 27. *Gymnodinium catenatum* a y b) Control, típica forma de células individuales y en cadena. c) Dos células en cadena mostrando deformación del cíngulo y sulcus (flecha) d) Célula individual mostrando (flecha) una ligera depresión en el epicono e y f) Células individuales elongadas y con núcleo con cromosomas evidentes.

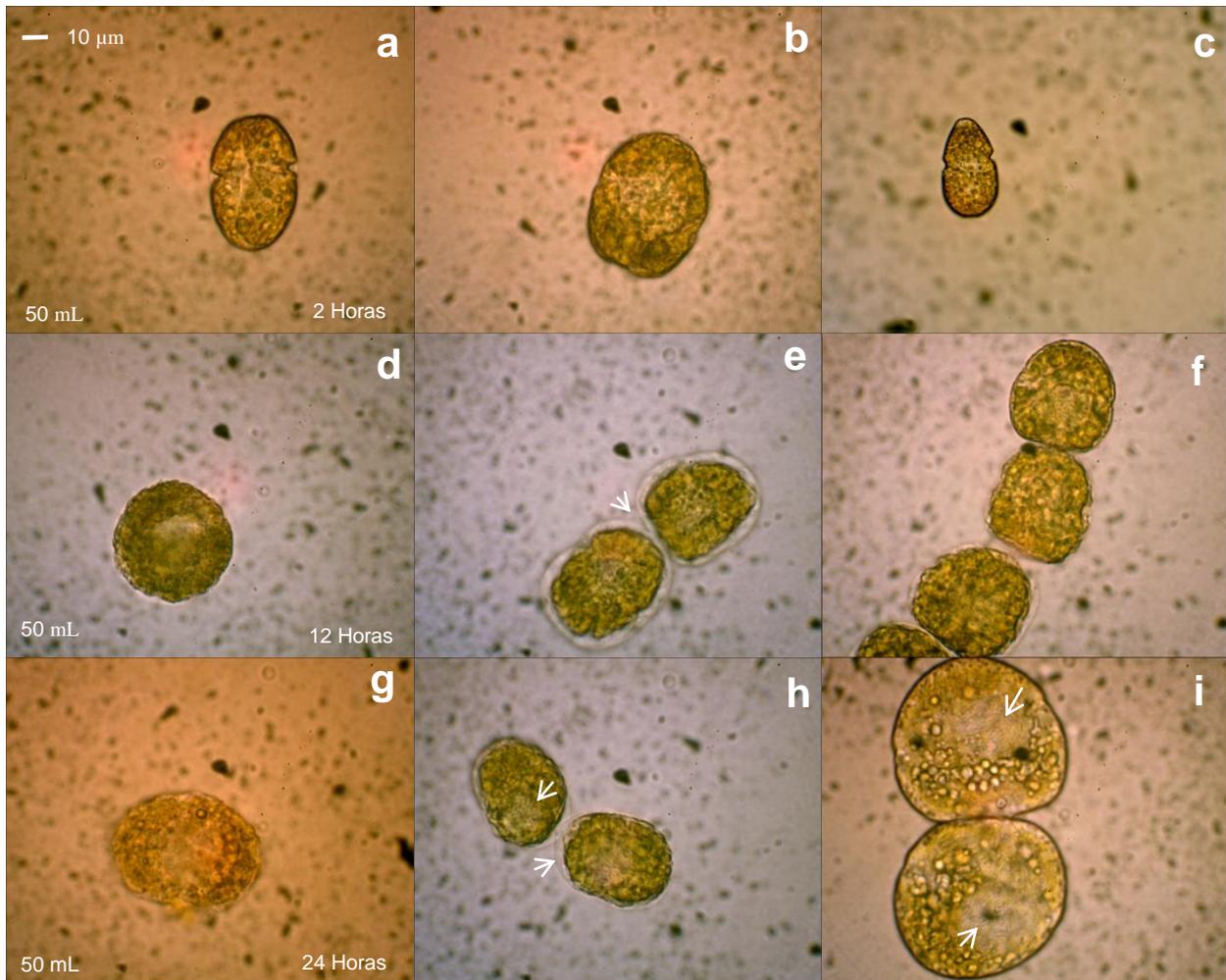


Figura 28. a, b y c) Diferentes morfologías de células individuales de *G. catenatum*. d) célula individual lisada, con material nuclear condensado en el centro. e) Cadenas de dos células protegidas por una membrana (flechas) similar a quiste temporal. f) Cadena de 4 células cada célula con forma diferente f-a) núcleo con cromosomas, f-b) célula lisada con membrana celular rota, f-c) quiste temporal. g) Célula con membrana celular rota. h) Dos células en cadena rodeadas por una membrana. i) Cadena de 2 células con núcleos similares a los presentes en estadios por reproducción sexual.

La mayor cantidad de cambios morfológicos (50% del número total de células encontradas de *G. catenatum*) fue provocado con 50 mL de filtrado celular de *Chattonella marina* var. *marina* con una densidad  $20 \times 10^3$  cél/mL.

#### 6.4.2 Formación de cadenas

En las células vivas de *G. catenatum* no hay una proporción clara; en cuanto al porcentaje del número de células individuales y las que forman cadenas. Para el tratamiento con la proporción (1:1), casi el 60 % fue representado por cadenas de 2 células, el 20 % por cadenas formadas por 4 células, 16 % por células individuales y el 4% por cadenas de 3 células.

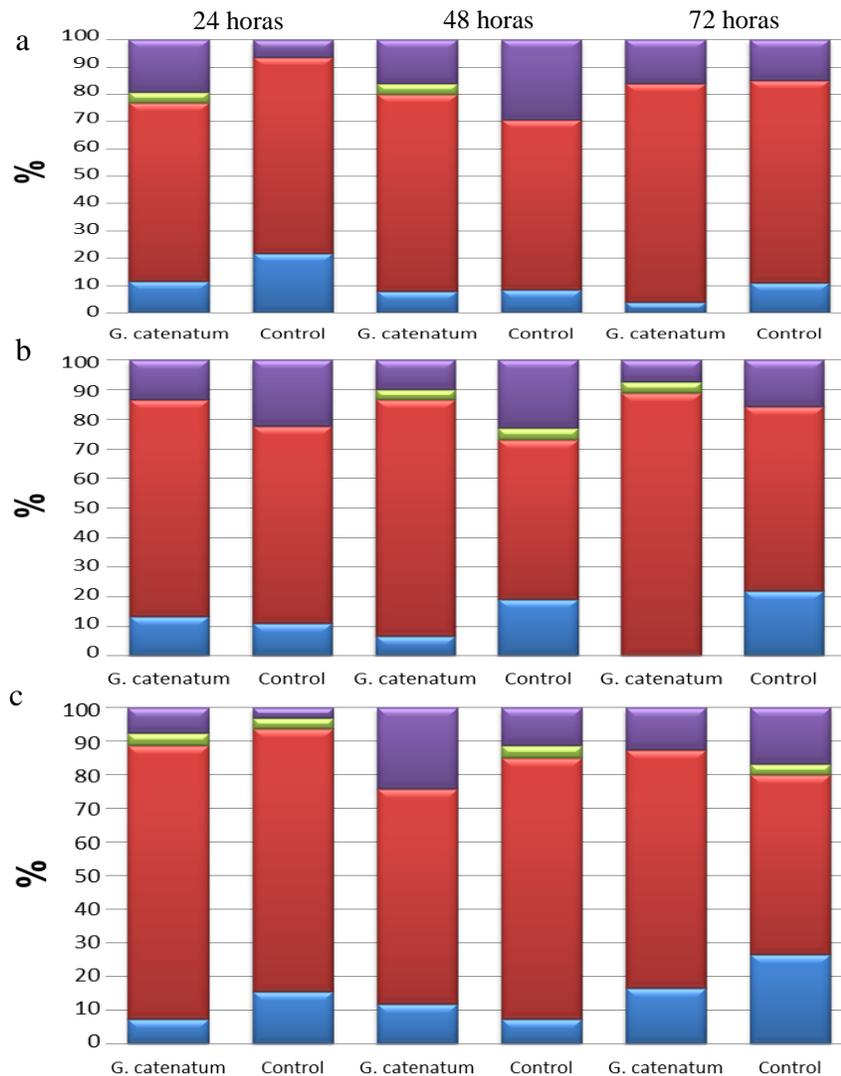


Figura 29. Porcentaje de células individuales y células en cadenas de *Gymnodinium catenatum* con a) 10, b) 20 y c) 50 mL de medio de cultivo filtrado de *C. marina* var. *marina*. Densidad celular de *C. marina* var. *marina*  $20 \times 10^3$  cél/mL.

En el experimento con filtrados con la proporción 2:1 (Fig. 30) se encontró que el 50 % de la población lo representaron células individuales, este es el número más alto reportado en cualquiera de los experimentos de alelopatía (co-cultivos con y sin contacto celular) en esta investigación; el 45 % fue integrado por cadenas de 2 células y el 5% restante por cadenas de 3 y 4 células, una proporción similar fue encontrada en el tratamiento control.

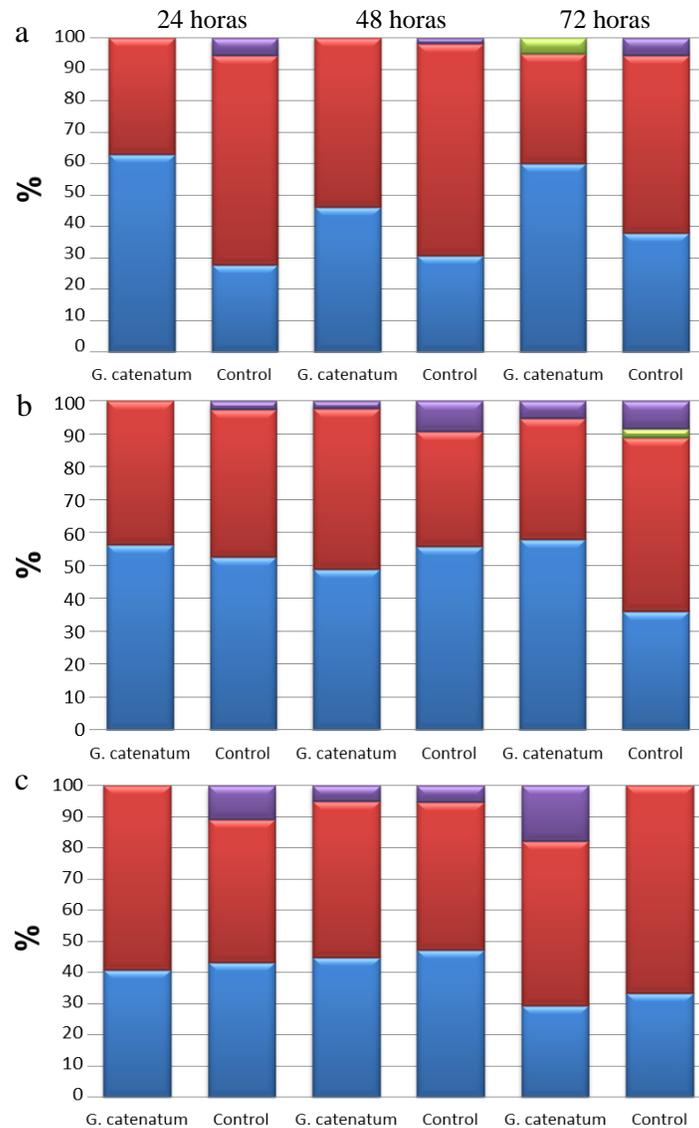


Figura 30. Porcentaje de células individuales y células en cadenas de *Gymnodinium catenatum* con; a) 10, b) 20 y c) 50 mL de medio de cultivo filtrado de *C. marina* var. *marina*. Densidad celular de *C. marina* var. *marina*  $10^3$  cél/mL.

El número de células en cadena en la proporción 1:2 con el medio de cultivo filtrados con una densidad celular de *C. marina* var. *marina*  $20 \times 10^3$  cél/mL, fue de 20% de células individuales, 60 % de cadenas de 2 células, 16% de cadenas de 4 células y 4% integrado por 3 cadenas formadas por 3 células.

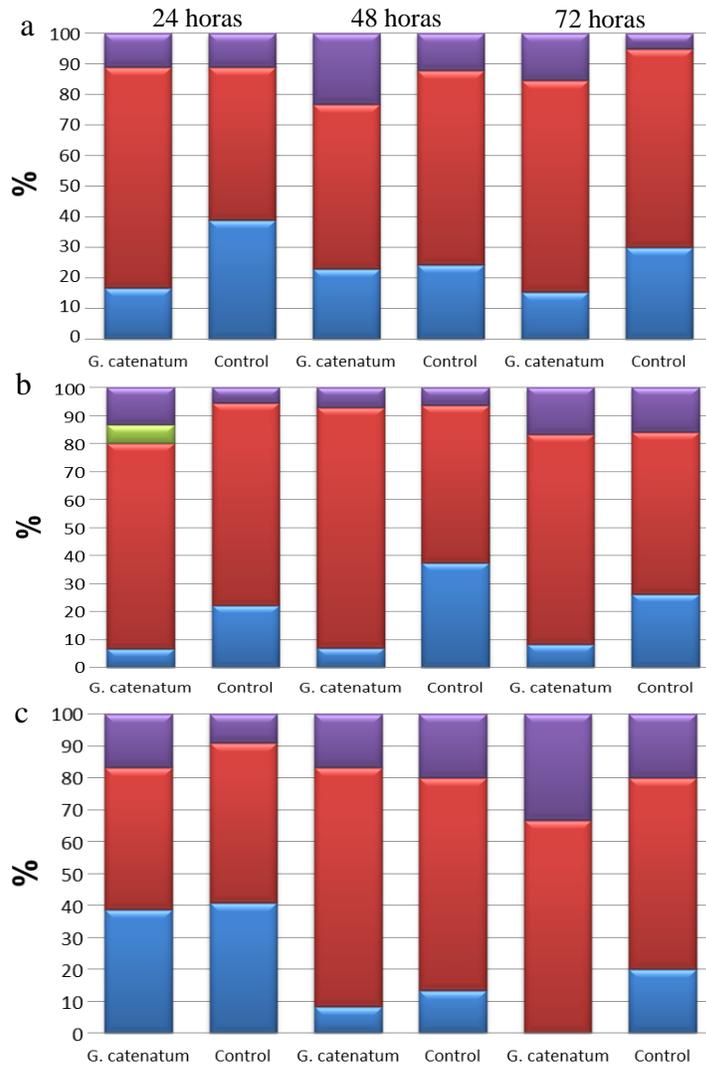


Figura 31. Porcentaje de células individuales y células en cadenas de *G. catenatum* con a) 10, b) 20 y c) 50 mL de medio de cultivo filtrado de *C. marina* var. *marina*. Densidad celular de *C. marina* var. *marina*  $20 \times 10^3$  cél/mL.

## 6.5 Actividad hemolítica

Ninguno de los tratamientos con filtrados de medio de cultivo de *C. marina* var. *marina* a densidades de  $20 \times 10^3$  cél/mL<sup>-1</sup> presentó actividad hemolítica. En el tratamiento control de medio GSe también de obtuvieron resultados negativos en la prueba (Tabla. 4).

Tabla 4. Actividad hemolítica de *C. marina* var. *marina* densidad celular  $20 \times 10^3$  cél/mL<sup>-1</sup>

Filtrado	Actividad hemolítica
F/Ch-1	--
F/Ch-2	--
F/Ch-3	--
GSe	--
GSe	--
GSe	--

F/Ch-1, 2 y 3 (filtrados de *C. marina* var. *marina*), GSe (filtrado medio cultivo) y (--) no detectado.

## 7. Discusión

Los experimentos realizados y los resultados encontrados en la inhibición y disminución del crecimiento de *G. catenatum* sugieren que existe un efecto de tipo alelopático de *C. marina* var. *marina*, excluyendo que las condiciones controladas durante la experimentación (salinidad, temperatura, luz, fotoperiodo, pH y el mismo medio de cultivo) influyen en nuestros resultados, similar a lo reportado. Los trabajos de Xu y colaboradores (2010) muestran también un efecto alelopático de *Skeletonema costatum* y *Heterosigma akasiwo*, similar aquí. Algunos estudios han evaluado la competencia en microalgas, competencia por nutrientes y producción de aleloquímicos (Fong *et al.*, 1993; Sfrigo *et al.*, 1994); como la principal interacción en microalgas marinas. Los resultados encontrados en esta investigación sugieren que las sustancias liberadas en el medio actúan solo como un regulador de la dominancia de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum*, ya que en los experimentos de interacción realizados, con y sin contacto celular y mediante filtrados celulares, existen diferencias marcadas en la abundancia de las células que sobreviven de *G. catenatum*.

La utilización de diversas proporciones celulares de *G. catenatum* con respecto a *C. marina* var. *marina* (1:1, 2:1 y 1:2) nos permiten determinar la intensidad y la rapidez de la inhibición de crecimiento en cultivos con contacto y sin contacto celular. Por ejemplo cuando compiten en una proporción de abundancia 1:1, al menos en el tiempo de experimentación, no se observa una dominancia marcada aunque al final del experimento existe una disminución en la abundancia del dinoflagelado, cuando la densidad celular de *G. catenatum* fue el doble que la de *C. marina* var. *marina* por contacto directo, *Chattonella* limitó totalmente su crecimiento a las 72 h, sin contacto célula - célula la disminución del crecimiento fue mínima siendo de 20 a 18 x 10<sup>3</sup> cél/mL. Con la mayor densidad de *C. marina* var. *marina* vs *G. catenatum* el efecto de inhibición se evidenció en el menor tiempo (a las 48 horas) alcanzando un 100% de mortalidad por contacto celular y 37% sin contacto.

Todos estos resultados sugieren un comportamiento similar con lo reportado para efectos alelopáticos (Cembella, 2003) con una relación dependiente entre la densidad inicial y la población en crecimiento en un cultivo bi-algal. Este fenómeno se manifiesta cuando la respuesta de una especie depende de la densidad de la otra (Maynard-Smith, 1974, Sato *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Por ejemplo Uchida *et al.* (1999) nota que la densidad inicial de dos especies de microalgas es crítica para determinar la interacción, en un cultivo bi-algal.

El efecto encontrado en la proporción (2:1) fue de una mortalidad de 100% de *G. catenatum* cuando la densidad celular inoculada de este fue el doble que la de *C. marina* var. *marina*. Quizá este efecto puede estar relacionado con la hipótesis de ecología química planteada por Cembella *et al.* (2003), quienes mencionan que ante un agente de competencia, otras microalgas o depredadores, provocan la activación y excreción de metabolitos al medio que actúan como una señal (Huntley *et al.*, 1986; Ives, 1987; Turrif *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1998), que ocasionan la producción de una mayor cantidad de metabolitos secundarios (John *et al.*, 2010).

El efecto alelopático de una especie sobre otra se hace más evidente al comparar principalmente dos métodos experimentales por contacto celular y cuando las especies son separadas por una barrera física. Yamasaki *et al.* (2011) ponen de manifiesto que cuando exponiendo al dinoflagelado *Hererothrix circulariscuama* con *Prorocentrum dentatum* en un mismo cultivo, este disminuyó en un 50% su densidad a las 5 horas de exposición, mientras que cuando las condiciones experimentales de incubación evitaban el contacto célula-célula; este efecto no se encontró, por lo que concluyen que la letalidad en la competencia de microalgas depende del contacto celular. Este resultado es similar a lo encontrado en nuestros experimentos (figs. 7 y 8); la letalidad de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum* es del 100% cuando existe contacto celular. *Chattonella marina* var. *marina*, presenta tricocistos y mucocistos que son liberados fácilmente en condiciones de estrés (Hallegraeff & Hara, 1995), los cuales podrían ser la causa de la letalidad del contacto celular, aunque no existe ningún registro para especies del género *Chattonella* donde se

mencione a estas estructuras como armas de defensa o ataque, pero en algunos euglenoides está documentada la proyección de tricocistos como forma de ataque y depredación. Dicha estructura también está reportada para dinoflagelados de los géneros *Alexandrium* y *Gonyaulax* (Bouck & Sweeney, 1966; Adoutte, 1988), aunque, difiere en forma y función de acuerdo a cada linaje (Yamagishi *et al.*, 2012). En este trabajo observaciones *in vivo*, microfotografías y evidencia filmica confirma el contacto directo de las especies en nuestros experimentos (ver más adelante).

En contraste, con los experimentos donde existía contacto celular, en los experimentos con filtrados directos de monocultivos de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum* el efecto alelopático se observó únicamente con el mayor volumen de cultivo (50 mL) y con el mayor número de células ( $20 \times 10^3$  mL). Gentin & Arzul, (1990) mencionan que la actividad alelopática de los filtrados liberados al medio depende de la fase de crecimiento de los cultivos y de la concentración celular de las microalgas. En este trabajo los cultivos fueron utilizados en la fase exponencial tardía (FE), durante la que se reporta para especies del género de *Chattonella* una mayor producción de metabolitos secundarios y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Marshall *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2012), esto a densidades celulares  $<1,000$  cél/mL. Nuestras densidades celulares de prueba fueron mayores a 20,000 cél/mL; quizá el efecto encontrado se deba más al tiempo de residencia de las metabolitos en el medio de cultivo, es decir que una baja concentración esté presente en la dosis del tratamiento o que la o las sustancias alelopáticas, se degraden durante el ensayo. Algo similar fue observado por (Arzul *et al.*, 1999) donde los filtrados celulares de las especies, *Alexandrium catenella*, *A. minutum* y *A. tamarense* provocan la inhibición del crecimiento de *Chaetoceros gracile* a los 5 días de exposición, pero después de 10 días el cultivo se recuperó. Otra hipótesis similar que sustenta nuestros resultados, es que en el ambiente natural las especies de fitoplancton están constantemente expuestas a los químicos de otras especies, pero en condiciones de cultivos están expuestos a un tipo de filtrado celular así, el efecto se va perdiendo a causa de la luz debido a la foto-sensibilidad de las sustancias o al metabolismo de las bacterias lo cual provoca que las especies objetivo logren

recuperarse (Windust *et al.*, 1977; Gleason & Paulson, 1984). Aunque la tendencia en nuestros resultados apunta hacia la misma relación densidad celular, volumen de filtrado y que también tienen cierta carga bacteriana, la única diferencia de los trabajos anteriores es que nuestro tiempo de exposición fue más corto (2 días menos) y el resultado importante es que en nuestro caso los cultivos de *G. catenatum* nunca recuperaron las densidades iniciales inoculadas después de 5 días de concluidos los tiempo de experimentación, ya que al final todas la células murieron por lo que se asume que existen un efecto alelopático.

Las defensa ante cualquier ataque o situación desfavorable depende de las forma de las microalgas (espinas y proyecciones) así como de sus estrategias ontogénicas (palatabilidad, agregación o formación de colonias) (Van Donk, 1999; Wolfe, 2000). Una de las adaptaciones comunes, en algunos dinoflagelados es la formación de cadenas, por ejemplo en *Gymnodinium catenatum*, es una estrategia reconocida que le confiere una mayor rapidez de natación ayudándole a realizar migraciones verticales para una mejor captación de luz y aprovechamiento de nutrientes (Smayda, 2002), asimismo se observa cierta relación en la longitud de las cadenas con el perfil de toxinas paralizantes (Band-Schmidt *et al.*, 2006). Observaciones puntuales registradas del número de células en cadena encontradas, muestran que la mayoría eran cadenas formadas de dos a cuatro células; este patrón fue evidente en los tratamientos donde el efecto alelopático fue más intenso en cultivos con contacto celular, antes de la mortalidad total. Es decir, las células individuales fueron las primeras en morir, aunque una hipótesis apuntaría a que células en cadena al tener una mayor superficie de contacto, serán más susceptibles al efecto por contacto directo, a menos que realmente exista un reconocimiento puntual de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum* y la velocidad de movimiento permita que las células en cadena logren sobrevivir por mayor tiempo. También hemos observado que estas características en la longitud de las cadenas es muy peculiar en diferentes cepas de *G. catenatum* aisladas de Bahía de La Paz. La cepa utilizada en los experimentos BAPAZ-5, muestra casi siempre una proporción de 40% de células individuales y el 40 % células formando cadenas de 4 células y 20% por cadenas de

3 células, pero nunca se observan cadenas de mayor longitud bajo las condiciones de cultivo empleadas.

La formación de quistes es una estrategia de *G. catenatum* ante condiciones desfavorables es la formación de quistes. Esta estrategia es fundamental en la dinámica de sus eventos de proliferación, así como también una parte fundamental dentro de su ciclo de vida (Bravo & Anderson, 1994); esto le provee muchas ventajas que facilitan su dispersión actuando como un inóculo natural para la iniciación de una proliferación, además de coadyuvar en la recombinación genética (Wall, 1971). La capacidad de producir quistes como respuesta a la presencia de otras especies ya ha sido reportada, por ejemplo en el dinoflagelado *Heterocapsa circularisquama* la formación de quistes se presenta cuando coexiste con el dinoflagelado *Karenia brevis* y las diatomeas *Chetoceros didymus*, *Stephanopixis palmeriana* y *Limophora* sp. aunque los quistes temporales recuperaron la movilidad después de 10 días al ser aislados y cultivados en medio de cultivo nuevo (Uchida *et al.*, 1996; 1999). Fistarol *et al.*, (2004) reportan por primera vez la producción de quistes en respuesta a un efecto alelopático causados por filtrados celulares de *A. tamarense* aplicado a un cultivo de *S. trochoidea*. En esta investigación en ninguno de los tratamientos y pruebas de alelopática los quistes fueron viables o se reincorporaron en células vegetativas prolongando el tiempo de observación hasta 5 días después del periodo de exposición; cabe mencionar que los quistes no fueron aislados e inoculados en nuevo medio de cultivo como los trabajos de Uchida *et al.* (1996; 1999).

En este trabajo se encontraron diferentes formas de quistes temporales y desarreglos morfológicos en *G. catenatum* de acuerdo con los supuestos anteriormente citados (Uchida *et al.*, 1996; 1999); el demostrar que el efecto alelopático de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum* induce la formación de quistes podría representar no solo un factor que afecta directamente la presencia de células móviles durante el inicio de una proliferación, sino que además podría ser un mediador de la presencia o exclusión de las futuras generaciones en el ambiente natural.

Aunque los dinoflagelados pueden formar principalmente dos tipos de quistes (1) quiste de resistencia (hipnocigotos) formado por reproducción sexual; y quiste temporal (pelicicle) a partir de células móviles cubiertos por una delgada membrana. (Bravo, 1986; Anderson, 1987). En este trabajo no se encontraron quistes de resistencia o reticulados, todas las formas quísticas corresponden a quistes temporales. En 1989 Blackburn indujo la formación de quistes combinando cultivos monoalgales, Figueroa (2006; 2008) demostró de que *G. catenatum* presenta varias vías para la formación de quistes y que este no siempre sigue las mismas rutas para el enquistamiento durante las diferentes etapas en su ciclo de vida, en los trabajos antes mencionados la producción de quistes en *G. catenatum* se logró en condiciones de estrés ambiental, en medios de cultivo con diferentes proporciones de nutrientes, deficiencia de nitratos y de fosfatos, nunca se ha reportado la inducción de quistes temporales en esta especie por efectos de alelopatía. Por lo tanto este es el primer reporte sobre la inducción de quistes en *G. catenatum* por sustancias alelopáticas de una rafidoficea.

El diseño experimental de mis experimentos permiten descartar que los cambios morfológicos y los procesos que indujeron la formación de quistes temporales no fueron provocados por las proporciones de nutrientes, temperatura, salinidad y fotoperiodo ya que estos siempre fueron iguales en los tratamientos y controles. El único agente de estrés fue la presencia de *C. marina* var. *marina* en diferentes densidades celulares o los filtrados celulares del medio de cultivo. Un resultado interesante en este trabajo es que observamos formas celulares similares a quistes formados por división del planocigoto o planomeiocito semejantes como los que reportaron Figueroa *et al.*, (2006; 2008). Claramente las células en mis experimentos (Figs. 11 (b y c y 12 a, b y c) muestran la pérdida de los flagelos, desarreglo del citoplasma, tienen el tamaño y la forma similares a células en división, además de un núcleo evidente. Estas características celulares solo se han observado después de fusión de gametos (Figueroa *et al.*, 2008).

Las formas celulares durante el enquistamiento no corresponden a los tiempos en que normalmente se reportan el primer estadio de un quiste planocigoto que se reportan en un promedio de 72 horas (Figueroa *et al.*, 2008) esta forma la encontré a las 24 horas de exposición a filtrados celulares de *C. marina* var. *marina* (figuras 25, 26 y 27), tanto en células individuales como en cadenas. Un rasgo muy evidente del planocigoto es el tamaño del núcleo, esto se ha observado claramente en algunos dinoflagelados en una etapa durante la meiosis, continuando con la cariogamia y posteriormente la plasmogamia (Coast *et al.*, 1984). En este trabajo igual que en el de Figueroa y colaboradores (2008) sólo se observó un solo núcleo en todas las células de *G. catenatum* otra característica es la ausencia de células biflageladas, característica distintiva de este tipo de quistes temporales.

Por los daños citológicos y las observaciones de las células lisadas asumimos que el efecto alelopático provocado por *C. marina* var. *marina* al afectar la membrana celular, haciéndola más permeable y deformándola, era provocado por hemolisinas. Debido a que estos metabolitos secundarios han sido señalados como responsables de efectos tóxicos, entre ellos la alelopatía en especies formadoras de proliferaciones (Yang *et al.*, 2001). Kuroda *et al.* (2005) encuentran diferencias en la actividad hemolítica en diferentes extractos de *C. marina*, Zhang *et al.*, (2008) reportan que la toxicidad hemolítica de *C. marina* corresponde a cuatro componentes, un lípido y tres fracciones glicolípídicas. Por otro lado Fu *et al.* (2004) encontraron que la mayor cantidad de toxinas hemolíticas en las microalgas consiste en ácidos grasos poliinsaturados. La cepa que utilizamos presenta estos últimos ácidos grasos (Band-Schmidt *et al.*, 2012). Durante la prueba de hemólisis realizada no encontramos actividad o evidencia de que las toxinas hemolíticas son liberadas en el medio de cultivo. Esto podría explicarse considerando que los extractos que utilice eran obtenidos de cultivos monoalgales y de que tal vez las hemolisinas solo son liberadas cuando *C. marina* var. *marina* reconoce la presencia de *G. catenatum* o de otros metabolitos secundarios producidos por el dinoflagelado. Esto también ayudaría a que pudieran explicar la expresión de las formas de *G. catenatum* similares a estadios de reproducción o nuevas etapas en su ciclo de vida. Por

ejemplo los alcaloides que causan daños en la estructura del ADN y ARN (Wink & Twardowski, 1992).

## 8. Conclusiones

Este trabajo muestra por primera vez que existe un efecto alelopático de *C. marina* var. *marina* sobre *G. catenatum* en cultivos y que este efecto puede ocurrir con y sin contacto celular, que provoca la una disminución de la densidad celular e inhibición de su crecimiento. El porcentaje de mortalidad es mayor cuando existe contacto celular de *C. marina* var. *marina* con *G. catenatum*, teniendo un mortalidad de hasta el 100% mientras que sin contacto celular los efectos son notables después de 3 días. También nuestros resultados apuntan a que las células individuales de *G. catenatum* son más vulnerables al efecto alelopático de *C. marina* var. *marina*. El daño citológico provocado por *C. marina* var. *marina* en *G. catenatum* son principalmente deformaciones de las zonas del cíngulo y el sulcus, pérdida de la movilidad, elongaciones del material citoplasmático, ruptura de la membrana celular, núcleos prominentes y lisis celular. Los exudados celulares con el mayor número de células de *C. marina* var. *marina* muestran un efecto alelopático sobre *G. catenatum* lo que implica probablemente que hubo una mayor cantidad de aleloquímicos exudados. *Chattonella marina* var. *marina* promueve el inicio de la formación de quistes temporales similares a los reportados en la literatura ante condiciones ambientales desfavorables, sin embargo no culminan su desarrollo. Las pruebas preliminares demostraron que *Chattonella marina* var. *marina* no libera toxinas hemolíticas al medio en cultivo monoalgal aunque en la literatura se reporta su producción. La alelopatía puede representar un agente promotor de la duración y la presencia de especies (*C. marina* var. *marina* durante una proliferación o inclusive ser el agente causal del desplazo de algunas microalgas de sus zonas de distribución (*G. catenatum*).

## 9. Bibliografía

Adoutte, A. 1988. Exocytosis: Biogenesis, Transport and Secretion of Trichocysts. *Paramecium* pp.325-362

Anderson, D.M. & Garrison O.J. 1997. The ecology and oceanography of harmful algal blooms. *Limnology Oceanogr.* 42:1009- 1035.

Arzul, G., Seguel, M., Guzman, L. & Erard-Le Denn. 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232 (1999) 285-295.

Bais, H. P., Prithiviraj, B., Jha, A. K., Ausubel, F. M. & Vivanco, J. M. 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature.* 434, 217-221.

Band-Schmidt, C.J., A. Martínez-López, & I. Gárate-Lizárraga. 2005. First record of *Chattonella marina* in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News.* 28: 6-7.

Band-Schmidt, C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E.J. Nuñez-Vázquez & F.E. Hernández-Sandoval. 2010. Ecological and Physiological Studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A Review. *Mar Drugs* 8: 1935-1961.

Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J., Morquecho, L., Gárate-Lizárraga, I., Alonso-Rodríguez, R., Reyes-Salinas, A., Erler, K. & Luckas, B. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *J. Phycol.* 42, 757–768.

Barraza-Guardado, R., R. Cortés-Altamirano & A. Sierra-Beltrán. 2004. Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Ch. cf. ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News* 25: 7-8.

Blackburn, S. I., Hallegraeff, G.M. & Bolch, C.J. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania. *Aust. J. Phycol.* 25, 577–590.

Bouck, G. B. & Sweeney, B. M. 1996. The fine structure and ontogeny of trichocysts in marine dinoflagellates. *Protoplasma*. 61 205-223

Bravo, I., 1986. Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Invest. Pesq.* 50, 313–321.

Bravo, I. & Anderson, D.M., 1994. The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. *J. Plankton Res.* 16, 513–525.

Bravo-Sierra, E. 2004. Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Suppl 1): 5-16.

C. J. Band-Schmidt, C.J., Martínez-López, A., Bustillos-Guzmán, J.J., Carreón-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N.O., Zenteno-Savín, T., Mendoza-Flores, A., B. González-Acosta, B., Hernández-Sandoval, F.E. & Tomas, C. 2012. Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia*. 683: 81-97

Cembella, A. D. 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*. 42 (4), 420-447

Coats, D.W., Tyler, M.A. & Anderson, D.M. 1984. Sexual processes in the life cycle of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): a morphogenetic overview. *J Phycol* 20(3): 351-361.

Cortés-Altamirano R., R. Alonso-Rodríguez, & A. Sierra-Beltrán. 2006. Fish mortality associated with *Chattonella marina* and *C. cf. ovata* (Raphidophyceae) blooms in Sinaloa (Mexico). *Harmful Algae News*. 31: 7-8.16

Czaran, T. L., Hoekstra, R. F. & Pagie, L. 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.* 99, 786–790.

Donaghay, P.L. & Osborn, T.R. 1997. Toward a theory of biological-physical control of harmful algal bloom dynamics and impacts. *Limnol Oceanogr* 42:1283–1296

Figueredo, C. C., Giani, A. & Bird, D.F. 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *J. Phycol.* 43, 256–265.

Figueroa, R.I., Bravo, I., Garces, E. & Ramilo, I., 2006. Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *J. Phycol.* 42,67–77.

Figueroa, R.I., Bravo, I., Ramilo, I., Pazos, Y. & Moroño, A. 2008. New life cycle stages of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): Laboratory and field observations. *Aquat. Microb. Ecol.* 52, 13–23.

Fistarol, G. O., Legrand, C. & Granéli, E. 2003 Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255, 115–125.

Fistarol, G. O., Legrand, C., Rengefors, K. & Granéli, E. 2004a. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environ. Microbiol.* 6, 791–798.

Fistarol, G. O., Legrand, C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W. & Granéli, E. 2004b. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 35, 45–56.

Fong, P., Donohoe, R. M. & Zedler, J. B. 1993. Competition with macroalgae and benthic cyanobacterial mats limits phytoplankton abundance in experimental microcosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 100: 97-102.

Franks, P.J.S. 1997. Models of harmful algal blooms. *Limnol Oceanogr* 42:1273 - 1282

Fu, M., Koulman, A., van Rijssel, M., Lützen, A., de Boer, M. K., Tyl, M.R. & Liebezeit, G. 2004. Chemical characterization of three hemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Toxicon*, 43: 355-363.

Gárate-Lizárraga, I. & M. S. Muñetón-Gómez. 2008. Bloom of *Peridinium quinquecorne* Abé in La Ensenada de La Paz, Gulf of California (July 2003). *Acta Botanica Mexicana* 83: 33-47.

Gárate-Lizárraga, I., C.J. Band-Schmidt, F. Aguirre-Bahena, & T. Grayeb del Alamo. 2009b. A multi-species microalgae bloom in Bahía de La Paz, Gulf of California, Mexico (June 2008). *CICIMAR Océánides*, 24 (1):15-29.

Gárate-Lizárraga, I., J. A. Díaz-Ortiz, B. Pérez-Cruz, M.A. Alarcón-Romero, L.A. Chávez-Almazán, J.L. García-Barbosa & S. López-Silva. 2011. A multi-species dinoflagellate bloom and shellfish toxicity in Costa Grande, Guerrero, Mexico (December, 2010). *CICIMAR Océánides*, 26 (1): 67-71.

Gárate-Lizárraga, I., J. J. Bustillos-Guzmán, R. Alonso-Rodríguez, & B. Luckas. 2004b. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Mar Pollut Bul* 48(3, 4): 397-402.

Gentien, P. & Arzul, G. 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium* cf. *aureolum* (Dinophyceae). *J. Mar Biol. Association of the United Kingdom* 70: 571-58 1.

Gleason, F.K. & Paulson, J.L. 1984. Site of action of the natural agicide, cyanobacterian, in the blue green alga *Synechococcus* sp. *Arch. Microbiol* 138: 273-277.

Granéli, E., Weberg, M. & Salomon, P.S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful algae*. 8: 94-102.

Granéli, E., & Pavia, H., 2006, Allelopathy in marine ecosystems. In: M. J. Reigosa, N. Pedrol, and L. González, eds., *Allelopathy: A Physiological Process With Ecological Implications*. Springer, Holanda, pp. 415–431.

Granéli, E. & Hansen, P.J., 2006. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae, Ecological Studies*, 189. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 189–201.

Granéli, E. & Johansson, N. 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. *Harmful Algae* 2 (2), 135–145.

Gross, E.M. 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 22 (3–4), 313–339.

Guillard, R.R.L., 1979 Culture Methods and Growth Measurements. In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook Of Phycological Methods. *Cambridge Univ. Press*, pp. 289-311.

Hallegraeff, G. M. & Hara, Y. 1995. Taxonomy of Harmful Marine Raphidophytes. In: Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson & A. D. Cembella (Eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris, pp. 365-371.

Hansen, P.J. 2002. The role of pH and CO<sub>2</sub> limitation in marine plankton: implications for species succession. *Aquat Microb Ecol* 28:279–288.

Hernández-Sandoval, F.H., López-Cortés, D.J., C.J. Band-Schmidt., I. Gárate-Lizárraga., E.J. Núñez-Vázquez, & J.J. Bustillos-Guzmán. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiologica* 19(3):245-256.

Huntley, M.E., Sykes, P., Rohan S. & Marin V. 1986. Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. *Mar Ecol Progr Series* 28: 105-120.

Imai, I. & Yamaguchi, M. 2010. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*, *Harmful Algae* doi:10.1016/j.hal.2011.10.014

Ishimatsu A., Oda T., Yoshida M. & Ozaki M. 1996. Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Chattonella marina*. *Fish. Sci.* 62: 836-7.

Ives, J.D. 1987. Possible mechanisms underlying copepod grazing responses to levels of toxicity in red tide dinoflagellates. *J. Exper Mar Biol Ecol* 112: 131-145.

John, U., Tillman, U., Hülsköter, Cembella A. & Aplerman, T. 2010. The ecological and evolutionary concept behind allelochemical interactions for *Alexandrium*

populations. 14th International Conference on Harmful Algae. *Abstract Book*. Grecia, 2010. pp. 103.

Keating, K. I. 1977 Allelopathic influence of blue–green bloom sequences in a eutrophic lake. *Science* 196, 885–887.

Kim, D., Nakamura A., Okamoto T., Komatsu N., Oda T., Ishimatsu A. & Muramatsu, T. 1999. Toxic potential of the Raphidophyte *Olisthodiscus luteus*: mediation by reactive oxygen species. *J. Plank. Res.*, 21: 1017-27.

Kim, M. & Park M.G. 2010. The thecate mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium duplocampanaeforme*: feeding, prey specificity and allelopathy. 14th International Conference on Harmful Algae. *Abstract Book*. Grecia. 2010. pp. 110.

Kubanek, J., Hicks, M. K., Naar, J. & Villareal, T. A. 2005 Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.* 50, 883–895.

Kuroda A., Nakashima T., Yamaguchi K. & Oda T. 2005. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comp. Bioch. Physiol.*, Part C 141: 297-305.

Labry C., Erard-Le Denn E., Chapelle A., Fruchot J., Youenou A., Crassous M.P., Le Garnd J. & Lorgeoux B. 2008. Competition for phosphorous between two dinoflagellates: a toxic *Alexandrium minutum* and a non-toxic *Heterocapsa triquetra*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358, 124-35.

Lampert, W. & Sommer, U. 1997. *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*. Oxford University Press. E.U. 382 pp.

Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O. & Granéli, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42 (4), 406-419.

Lelong, A., Haberkorn, H., Le Goïc, N., Hégaret, H. & Soudant, P. 2010. Study of allelopathic effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the diatom *Chaetoceros neogracile* using flow cytometry. 14th International Conference on Harmful Algae. Abstract Book. Grecia, 2010. pp. 105.

López-Cortés D.J., C.J. Band-Schmidt, J.J. Bustillos-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, F.E. Hernández-Sandoval, & E.J. Núñez-Vázquez. 2011. Co.occurrencia de *Chattonella marina* y *Gymnodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiológica* 21(2):185-196.

Marshall, J.A., Ross, T., Pycroft. & Hallegraeff, G. 2005. Superoxide production by marine microalgae. II. Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Marine Biology*. 147: 541–549

Martínez-Chávez, M. 2010. Efecto de cladóceros y copépodos sobre el fitoplancton del lago La Preciosa, Puebla. Tesis de maestría. UNAM, ICMYL. México, D.F. 74 pp.

Maynard, S. J. 1974. *Models in Ecology*. Cambridge University Press. E.U. p. 146.

Mee, L. D., M. Espinosa & G. Díaz. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar Enviromet Research*19: 77-92.

Oda, T., Ishimatsu, A., Takeshita, S. & Muramatsu, T. 1994. Hydrogen peroxide production by the red tide flagellate *Chattonella marina*. *Biosci. Biothec. Biochem.* 58: 957-8.

Okaichi T. 1987. Red tides problems for aquaculture in Japan. In Dael B., Baden D.G., Barry B. Mck., Edler L., Fraga S., Jenkinson I.R., Hallegraeff G.M., Okaichi T. *et al.*, (eds.), The problems of toxic red dinoflagellate blooms in aquaculture. Sherkin, Island (Eire), pp. 50-51.

Pfiester, L.A., & Anderson, D.M. 1987 Dinoflagellate reproduction. In The Biology of Dinoflagellates. Taylor, F.J.R., (ed.). *Botanical Monographs*, Vol. 21. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 611–648.

Prince, E.K., Myers, T.L., Naar, J. & Kubanek, J. 2008. Competing phytoplankton undermines allelopathy of a bloom-forming dinoflagellate. *Proc. R. Soc. B* 275: 2733-41.

Rizvi, S.J.H., Haque, H., Singh, V.K. & Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. In: Allelopathy: basic and applied aspects (Ed. by S.J.H. Rizvi & V. Rizvi), pp. 1-10. Chapman & Hall, Londres.

Sato, H., Yamamoto, C. & Terai, K. 2005. Environmental factors underlying the occurrence of *Heterocapsa circularisquama* red tide in Fukuoka Bay. *Bull. Fukuoka Mar. Technol. Res. Cent.* 15, 71–75 (in Japanese).

Schmidt, L.E. & Hansen, P.J. 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216, 67–81.

Sellner, K.G., Doucette, G.J. & Kirkpatrick, G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2003) 30: 383 – 406

Sfriso, A. & Pavoni, B. 1994. Macroalgae and phytoplankton standing crops in the central Venice lagoon: primary production and nutrient balance. *Sci. Total. Environ.*, 80: 139-159.

Skovgaard, A. & Hansen, P.J. 2003. Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins. *Limnol Oceanogr* 48:1161–1166

Smayda, T.J., 2002. Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as pelagic seed banks. *Harmful Algae*. 1: 95-112.

Suikkanen, S., Fistarol, G.O. & Granéli, E., 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308 (1), 85–101.

Tanaka K., Muto Y. & Chimada M. 1994. Generation of superoxide anion radicals by the marine phytoplankton organism *Chattonella antiqua*. *J. Plank. Res.* 16: 161-9.

Tiffany, M.A., Barlow, S.B., Matey, V.E., Hulbert S.H. 2001. *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 466: 187-94.

Tillmann, U., John, U. & Cembella, A. 2007 On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *J. Plankton Res.* 29, 527–543.

Turner, J.T., Tester, P.A. & Hansen, P.J. 1998. Interactions between toxic marine phytoplankton and metazoan and protistan grazers. *In: Physiological ecology of harmful algal blooms (Ed. by D . M. Anderson, A.D. Cembella & G. M. Hallegraeff)*, pp. 452-474.

Turriff, N., Runge J.A. & Cembella A.D. 1995. Toxin accumulation and feeding behaviour of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* exposed to the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. *Marine Biology* 123 : 55-64.

Twiner, M.C. & Trick, C.G. 2000. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichtiotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *J. Plank. Res.* 22: 1961-75.

Uchida, T. 1977. Excretion of a diatom inhibitory substance by *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *Japanese Journal of Ecology* 27: 1-4.

Uchida, T., Matsuyama, Y., Yamaguchi, M., & Honjo, T. 1996 Growth interaction between a red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and some other phytoplankton species in culture. In *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Yasumoto, T., Oshima, Y & Fukuyo, Y., (eds). Paris: IOC UNESCO, pp. 369–372.

Uchida, T., Toda, S., Matsuyama, M., Yamaguchi, M., Kotani, & Honjo, T., 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 241, 285–299.

van Donk, E. 2010. Can *Ochromonas* sp., a mixotrophic chrysophyte, control toxic and colony-forming cyanobacteria? 14th International Conference on Harmful Algae. Abstract Book. Grecia, 2010. pp. 107.

Van Donk, E., Lürling, M., & Lampert, W. 1999 Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits, and impact on grazers. In *The Ecology and Evolution of Inducible Defences*. Tollrian, R. & Harvell, C.D., (eds). New Jersey: Princeton University Press, pp. 89–103.

Vardi, A., Schatz, D., Beeri, K., Motro, U., Sukenik, A., Levine, A. & Kaplan, A. 2002. Dinoflagellate–cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Curr. Biol.* 12, 1767–1772.

Wall, D. 1971. Biological problems concerning fossilizable dinoflagellates. *Geoscience and Man*, III: 1-15.

Windust, A.J., Wright, J.L.C. & McLachlan, J.L. 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-I, on the growth of microalgae. *Marine Biology* 126:19-25.

Wink, M. & Twardowski, T. 1992. Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. In: Allelopathy: basic and applied aspects (Ed. by S.J.H. Rizvi & V. Rizvi), pp. 12 -150.

Wolfe, G.Y. 2000. The chemical defence ecology of marine unicellular plankton: constraints, mechanisms and impacts. *Biological Bulletin* 198: 225-244.

Wolfe, J.M. & Rice, E.L. 1979. Allelopathic interactions among algae. *J. Chem. Ecol.* 5 (4), 533–542.

XU, D., Zhou, B., Wang, Y., Ju. Q. & Yu, Q. 2010. CO<sub>2</sub> enrichment on competition between *Skeletonema costatum* and *Heterosigma akashiwo* *Chin. J. Ocea. Limn.* 28 (4) 933-939.

Yamagashi, T., Kai, A. & Kawai, H. 2012. Trichocyst Ribbons of a Cryptomonads Are Constituted of Homologs of R-Body Proteins Produced by the Intracellular Parasitic Bacterium of *Paramecium*. 74:147-157.

Yamasaki, Y., Zou, Y., Go, J., Shikata, T., Matsuyama, Y., Nagai, K., Shimasaki, Y., Yamaguchi, Y., Oshima, Y., Oda, T. & Honjo, T. 2011. Cell contact-dependent lethal effect of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on phytoplankton phytoplankton interactions *Journal of Sea Research* 65 76–83.

Yang, W., Zhang, N., Cui, W., Li., & Liu, J. 2011. Effects of co-existing microalgae and grazers on the production of hemolytic toxins in *Karenia mikimotoi*. *Chin. J. Ocean. Limn.* 29 (6) 1155-1163.

Zhang, W., Jiang, T. J. & Wang, R. 2008. The extraction and separation of hemolytic toxin from *Chattonella marina* Hong Kong strain. *Ecol. Sci.*, 27: 457-462. (in:Chinese with English abstract).

Zhu, J., Wang, J., Shen, H. & Wu, H., 2005. Observation and analysis of the diluted water and red tide in the sea off the Changjiang River mouth in middle and late June 2003. *Chin. Sci. Bull.* 50, 240–247.

Zingone, A. & Wyatt, T. 2005. Harmful algal blooms: keys to the understanding of phytoplankton ecology. In: Robinson AR, Brink KH (eds) *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas*, vol 13. Harvard University Press, Harvard, pp 867–92.