



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS  
MARINAS



INTERACCIONES ALELOPÁTICAS DE  
DINOFLAGELADOS EPIBENTÓNICOS DE LOS  
GÉNEROS *Amphidinium* y *Coolia* EN  
CONDICIONES DE CULTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN MANEJO DE  
RECURSOS MARINOS

PRESENTA  
NADIA VALERIA HERRERA HERRERA

LA PAZ, B.C.S., ENERO DE 2022

## **CONFORMACIÓN DEL COMITÉ**

### **Dirección**

Dra. Christine Johanna Band Schmidt

IPN-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Dra. Lorena María Durán Riveroll

CONACYT Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

### **Comité tutorial, revisor y sinodal**

Dr. Ignacio Leyva Valencia

CONACYT IPN-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Dra. Bárbara González Acosta

IPN-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Dra. Claudia Judith HernándezGuerrero

IPN-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

### **Jurado suplente**

Dra. Ruth Noemí Águila Ramírez

IPN-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA 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 14 del mes de Diciembre

del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS para examinar la tesis titulada:

**“INTERACCIONES ALELOPÁTICAS DE DINOFLAGELADOS EPIBENTÓNICOS DE LOS GÉNEROS *Amphidinium* y *Coolia* (Dinophyceae) EN CONDICIONES DE CULTIVO ”** del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	HERRERA	Apellido Materno:	HERRERA	Nombre (s):	NADIA VALERIA
-------------------	---------	-------------------	---------	-------------	---------------

Número de registro: A 2 0 0 6 1 3

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 9% de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI**  **NO**  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

#### 1.1 JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN (Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuentes originales)

El 9% de similitud del documento corresponde a nombres científicos de especies, nombres de instituciones e investigadores, frases de conexión entre párrafos y oraciones, así como similitudes en la metodología que se encuentra referenciada.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD**  **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

**“SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES”**

#### 2.1 COMISIÓN REVISORA DE TESIS

**DRA. CHERITINE JOHANNA BAND SCHMIDT**  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

**DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA**  
Nombre completo y firma

**DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO**  
Nombre completo y firma

**DRA. LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL**  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

**DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA**  
Nombre completo y firma

**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**  
Nombre completo y firma  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 14 del mes de Diciembre del año 2021

El (la) que suscribe BM. NADIA VALERIA HERRERA HERRERA Alumno (a) del Programa  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A200613 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 DRA. LORENA MARIA DURAN RIVEROLL  
y cede los derechos del trabajo titulado:

**“INTERACCIONES ALELOPÁTICAS DE DINOFLAGELADOS EPIBENTÓNICOS DE LOS  
GÉNEROS *Amphidinium* y *Coolia* (Dinophyceae) EN CONDICIONES DE CULTIVO”**

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: nadia.valeria.h2@gmail.com - cbands@ipn.mx

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

**BM. NADIA VALERIA HERRERA HERRERA**

*Nombre y firma del alumno*

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 <i>Ecología química</i> .....	3
1.2 <i>Alelopatía</i> .....	4
1.3 <i>Sustancias aleloquímicas</i> .....	7
1.4 <i>Ecosistemas bentónicos y/o epibentónicos</i> .....	8
1.5 <i>Florecimientos algales nocivos</i> .....	10
1.1.1 1.5.1 <i>Género Amphidinium</i> .....	14
1.1.2 1.5.2 <i>Género Coolia</i> .....	18
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	21
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	26
5.1 <i>Objetivo general</i> .....	26
5.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	27
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
6.1 <i>Cepas</i> .....	27
1.1.3 6.1.1 <i>Establecimiento de los cultivos</i> .....	27
6.2 <i>Medio y condiciones de cultivo</i> .....	28
6.3 <i>Identificación morfológica y determinación taxonómica</i> .....	28
1.1.4 6.3.1 <i>Microscopía fotónica (MF)</i> .....	28
1.1.5 6.3.2 <i>Microscopía electrónica de barrido (MEB)</i> .....	29
1.1.6 6.3.3 <i>Ciclo de vida</i> .....	29
6.4 <i>Identificación molecular</i> .....	29
1.1.7 6.4.1 <i>Extracción de ADN</i> .....	29
1.1.8 6.4.2 <i>Amplificación de fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa</i> .....	30
1.1.9 6.4.3 <i>Secuenciación</i> .....	31
1.1.10 6.4.4 <i>Análisis filogenético</i> .....	31
6.5 <i>Procesamiento de imágenes</i> .....	32
6.6 <i>Curvas de crecimiento</i> .....	32

1.1.11	6.6.1	Curvas en cajas multipozos .....	32
1.1.12	6.6.2	Curvas en matraces Erlenmeyer .....	33
1.1.13	6.6.3	Tasa de crecimiento y tiempo de generación.....	33
<b>6.7 Experimentación de interacciones alelopáticas .....</b>			<b>34</b>
1.1.14	6.7.1	Cálculos de biovolumen de las cepas.....	34
1.1.15	6.7.2	Cultivos madre para experimentos de interacción .....	34
1.1.16	6.7.3	Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular .....	34
1.1.20	6.7.4	Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular.....	36
1.1.22	6.7.5	Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados	37
1.1.24	6.7.6	Conteos y observaciones morfológicas .....	38
<b>VII. RESULTADOS .....</b>			<b>38</b>
<b>7.1 Identificación morfológica y determinación taxonómica .....</b>			<b>38</b>
1.1.26	7.1.1	<i>Amphidinium</i> sp.....	38
1.1.27	7.1.2	<i>Amphidinium</i> <i>thermaeum</i> Dolapsakis & Economou-Amilli 2009 (156, Figs. 1-47).....	39
1.1.28	7.1.3	<i>Coolia</i> <i>malayensis</i> Leaw, P.-T.Lim & Usup in Leaw & al. 2001 (164, Figs. 1-6)49	
1.1.29	7.1.4	<i>Coolia</i> <i>malayensis</i> Leaw, P.-T.Lim & Usup in Leaw & al. 2001 (164, Figs. 1-6)57	
<b>7.2 Identificación molecular y análisis filogenético.....</b>			<b>61</b>
<b>7.3 Curvas de crecimiento.....</b>			<b>65</b>
1.1.30	7.3.1	Curvas en cajas multipozos .....	65
1.1.33	7.3.2	Curvas en matraces Erlenmeyer .....	66
<b>7.4 Experimentación de interacciones alelopáticas .....</b>			<b>72</b>
1.1.36	7.4.1	Biovolumen.....	72
1.1.37	7.4.2	Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular .....	72
1.1.40	7.4.3	Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular.....	81
1.1.42	7.4.4	Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados	85
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>			<b>92</b>
<b>8.1 Identificación morfológica y determinación taxonómica .....</b>			<b>92</b>
1.1.44	8.1.1	Género <i>Amphidinium</i> .....	93
1.1.46	8.1.2	Género <i>Coolia</i> .....	96
<b>8.2 Identificación molecular y análisis filogenético.....</b>			<b>101</b>
<b>8.3 Curvas de crecimiento.....</b>			<b>102</b>

8.4 Experimentación de interacciones alelopáticas .....	106
1.1.50 8.4.1 Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular .....	107
1.1.51 8.4.2 Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular.....	112
1.1.52 8.4.3 Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados	114
1.1.53 8.5 Mucilago .....	116
<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
<b>XI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>118</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del género <i>Amphidinium</i> .....	16
Figura 2. Morfología del género <i>Coolia</i> .....	19
Figura 3. Matraz de alelopatía, compuesto de dos cámaras tubulares. ....	35
Figura 4. Células vegetativas de <i>Amphidinium</i> sp. (s/i 73) en microscopía fotónica. ....	43
Figura 5. Células vegetativas de <i>Amphidinium</i> sp. (s/i 73) en microscopía electrónica de barrido.	44
Figura 6. Células vegetativas de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) en microscopía fotónica. ...	45
Figura 7. Células vegetativas de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) en microscopía electrónica de barrido.....	46
Figura 8. Proceso de reproducción por fisión binaria de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) en microscopía fotónica. ....	47
Figura 9. Proceso de reproducción por quistes hialinos de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) en microscopía fotónica. ....	48
Figura 10. Proceso de reproducción por conjugación sexual de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) en microscopía fotónica. ....	49
Figura 11. Células vegetativas de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía fotónica.....	53
Figura 12. Células vegetativas de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía electrónica de barrido.....	54
Figura 13. Proceso de reproducción por fisión binaria de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía fotónica. ....	55
Figura 14. Estados de las células vegetativas del proceso sexual de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía fotónica. ....	56
Figura 15. Proceso de reproducción por conjugación sexual de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía fotónica. ....	56
Figura 16. Proceso de reproducción sexual mediante quistes temporales de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en microscopía fotónica.....	57
Figura 17. Células vegetativas de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 76) en microscopía fotónica.....	60

Figura 18. Células vegetativas de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 76) en microscopía electrónica de barrido.....	61
Figura 19. Análisis filogenético de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana del género <i>Amphidinium</i> inferido a partir de la subunidad larga de la LSU del ADNr (D1/D3).....	63
Figura 20. Análisis filogenético de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana del género <i>Coolia</i> inferido a partir de la subunidad larga de la LSU del ADNr (D1/D3). .....	64
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>A. thermaeum</i> (si/ 74) en placas multipozos de 240 $\mu$ L. ...	68
Figura 22. Curva de crecimiento de <i>A. thermaeum</i> (si/ 74) en placas multipozos de 1 mL. ....	68
Figura 23. Curva de crecimiento de <i>C. malayensis</i> (si/ 75) en placas multipozos de 240 $\mu$ L. ....	69
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>C. malayensis</i> (si/ 75) en placas multipozos 1 mL. ....	69
Figura 25. Curva de crecimiento de <i>A. thermaeum</i> (si/ 74) en matraces Erlenmeyer en 300 mL. ....	70
Figura 26. Curva de crecimiento de <i>C. malayensis</i> (si/ 75) en matraces Erlenmeyer en 300 mL. ....	70
Figura 27. Promedios de las tasas de crecimiento. ....	72
Figura 28. Interacción alelopática en cultivos mixtos de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 200 $\mu$ L, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1, B) 1:2 y C) 2:1. ....	75
Figura 29. Morfología de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos mixtos. ....	76
Figura 30. Interacción alelopática en cultivos mixtos de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 300 mL, iniciados con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1, B) 2:1. ....	79
Figura 31. Morfología de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos mixtos. ....	80
Figura 32. Cultivos sin contacto celular de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 300 mL, separados por la membrana de 2.5 $\mu$ m, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1. ....	83
Figura 33. Morfología de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos sin contacto celular en proporción de biovolumen 1:1. ....	83
Figura 34. Cultivos sin contacto celular <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 300 mL, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad). B) 1:2. ....	84
Figura 35. Morfología de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos sin contacto celular en proporción 1:2. ....	84
Figura 36. Cultivos con exposición a filtrados celulares de <i>Amphidinium thermaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 300 mL, a una concentración de 50%. ....	87
Figura 37. Morfología de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 50% de <i>A. thermaeum</i> y <i>C. malayensis</i> . ....	88

Figura 38. Cultivos con exposición a filtrados celulares de <i>Amphidinium therrmaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en 300 mL, a una concentración de 50%.....	89
Figura 39. Morfología de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en el cultivo control en medio GSe. ....	89
Figura 40. Morfología de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 100% de <i>A. therrmaeum</i> . ....	90
Figura 41. Morfología de <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 100% de <i>C. malayensis</i> . ....	91

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información del aislamiento de <i>Amphidinium</i> y <i>Coolia</i> .....	27
Tabla 2. Crecimiento de <i>Amphidinium therrmaeum</i> (s/i 74) y <i>Coolia malayensis</i> (s/i 75) en diferentes volúmenes. ....	71

## ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de la región LSU de <i>Amphidinium</i> utilizadas para el análisis filogenético. ....	158
Anexo 2. Secuencias de la región LSU de <i>Coolia</i> utilizadas para el análisis filogenético. ....	159

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Agradezco al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional por mi formación como Maestra en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos.

También agradezco a CONACyT por el apoyo para desarrollar esta investigación (N° de becario 747731) y la beca BEIFI-IPN.

A los proyectos CONACyT A1 S 8616 y A1 S 14968, y al proyecto de investigación IPN SIP 2021 0126.

A mi directora, la Dra. Christine Johanna Band Schmidt por su apoyo incondicional, sus consejos y sobre todo por no ponerme límites para desarrollar este proyecto.

A mi directora, la Dra. Lorena María Durán Riveroll por su apoyo incondicional, sus consejos y por transmitirme esa pasión hacia los dinoflagelados bentónicos.

Al Dr. Ignacio Leyva Valencia por su apoyo en los análisis moleculares y filogenéticos, así como en el trabajo de laboratorio.

Al comité revisor de tesis: Dra. Bárbara González Acosta, Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, el Dr. Ignacio Leyva Valencia y Dra. Ruth Noemí Águila Ramírez por su revisiones y comentarios para mejorar este trabajo.

A la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga y al Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su apoyo en la toma de fotografías.

Al M. en C. Leyberth José Fernández Herrera por su apoyo en laboratorio y en el diseño experimental.

Al Dr. Hugo Isidro Pérez López por su apoyo y asesorías en la preparación de las muestras de microscopía electrónica de barrido.

A los laboratorios de Docencia 1 y Fitoplancton Marino por el uso de equipos y materiales.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco a mi madre Cristina Herrera por todo su amor y apoyo durante toda mi educación. A mi padre Javier Herrera por apoyo en la locura de seguir estudiando. A mi hermana Diana Yazmín Herrera por ser mi mejor amiga y compañera de aventuras e ideales.

A mis amigos Michelle Vega y Carlos Gerardo Torres que fueron mi familia, me dieron su apoyo incondicional, con ustedes compartí grandes momentos, aventuras y risas.

A Mónica Rivera por brindarme su amistad, consejos, conocimiento y tiempo en largas charlas de diferentes temas.

A Gema Villa, gracias por tu amistad, por escucharme cuando entraba en crisis y por compartir momentos de buena música y películas.

A Laura Almaraz, gracias por ser mi hada madrina y por darme el impulso para lograr esto.

## RESUMEN

En los ecosistemas bentónicos existen procesos de señalización química mediante interacciones alelopáticas relacionadas con la coexistencia y la competencia, que son reguladas y limitadas por el espacio y el tipo de sustrato. En este estudio se evaluó el efecto de las interacciones entre dinoflagelados epibentónicos de los géneros *Amphidinium* y *Coolia*. Los aislados se obtuvieron de la Bahía de La Paz y se cultivaron en medio GSe a  $24 \pm 1$  °C y a una salinidad de 34. Se incubaron con un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad con luz blanca fría de  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Se realizaron las curvas de crecimiento en volúmenes de 240  $\mu\text{L}$ , 1 mL y 300 mL y se documentaron las fases del ciclo celular. Los aislados se identificaron morfológicamente y mediante la amplificación de la región 28S del ADNr como *Amphidinium* sp., *Amphidinium thermaeum* y *Coolia malayensis*. Las interacciones alelopáticas entre las especies *A. thermaeum* y *C. malayensis* se evaluaron en experimentos en cultivos mixtos, tanto en volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  en cajas multipozos y en matraces de alelopatía en 300 mL. Además, se realizaron bioensayos con las especies separadas por una membrana para evitar el contacto directo entre las células, y también mediante la adición de filtrados células al 50 y 100 %. Para todos los bioensayos, las células de cada especie se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento. Los experimentos fueron inoculados con densidades iniciales en proporciones de biovolumen celular de: 1:1, 1:2 y 2:1. En todos los tratamientos se realizaron conteos celulares cada tercer día para calcular las densidades celulares y observar el efecto alelopático. En los cultivos mixtos se observó la dominancia de *A. thermaeum*, así como los efectos sobre el crecimiento de *C. malayensis* y cambios en su morfología (pérdida del movimiento, clorosis, ecdisis y lisis celular), tales efectos también se observaron en cultivos con exposición a filtrados celulares con una concentración de 100%. En los cultivos sin contacto celular no se observaron efectos en ninguna de las especies. Estas especies parecen competir mediante alelopatía por espacio, lo que se refleja en la disminución de la densidad celular. Estimar el crecimiento y los efectos de la interacción en dinoflagelados epibentónicos es un desafío debido a su capacidad de adhesión, velocidad de nado, producción de mucílago y complejidad del ciclo de vida.

## ABSTRACT

In benthic ecosystems there are chemical signaling processes through allelopathic interactions related to coexistence and competition, which are regulated and limited by space and the type of substrate. In this study, the effect of the interactions between epibenthic dinoflagellates of the *Amphidinium* and *Coolia* genera was evaluated. The isolates were obtained from the Bahía de La Paz and were cultivated in GSe medium at  $24 \pm 1$  ° C and a salinity of 34. They were incubated with a photoperiod of 12:12 h light: dark with cold white light of  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Growth curves were performed in volumes of 240  $\mu\text{L}$ , 1 mL, and 300 mL, and the phases of the cell cycle were documented. The isolates are identified morphologically and by amplifying the 28S region of rDNA as *Amphidinium* sp., *Amphidinium thermaeum* and *Coolia malayensis*. The allelopathic interactions between the species *A. thermaeum* and *C. malayensis* were evaluated in experiments in mixed cultures, both in volumes of 200  $\mu\text{L}$  in multi-well plates and in allelopathy chambers in 300 mL. In addition, bioassays were performed with the species separated by a membrane to avoid direct contact between the cells, and also by adding 50 and 100% cell filtrates. For all bioassays, cells of each species were harvested during the exponential phase of growth. The experiments were inoculated with initial densities in cell biovolume of: 1: 1, 1: 2 and 2: 1. In all treatments, cell counts were performed every third day to calculate cell densities and observe the allelopathic effect. In mixed cultures, the dominance of *A. thermaeum* is carried out, as well as the effects on the growth of *C. malayensis* and changes in its morphology (loss of movement, chlorosis, ecdysis and cell lysis), such effects were also observed in cultures with exposure to cell filtrates with a concentration of 100%. In cultures without cell contact, no effects were observed in any of the species. These species appear to compete by allelopathy for space, which is reflected in the decrease in cell density. Estimating growth and interaction effects in epibenthic dinoflagellates is challenging due to their adhesion ability, swimming speed, mucilage production, and life cycle complexity.

Dedicatoria

“We must stop this cruel treatment of aliens. We all live on this ball of rock, you  
know?”

Venom: “Let There Be Carnage”



## I. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son un grupo de protistas y eucariotas con representantes en ambientes marinos, estuarinos y dulceacuícolas; además, son componente mayoritario en la comunidad del fitoplancton y fitobentos (Taylor, 1987; Saldarriaga & Taylor, 2017). De las aproximadamente 2,500 especies descritas, 83% son marinas, y del total de los dinoflagelados marinos, el 91% son planctónicos y el 9% son bentónicos (Gómez, 2012). Su importancia en los ecosistemas marinos radica en que son productores primarios, contribuyen a la diversidad comunitaria, pueden ser simbioses fotosintéticos y otros son toxigénicos, además de formar parte de arrecifes coralinos. Algunos también son responsables de procesos de bioluminiscencia y pueden ser formadores de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) (Hallegraeff, 2003; Hoppenrath *et al.*, 2014). Los dinoflagelados bentónicos y epifíticos marinos se encuentran en diferentes tipos de hábitats tropicales y templados, en sedimentos o sobre diferentes sustratos (Parsons & Preskitt, 2007; Fraga *et al.*, 2012). Muchos de ellos producen sustancias químicas tóxicas (ficotoxinas) y bioactivas con las cuales pueden causar impactos adversos en organismos marinos, bioacumularse y transferirse en la red trófica (Tindall & Morton, 1998; Lewis, 2001; Flewelling *et al.*, 2005; Pagliara & Caroppo, 2012). Estos organismos están representados en géneros conspicuos de los cuales su potencial tóxico no ha sido dilucidado y a menudo se encuentran coexistiendo e interactuando de manera directa en ambientes bentónicos. Tienden a formar agregados celulares mucilaginosos adheridos a sustratos, que pueden afectar y degradar la calidad del agua con asociaciones de bacterias mediante la formación de florecimientos de altas concentraciones de biomasa (Besada *et al.*, 1982a; Mangialajo *et al.*, 2008; Armi *et al.*, 2010; Ben-Gharbia *et al.*, 2016). Estos agregados son formados particularmente por miembros de los géneros *Amphidinium* Claperède & Lachmann, *Coolia* Meunier, *Gambierdiscus* Adachi & Fukuyo, *Fukuyoa* Gómez, Qiu, Lopes & Lin, *Ostreopsis* Schmidt y *Prorocentrum* Ehrenberg (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Hachani *et al.*, 2018; Yong *et al.*, 2018; Rhodes & Smith, 2019).

La coexistencia de los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos está condicionada por el equilibrio entre la concentración celular (ganancias y pérdidas), la



disponibilidad de la luz y de nutrientes. Se han esclarecido también diferentes adaptaciones, como la absorción de nutrientes a través de la natación, la mixotrofia y mecanismos alelopáticos (Smayda, 1997; Fraga *et al.*, 2012; García-Portela *et al.*, 2016). Una relación biótica relevante es la alelopatía; que es la capacidad de ciertas especies para producir y liberar sustancias aleloquímicas que inhiben a sus potenciales competidores por recursos similares. Generalmente, la alelopatía incluye un efecto benéfico y uno perjudicial; los dos efectos pueden manifestarse en la misma especie según la cantidad de sustancias aleloquímicas o la densidad celular (Legrand *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2019; Yunes, 2019). La producción de las sustancias aleloquímicas interfiere en el crecimiento y el desarrollo de las especies acompañantes, y en caso de existir una inhibición o efecto hacia los competidores, les brinda ventajas competitivas (Lewis, 1986; Ianora *et al.*, 2012; Sarkar, 2018).

En tales casos, el efecto de una microalga específica sobre otras se puede documentar a través de experimentos de crecimiento. Estos experimentos consisten en realizar cultivos con especies potencialmente tóxicas en contacto, en medios de cultivo enriquecidos que permitan su desarrollo (Granéli & Hansen, 2006). Uno de los efectos reportados más sobresalientes es la actividad lítica que causan los metabolitos extracelulares que merman el crecimiento de otras microalgas y protistas heterotróficos (Tillmann & John, 2002; Tillmann *et al.*, 2007, 2008)

Una de las formas para determinar la producción continua de sustancias aleloquímicas derivadas de dinoflagelados toxigénicos es mediante la generación de cultivos de especies que permitan estudiar sus efectos nocivos sobre otras especies. Este enfoque también permite estudiar la dinámica de crecimiento de las especies productoras de ficotoxinas y las especies objetivo. Debido a que no siempre la especie productora de la ficotoxina es la sobreviviente, en muchos casos el resultado del experimento dependerá de las concentraciones iniciales, la concentración de las células objetivo, la tasa de crecimiento y la tolerancia al pH (Granéli & Hansen, 2006). En el caso de los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos, específicamente para los géneros *Amphidinium* y *Coolia*, solo unos pocos trabajos han descrito las interacciones alelopáticas con otros protistas (Ji *et al.*, 2012; Monti & Cecchin, 2012; García-Portela *et al.*, 2014; Peltekis, 2020; Paul *et al.*, 2021). A pesar de que los



estudios han aumentado en los últimos años, todavía se carece de información sobre las interacciones y asociaciones entre dinoflagelados bentónicos toxigénicos (García-Portela *et al.*, 2016).

## 1.1 Ecología química

La ecología química microbiana como ciencia integradora es fundamental para comprender los mecanismos del funcionamiento y la complejidad de los ecosistemas acuáticos, ya que controla la coexistencia y coevolución de las especies mediante un lenguaje químico derivado de moléculas bioactivas (Cembella, 2003; Ianora *et al.*, 2011; Poulin *et al.*, 2020). La comunicación química requiere de maquinaria biológica, la cual incluye a los genes, el ARN, las proteínas y mensajeros químicos. El conjunto de estos componentes permite la producción y liberación y/o detección de diferentes señales químicas, también llamadas “infoquímicos” (Legrand *et al.*, 2003; Venuleo *et al.*, 2017) que son liberados de manera intencional o involuntaria (Steiger *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2019) e influyen en las interacciones de los organismos de forma positiva o negativa a nivel intraespecífico (en la misma especie) e interespecífico (entre especies) (Cembella, 2003; Ianora *et al.*, 2011; John *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 2019).

Los microorganismos producen una amplia variedad de metabolitos con propiedades fisicoquímicas y biológicas. En los últimos años, estas biomoléculas se han denominado “metabolitos especializados”, con el fin de enfatizar su papel en la ecología microbiana (Davies, 2013; Schmidt *et al.*, 2019). Estos metabolitos secundarios son compuestos volátiles y solubles en agua (no volátiles), así como polares y no polares que transmiten información (Ianora *et al.*, 2012; Mollo *et al.*, 2017; Saha *et al.*, 2019). Pero estos señalizadores químicos se encuentran en bajas concentraciones en el agua o el aire y se degradan con rapidez, probablemente para evitar problemas de comunicación (Cembella, 2003; Pavaux *et al.*, 2020). Se considera que su dispersión se lleva a cabo a través de transporte advectivo o casi difusivo, movimiento celular aleatorio o dirigido, mediante vectores de transporte abióticos o bióticos como partículas coloidales o la microbiota y macrofauna (Deveau *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2019).

En la ecología microbiana se reconocen las funciones que desempeñan la



comunicación y las interacciones químicas en todos los ecosistemas (Atkinson & Williams, 2009; Schmidt *et al.*, 2019). En particular, en la base de las redes tróficas acuáticas, las microalgas están sujetas a presiones constantes de depredación, herbivoría y competencia. Para prosperar, las microalgas producen metabolitos secundarios difusibles con funciones mediadoras de las interacciones intraespecíficas, como las feromonas sexuales que coordinan el apareamiento, o las interacciones interespecíficas, como la simbiosis (mutualismo o parasitismo), la alelopatía, la defensa contra el pastoreo y los depredadores, y las interacciones en la formación de biopelículas (Smayda, 1997; Cembella, 2003; Ianora *et al.*, 2012; Poulin *et al.*, 2020). Al descifrar este lenguaje químico podremos comprender las interacciones ecológicas entre especies, sin embargo, su origen y diversidad aún es un desafío y rara vez es estudiado (Schmidt *et al.*, 2019).

## 1.2 Alelopatía

El término alelopatía deriva del griego “*alleon*”, mutuo y “*phatos*”, sufrimiento y fue introducido por Molisch en 1937. La alelopatía es un fenómeno biológico que se lleva a cabo mediante mecanismos de interacciones químicas, en los cuales plantas, algas, bacterias y hongos producen una o más biomoléculas llamadas “sustancias aleloquímicas” que afectan el crecimiento, el desarrollo, la sobrevivencia y/o reproducción de otro organismo (Rice, 1985, 1987; Willis, 1985; Legrand *et al.*, 2003). Las biomoléculas implicadas en los procesos de alelopatía pueden ser metabolitos secundarios (no implicados directamente en los procesos fisiológicos fundamentales para el organismo) o metabolitos primarios (implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un organismo o célula) que actúan como factores para atraer, disuadir o matar a otros organismos y así aumentar su probabilidad de sobrevivencia (Petersen *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021). Generalmente, la alelopatía incluye la interacción de un donador y un receptor (u organismo objetivo), generando un efecto benéfico (estímulo) y uno perjudicial (inhibición), ambos efectos pueden manifestarse en la misma especie según la concentración de sustancias aleloquímicas o la densidad celular (Lewis, 1986; Legrand *et al.*, 2003; Chaïb *et al.*, 2021). Normalmente, las especies donantes pueden afectar a varias especies, pero no a todas las especies



receptoras. De igual manera, las especies receptoras son susceptibles, pero no a todas las sustancias aleloquímicas liberadas por los donadores. Se ha reportado que las intensidades de los efectos alelopáticos dependerán de la identidad taxonómica (diferencias entre cepas) del donador y el receptor (Schagerl *et al.*, 2002; Volk & Furkert, 2006; Gantar *et al.*, 2008; Barreiro & Vasconcelos, 2014; Poulson-Ellestad *et al.*, 2014; Konarzewska *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). La resistencia a diferentes sustancias aleloquímicas entre los organismos receptores coexistentes sugiere procesos adaptativos de coevolución (Cembella, 2003; Fistarol *et al.*, 2003; Legrand *et al.*, 2003; Fistarol *et al.*, 2004; Suikkanen *et al.*, 2004; Yamasaki *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021).

Los efectos de las sustancias aleloquímicas sobre las especies objetivo son complejos, multifuncionales y a menudo difíciles de diagnosticar, derivado de las interacciones sinérgicas, que provocan diferentes mecanismos de acción (Cembella, 2003; Legrand *et al.*, 2003). Los efectos expresados y observados más frecuentemente se presentan a través de cambios ultraestructurales, modificaciones en el citoesqueleto y frecuentemente provocan lisis de la membrana celular (Cembella, 2003; Fistarol *et al.*, 2004; Granéli & Hansen, 2006; Fernández-Herrera *et al.*, 2016; García-Portela *et al.*, 2016; Pichierrri *et al.*, 2017; Chaïb *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). También se han observado procesos de inhibición del crecimiento, cambios en la permeabilidad de la membrana y modificaciones de la actividad enzimática que impiden la síntesis de ARN y la replicación del ADN. Además, inducen a la formación de quistes temporales de reproducción y bloquean o disminuyen la movilidad y la división celular (Kearns & Hunter, 2001; Cembella, 2003; Legrand *et al.*, 2003; Granéli *et al.*, 2008; Ianora *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015; García-Portela *et al.*, 2016; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). En el metabolismo celular también se pueden presentar diferentes efectos que influyen en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, al inhibir el transporte de electrones (Shao *et al.*, 2009), la biosíntesis de pigmentos, así como alterar la cinética, absorción, transferencia y distribución de la energía (Gross, 2003; Liu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010, 2021; Chaïb *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). Asimismo,



pueden modificar la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se encuentran en equilibrio intracelular como los radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), provocando daños en los sistemas antioxidantes, en el proceso de respiración celular y en la síntesis de proteínas (Lu *et al.*, 2016; Aquino-Cruz *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021; Fernández-Herrera *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). Las sustancias aleloquímicas también pueden activar la muerte celular programada mediante la activación de las caspasas o metacaspasas, la condensación de la cromatina, la formación de ampollas en la membrana, la degeneración de organelos y la fragmentación del ADN (Lu *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Fernández-Herrera *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021).

En los ambientes naturales, la producción y secreción de sustancias aleloquímicas se puede modificar por diferentes factores bióticos y abióticos en las interacciones (Reigosa *et al.*, 1999, 2006; Gross, 2003; Legrand *et al.*, 2003; Granéli & Hansen, 2006; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). De todos los factores abióticos que promueven la alelopatía, los más estudiados son la limitación y deficiencia de nutrientes (nitrógeno y fósforo), las bajas temperaturas, el pH alto ( $\sim$  pH 9), así como los cambios de salinidad (Smayda, 1997; Cembella, 2003; Legrand *et al.*, 2003; Granéli & Hansen, 2006; Ianora *et al.*, 2006; Granéli *et al.*, 2008; Chaïb *et al.*, 2021). El factor biótico más importante que afecta la alelopatía de las microalgas es la especie involucrada, y con ello, la intensidad del efecto alelopático sobre la especie objetivo que depende del tipo de cepa y su identidad taxonómica (Granéli *et al.*, 2008; García-Portela *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). El tamaño de la célula es clave para definir su relación superficie-volumen, la cual es una variable importante en su ecofisiología, que está ligada a las tasas metabólicas y a la asimilación de nutrientes (Smayda, 1997; Lyczkowski & Karp-Boss, 2014; Ma *et al.*, 2015; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). Existe también una estrecha relación entre la fase de crecimiento y la concentración celular, que es decisiva para la producción y la susceptibilidad de las especies objetivo a las sustancias específicas (Shilo, 1967; Schmidt & Hansen, 2001; Tillmann & John, 2002; Tillmann, 2003; Suikkanen *et al.*, 2004; Granéli *et al.*, 2008; Chaïb *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). Las poblaciones en crecimiento exponencial son clave para los efectos sobre otras



microalgas (Shilo, 1967; Granéli *et al.*, 2008), y se asocian al patrón general de efectos, el cual sugiere que, a mayor número de células de la especie donante, existe un mayor efecto y magnificación hacia la especie objetivo, y viceversa (Granéli *et al.*, 2008). En conjunto, estos factores son indispensables para la recuperación de las microalgas con el fin de optimizar sus rendimientos en la producción de biomasa y de las sustancias aleloquímicas (Chaïb *et al.*, 2021).

### 1.3 Sustancias aleloquímicas

Los ecosistemas acuáticos presentan una gama amplia de especies y compuestos químicos, en comparación con los ecosistemas terrestres (Pawlik *et al.*, 2013; Mollo *et al.*, 2017; Petersen *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021). En particular, los dinoflagelados producen una diversidad de metabolitos secundarios biológicamente activos como las ficotoxinas (biotoxinas) y sustancias aleloquímicas (Cembella, 2003; Gross *et al.*, 2012). Estas últimas evidencian que los procesos alelopáticos son un factor clave para explicar la estructura de la comunidad, la sucesión de especies, la dinámica poblacional y las defensas químicas de los dinoflagelados contra la depredación y la herbivoría (Granéli *et al.*, 2008)

Las sustancias aleloquímicas con funciones bioactivas se agrupan en cuatro categorías en función de su ruta biosintética: 1) compuestos fenólicos y derivados, que incluyen a los fenoles simples, cumarinas, flavonoides, quinonas, taninos, ácidos cinámicos y derivados; 2) compuestos nitrogenados como alcaloides, anilinas, aminoácidos y derivados, que se biosintetizan a partir de la ruta del ácido shikímico; 3) ácidos grasos de cadena larga y corta, ésteres y poliacetilenos que se biosintetizan a partir de la ruta de la policétido sintetasa; y 4) terpenos y esteroides que son biosintetizados a partir de la ruta del ácido mevalónico (Iánora *et al.*, 2006; Reigosa *et al.*, 2006; Macías *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Freile-Pelegrín & Robledo, 2013; Cousseau *et al.*, 2020; Mateos *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021).

Las sustancias aleloquímicas confieren ventajas competitivas a los dinoflagelados, derivadas de los efectos interespecíficos y antibióticos sobre el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de las especies antagónicas (Gross, 2003, 2012; Iánora *et al.*, 2011; Iánora *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020).



Además de ser una fuente de nuevos compuestos con potencial biotecnológico y biomédico con actividades anticancerígenas, antifúngicas, antiincrustantes, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales, antivirales, antiinflamatorias, así como bioherbicidas y biopesticidas. También pueden funcionar como protectores contra la luz ultravioleta, y ser probióticos para el desarrollo de otros organismos (Macías *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2014; Lauritano *et al.*, 2017; López-Rodríguez *et al.*, 2019; Molina-Miras *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021; Jiménez-López *et al.*, 2021). Sin embargo, el conocimiento sobre la estructura y la identidad química de muchos compuestos bioactivos implicados en las interacciones alelopáticas y sus rutas metabólicas, así como la parte cuantitativa de las interacciones, sigue siendo escasa (Chaïb *et al.*, 2021).

#### **1.4 Ecosistemas bentónicos y/o epibentónicos**

El impacto de la alelopatía en los ecosistemas acuáticos depende de la producción de sustancias aleloquímicas bioactivas y su propagación efectiva a los organismos (Lewis, 1986). En los ambientes bentónicos los organismos se encuentran a distancias cortas entre sí a través de la formación de biopelículas. A menudo las células se encuentran en contacto directo, a diferencia de los habitantes de la zona pelágica (Rizvi *et al.*, 1992; Leflaive & Ten-Hage, 2007; Allen *et al.*, 2016; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021). Las biopelículas están formadas por microorganismos fotótrofos y heterótrofos, con ciertas especificidades espaciales y estructurales que las hacen propicias para las interacciones biológicas y químicas (Durrett & Levin, 1997; Wahl *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2016). También se caracterizan por una alta densidad de microorganismos incrustados en una matriz extracelular de sustancias poliméricas, en donde llevan a cabo la producción primaria y la remineralización conjuntamente. Los canales dentro de estas promueven la transferencia masiva de nutrientes, gases y sustancias químicas (De Beer *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2016). Dentro de las comunidades epibentónicas, la alelopatía como factor biótico controla la estructura y función de las biopelículas.

Los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos con células vegetativas se encuentran colonizando sustratos y adheridas por matrices mucilaginosas llamadas



“metafíticas” (MacKenzie *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2012; Escalera *et al.*, 2014). Las células de vida libre son flageladas, completamente capaces de desprenderse y tener movilidad, lo que les confiere la capacidad de ocupar una amplia variedad de micro-nichos proporcionados por estos hábitats de sustratos alternativos (Round, 1984; Carnicer *et al.*, 2015; Durán-Riveroll *et al.*, 2019). Estos dinoflagelados están asociados a sustratos de la zona intermareal como las macroalgas y tapetes, pastos marinos, rocas y sedimentos poco profundos, así como a arrecifes coralinos (sanos y con efecto de blanqueamiento) y superficies de mangles (Rhodes *et al.*, 2000, 2014; Hoppenrath *et al.*, 2014; Leung *et al.*, 2017). Por otra parte, compiten por luz, nutrientes, espacio y colonización del sustrato con bacterias y hongos (heterótrofos), microalgas planctónicas, macroalgas y pastos marinos (Allen *et al.*, 2016).

Es importante señalar la diferencia entre alelopatía y competencia, ya que algunos autores sostienen que la alelopatía es parte de la competencia por los recursos y/o un mecanismo de defensa. Sin embargo, es imposible separar estos mecanismos en los sistemas naturales, debido a que en el análisis del conjunto de factores que afectan estos procesos existe un efecto sinérgico, aditivo o incluso antagónico, que engloba la relación alelopática en un entorno más complejo (Igarashi *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1998; Legrand *et al.*, 2003; Granéli & Hansen, 2006; Weidenhamer, 2006; Chaïb *et al.*, 2021). En general, la alelopatía en los dinoflagelados puede llevarse a cabo de cuatro formas: 1) las sustancias alelopáticas de un dinoflagelado afectan el crecimiento de otra especie; 2) las sustancias alelopáticas excretadas por el dinoflagelado pueden inhibir su propio crecimiento (autotoxicidad); 3) las sustancias alelopáticas influyen en el crecimiento de otros microorganismos; y 4) las sustancias alelopáticas pueden afectar el crecimiento de organismos superiores (plantas, invertebrados y peces) (Dakshini, 1994; Chaïb *et al.*, 2021).

Uno de los aspectos poco estudiados y más llamativos de la biología de los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos es la diferencia a pequeña escala que existe entre los sustratos y cómo afecta la distribución y abundancia de las especies que presentan un riesgo de toxicidad. Dada la fuerte asociación de las células con el ambiente bentónico, se ha observado que el tipo de sustrato parece desempeñar un papel importante en el control y la distribución heterogénea de estos organismos



(Tindall & Morton, 1998; Yong *et al.*, 2018). Los ecosistemas bentónicos son una fuente de diversas señales químicas, ya que la competencia por el espacio y el sustrato son mayores que en los ambientes pelágicos. Los dinoflagelados planctónicos experimentan un espacio tridimensional, en comparación con el ambiente bentónico, el cual es bidimensional, limitando las ventajas para sus interacciones ecológicas, biológicas y químicas (Cembella, 2003; Pavaux *et al.*, 2020). Y por ello, las interacciones son un factor importante en la coexistencia de las complejas asociaciones en dinoflagelados (Yong *et al.*, 2018).

### 1.5 Florecimientos algales nocivos

Los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos recientemente han recibido atención debido a su toxicidad, al aumento de agregaciones celulares densas o colonias adheridas asociadas con eventos dañinos, su abundancia, la extensión biogeográfica y la frecuencia de Florecimientos Algales Nocivos bentónicos (FANb), provocados la eutrofización y por el incremento en la temperatura del agua marina por los efectos de Cambio Climático Global (Granéli *et al.*, 2011; GEOHAB, 2012; Tester *et al.*, 2020). Sin embargo, el término FANb no ha sido aún definido con precisión (Durán-Riveroll *et al.*, 2019). Durante los fenómenos de FANb algunos dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos pueden producir ficotoxinas que provocan impactos negativos en los ecosistemas marinos, y en ocasiones causan mortalidad de la fauna. Frecuentemente son bioacumuladas por algunos organismos y pueden ser transferidas a otros niveles de la red trófica (Shears & Ross, 2009, 2010; Leung *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2020). Además, pueden provocar daños en las actividades socioeconómicas como el turismo, la acuicultura y la pesca, y en última instancia, pueden afectar la salud humana (GEOHAB, 2012; Berdalet *et al.*, 2017). Los géneros productores de toxinas asociados con la formación de FANb que generalmente coexisten en ambientes bentónicos son *Amphidinium*, *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Fukuyoa*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Hachani *et al.*, 2018; Yong *et al.*, 2018; Rhodes & Smith, 2019).

El género *Gambierdiscus* produce maitotoxinas (MTX) y ciguatoxinas (CTX), toxinas responsables de la intoxicación ciguatérica (Yasumoto *et al.*, 1977; Hallegraeff,



1993; Chinain *et al.*, 1999; Litaker *et al.*, 2010; Berdalet *et al.*, 2017). Además, produce otros compuestos bioactivos como los ácidos gambiéricos, gambieroles, gambieróxidos y gambieronas (Nagai *et al.*, 1992; Cagide *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2013; Hoppenrath *et al.*, 2014; Longo *et al.*, 2019). De igual manera, el género *Fukuyoa* se caracteriza por producir CTX y MTX (Laza-Martínez *et al.*, 2016; Leung *et al.*, 2018; Tester *et al.*, 2020). Las proliferaciones del género *Ostreopsis* producen palitoxinas y sus análogos, como las ovatoxinas y ostreocinas, las cuales pueden volatilizarse en el aire y pueden causar padecimientos respiratorios e irritación en la piel, lo que puede afectar gravemente a los pobladores y al turismo en las zonas afectadas (Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; GEOHAB, 2012; Berdalet *et al.*, 2017; Kuzat *et al.*, 2021). Los compuestos producidos por el género *Prorocentrum*, como el ácido okadaico, las dinofisistoxinas y sus análogos están asociado al síndrome conocido como intoxicación diarreica por consumo de mariscos (DSP por sus siglas en inglés). Los miembros de varias especies de este género también producen iminas cíclicas (toxinas de acción rápida) como prorocentrólidos y espiro-prorocentrimina (Nascimento *et al.*, 2016, 2017). Aunque las especies bentónicas de *Prorocentrum* se relacionan con menos frecuencias a eventos tóxicos, en algunas ocasiones especies como *Prorocentrum lima* se han asociado con brotes de DSP (Gayoso *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2005; Moreira-González *et al.*, 2019).

Se ha reportado que algunas especies del género *Coolia* producen cooliatoxina, un análogo de la yessotoxina (YTX) (Holmes *et al.*, 1995; Wakeman *et al.*, 2015; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020); así como análogos de ácido okadaico (AO) y azaspirácidos (AZA1) (Li *et al.*, 2020), un análogo del 44-metilgambierona y gambierona (Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2020, 2021; Yan *et al.*, 2020). El género *Amphidinium* se caracteriza por la producción de macrólidos, policétidos lineales cortos y de cadena larga (Kobayashi *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1991; Cousseau *et al.*, 2020). Los compuestos producidos por *Amphidinium* y *Coolia* podrían afectar negativamente la vida marina, en particular a invertebrados marinos y peces, sin embargo, aún se desconoce su efecto sobre otros organismos y sobre los humanos (Kobayashi *et al.*, 1988; Holmes *et al.*, 1995; Kobayashi & Kubota, 2007; Kobayashi, 2008; Pagliara & Caroppo, 2012; Wakeman *et al.*, 2015; Karafas *et al.*,



2017; Yan *et al.*, 2020).

La respuesta de los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos toxigénicos a condiciones ambientales desfavorables puede reflejarse en las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, como la relación superficie-volumen, mixotrofia, alelopatía y producción de ficotoxinas, entre otras (Legrand *et al.*, 2003). Por lo anterior, es importante considerar el incremento celular de las poblaciones de dinoflagelados toxigénicos, cuyas respuestas pueden tener un impacto sobre los seres humanos y los ecosistemas bentónicos (Accoroni *et al.*, 2012; Carnicer *et al.*, 2015).

Los géneros dominantes en las comunidades bentónicas parecen depender en gran medida de los sustratos bióticos y abióticos y del grado de dispersión por la turbulencia (Tindall & Morton, 1998; Yong *et al.*, 2018). En diferentes estudios se ha asociado el aumento en las densidades celulares de dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos en la zona intermareal rocosa a tapetes de macroalgas y arrecifes coralinos (Vila *et al.*, 2001; Parsons & Preskitt, 2007; Rongo & van Woesik, 2013; Carnicer *et al.*, 2015; Abdennadher *et al.*, 2020). Además, las perturbaciones antropogénicas sobre los arrecifes, como su explotación, el desarrollo costero, la contaminación y la sobrepesca, pueden provocar cambios en las comunidades arrecifales dominadas por algas y proporcionar un sustrato para la proliferación de especies toxigénicas (Bagnis *et al.*, 1988, 1994; Chinain *et al.*, 1999). Se ha relacionado a las intoxicaciones por ciguatera y DSP a gran escala con las perturbaciones causadas en los arrecifes coralinos (Turquet *et al.*, 2001; Rongo & van Woesik, 2013; Skinner *et al.*, 2013; Yong *et al.*, 2018; Tester *et al.*, 2020).

Los sitios más adecuados para la proliferación de dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos son las zonas costeras con pocos metros de profundidad. Los parámetros ambientales que influyen en las densidades celulares son una alta radiación solar, el incremento de la temperatura, una hidrodinámica de oleaje no turbulento, bajas concentraciones de nutrientes, poca profundidad y el tipo de sustrato (Accoroni *et al.*, 2011; Fraga *et al.*, 2012; Pfannkuchen *et al.*, 2012). La alteración de las biopelículas por acción del oleaje y las tormentas facilitan la dispersión de las agregaciones flotantes, provocando un aumento de su abundancia y posteriormente el asentamiento de las células en zonas poco turbulentas (Pfannkuchen *et al.*, 2012;



Carnicer *et al.*, 2015; Kuzat *et al.*, 2021).

Actualmente, se ha observado un incremento en las investigaciones de los FANb en las costas de Baja California Sur, así como en el Golfo de California, la cual es una de las regiones más estudiadas en México (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016a, 2016b). Se han reportado aproximadamente 94 especies de microalgas formadoras de FAN, de las cuales 46 pertenecen al grupo de los dinoflagelados con presencia dentro de la Bahía de La Paz. Los registros de dinoflagelados bentónicos y/o epífitos en la zona del Golfo de California incluyen especies toxigénicas, tales como *Amphidinium cf. carterae*, *Gambierdiscus cf. toxicus*, *Coolia monotis*, *C. malayensis*, *Prorocentrum cf. concavum* Fukuyo, *P. rhathymun* Loeblich III, Sherlye & Schmidt, *Ostreopsis cf. lenticularis* Fukuyo, *O. cf. marina* Faust, *O. cf. siamensis* Schmidt y *O. ovata* (Okolodkov & Gárate-Lizárraga, 2006; Gárate-Lizárraga, 2012; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016a, 2016b, 2019; Sepúlveda Villarraga, 2017; Durán-Riveroll *et al.*, 2019).

Se han establecido cultivos de especies bentónicas y/o epífitas toxigénicas aisladas de Bahía La Paz, Bahía Concepción e Isla San José en la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR), CIBNOR y en el Laboratorio de Dinoflagelados Marinos, CICIMAR, tales como *Amphidinium operculatum*, *Bysmatrum gregarium* (Lombard & Capon) Horiguchi & Hoppenrath, *Coolia canariensis*, *Fukuyoa yasumotoi* (Holmes) Gómez, Qiu, Lopes & Senjie Lin, *Gambierdiscus cf. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland & Tester, *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea & Tester, *Ostreopsis marina*, *O. cf. ovata*, *Prorocentrum hoffmannianum* Faust, *P. concavum* Fukuyo, *P. fukuyoi* Murray & Nagahama, *P. lima* y *P. rhathymun* Loeblich III, Sherley & Schmidt (Morquecho-Escamilla *et al.*, 2016, 2017; Sepúlveda-Villarraga, 2017; Ramos-Santiago, 2021).

En la Bahía La Paz, entre 2011 y 2015 se ha reportado la variación estacional de FANb de *A. cf. carterae* en asociación y coexistencia con *C. cf. monotis* y *C. cf. malayensis*, así como con otros dinoflagelados bentónicos y/o epífitos toxigénicos (Gárate-Lizárraga, 2012; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2019). Asimismo, se ha registrado la presencia de toxinas lipofílicas como AO, AZA, YTX e iminas cíclicas en tejidos de moluscos bivalvos como *Atrina maura* Sowerby I, *Dosinia ponderosa* Gray, y *Megapitaria squalida* Sowerby I, sin embargo, no hay reportes de la asociación de



especies de dinoflagelados con respecto a las toxinas (Leyva-Valencia *et al.*, 2021).

Con esto, uno de los desafíos en el estudio de los dinoflagelados epibentónicos es comprender las implicaciones de los microhábitats que fomentan el crecimiento de especies toxigénicas como vectores y el efecto fuente-sumidero de las ficotoxinas en las redes tróficas (Lewis *et al.*, 1994; Cruz-Rivera & Villareal, 2006; Yong *et al.*, 2018).

### 1.5.1 Género *Amphidinium*

Las especies del género *Amphidinium* son las más abundantes entre los dinoflagelados bentónicos; tienen representantes planctónicos, con distribución cosmopolita y se encuentran presentes en hábitats dulceacuícolas, salobres y marinos. Dentro de este último hábitat, se encuentran en la zona intermareal, sistemas estuarinos y en sedimentos (Dodge & Hart-Jones, 1982; Larsen, 1985; Larsen & Patterson, 1990; Murray & Patterson, 2002; Lee *et al.*, 2003a, 2003b, 2013; Jørgensen *et al.*, 2004a; Gárate-Lizárraga, 2012; Murray *et al.*, 2012).

El género *Amphidinium* pertenece al orden Amphidinales como miembro de la familia Amphidiniaceae (Moestrup & Calado, 2018; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2019). Son dinoflagelados desnudos con anfiesma que no presenta placas tecales (Fensome, 1993; Daugbjerg *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2004, 2012; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009).

Actualmente existen 187 especies registradas en la base de datos de AlgaeBase, con 95 especies aceptadas taxonómicamente y 13 con denominaciones infraespecíficas (Guiry & Guiry, 2021) (Fig. 1). El género presenta gran plasticidad morfológica (Schiller, 1933; Conrad & Kufferath, 1954; Jørgensen *et al.*, 2004a, b; Murray *et al.*, 2004; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009). Sus especies se caracterizan por presentar células dorsoventralmente aplanadas con un epicono pequeño de forma irregular, triangular o con forma de medialuna, desviado hacia la izquierda (Jørgensen *et al.*, 2004a; Hoppenrath *et al.*, 2014; Karafas *et al.*, 2017). Actualmente, el género incluye especies heterótrofas y autótrofas; estas últimas constan de dos clados hermanos separados. El primero es el clado *Herdmanii*, el cual está integrado por *Amphidinium cupulatisquama* Tamura & Horiguchi, *A. herdmanii* Kofoid & Swezy, *A. incoloratum* Campbell, *A. mootonorum* Murray & Patterson y *A.*



*steinii* Lemmerman. El segundo clado, es Operculatum que está integrado por *Amphidinium carterae* Hulburt, *A. fijiensis* Karafas & Tomas, *A. gibbosum* (L. Maranda and Y. Shimizu) Flø Jørgensen & Murray, *A. magnum* Karafas & Tomas, *A. massartii* Biecheler, *A. operculatum* Claparède & Lachmann, *A. paucianulatum* Karafas & Tomas, *A. pseudomassartii* Karafas & Tomas, *A. theodorei* Tomas & Karafas, *A. thermaeum* Dolapsakis & Economou-Amilli, *A. tomasii* Karafas y *A. trulla* Murray, Rhodes, & Flø Jørgensen (Jørgensen *et al.*, 2004a; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Karafas *et al.*, 2017).

Históricamente, las especies de *Amphidinium* han sido identificadas con base en caracteres morfológicos como el núcleo, la púsula, el pirenoide, la forma de los cloroplastos, la mancha ocular (estigma), las escamas y el ciclo de vida (Murray & Patterson, 2002; Lee *et al.*, 2003a, 2013; Murray *et al.*, 2004, 2012; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Karafas *et al.*, 2017). Sin embargo, existe un alto grado de conservación morfológica entre las especies, y la presencia de especies crípticas a menudo conlleva a identificaciones erróneas. Por este motivo, ha sido necesario incluir un enfoque que integre estudios con análisis morfológicos, marcadores moleculares, análisis de toxicidad y actividad biológica, así como la caracterización de sus compuestos bioactivos (Houdai *et al.*, 2004; Baig *et al.*, 2006; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray *et al.*, 2012; Orr *et al.*, 2012; Pagliara & Caroppo, 2012; Lee *et al.*, 2013, 20121; Lauritano *et al.*, 2017; López-Rodríguez *et al.*, 2020).

A partir del estudio de Murray y colaboradores en el 2004, las identificaciones de las especies se han realizado mediante filogenias moleculares con el uso de marcadores moleculares como el ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr) de la subunidad chica (SSU) y la subunidad grande (LSU), particularmente las regiones D1/D6, D1/D2 y D1/D3 que proporcionan información sobre la divergencia a nivel de especie, así como del espaciador transcrito interno (ITS), como los ITS1 y ITS2 para distinguir entre taxones y la estructura secundaria ribosomal para la identificación del cambios de las bases a través del tiempo (Jørgensen *et al.*, 2004a; Murray *et al.*, 2004, 2005, 2012; Zhang *et al.*, 2007; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Orr *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Karafas *et al.*, 2017; Moreira-González *et al.*, 2019). También se han incluido genes de proteínas para las inferencias filogenéticas, en particular la actina



alfa y beta tubulina, *hsp90*, cloroplastidiales (*rbc L* y *psb A*), los marcadores mitocondriales del citocromo mitocondrial (*cob*) y la citocromo oxidasa (*cox1*) (Zhang *et al.*, 2007; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray *et al.*, 2012; Orr *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013), aunque una limitante actual es la cantidad de secuencias disponibles para realizar la comparación entre taxones.

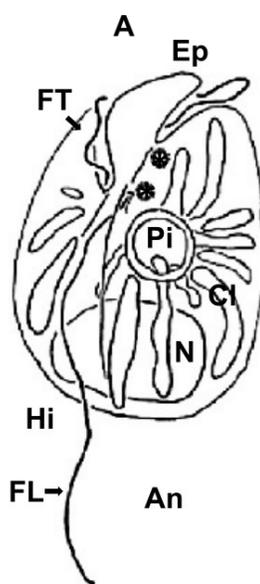


Figura 1. Morfología del género *Amphidinium*.

Tomado de Murray & Patterson (2002). A= ápice, An= antápice, Cl= cloroplasto, Ep= epicono, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, Hi= hipocóno, N= núcleo, Pi= pirenoide, \*= púscula.

Algunas especies de este género producen una gran variedad de compuestos bioactivos. En particular *A. carterae*, *A. gibbosum*, *A. massartii* y *A. operculatum* sintetizan policétidos, clasificados en tres subclases estructurales: macrólidos, policétidos lineales cortos y de cadena larga (Murray *et al.*, 2004, 2012; Cousseau *et al.*, 2020; Mejía-Camacho *et al.*, 2021), que presentan una amplia gama de impactos toxicológicos (Murray *et al.*, 2015; Cousseau *et al.*, 2020). Los compuestos aislados de estas cepas incluyen:

- Andigenoles: inhiben la apertura del canal de  $Ca^{2+}$  de tipo N en las células del neuroblastoma humano IMR-32 (Inuzuka *et al.*, 2012, 2014);
- Anfidininas: presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Kobayashi *et al.*, 1994; Kubota *et al.*, 2015);



- Anfidinocétidos, anfidinólidos y análogos (biopolioles, carteraoles, karatungioles, karlotoxinas, lingshuioles y lutefanoles), y caribenólidos: presentan actividad citotóxica en líneas celulares de tumor de colon humano HCT (Bauer *et al.*, 1995a, 1995b; Kobayashi & Tsuda, 2004; Kobayashi, 2008; Satake *et al.*, 2017);
- Anfidinolactonas: presentan citotoxicidad en células de leucemia murina L1210 y células KB de carcinoma epidermoide humano *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2007a, b; Kobayashi, 2008);
- Anfidiholes: presentan actividad hemolítica, antifúngica y mejoran la permeabilidad de la membrana en la bicapa lipídica (Satake *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1995, 1997; Murata *et al.*, 1999; Houdai *et al.*, 2004; Hieda *et al.*, 2021);
- Anfirioninas: presentan actividad citotóxica sobre las células Cao-2 de carcinoma de colon humano y las células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano, así como actividad promotora de la proliferación celular de la médula ósea (Akakabe *et al.*, 2014; Minamida *et al.*, 2014; Kumagai *et al.*, 2015);
- Iriometeólidos: presentan actividad citotóxica sobre linfocitos B en células humanas DG-75 (Tsuda *et al.*, 2007a, 2007b; Kobayashi, 2008; Oguchi *et al.*, 2008).

Sin embargo, no todas las cepas de *Amphidinium* producen los mismos compuestos y/o muestran las mismas actividades. Del mismo modo, no todos los clones de este género poseen la maquinaria enzimática para la síntesis de los policétidos, la enzima policétido sintetasa (PKS) (Kellmann *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014; Lauritano *et al.*, 2017).

Hasta ahora, no hay reportes relacionados directamente con intoxicaciones humanas o de la bioacumulación de estos compuestos (Botana, 2014). No obstante, se han reportado efectos tóxicos y mortalidad en fauna silvestre durante eventos de FANb (Pagliara & Caroppo, 2012; Boisnoir *et al.*, 2020). Se ha reportado hemólisis sobre eritrocitos, bacterias y microalgas causada por lisados de *Amphidinium* (Echigoya *et al.*, 2005; Kobayashi & Kubota, 2007; Meng *et al.*, 2010). Además, los



lisados inyectados peritonealmente, provocan efectos farmacológicos en ratones albinos, con afectaciones en las contracciones musculares en la zona lumbar, aumento de la respiración, disminución de la movilidad y parálisis durante dos horas, con efectos reversibles (Baig *et al.*, 2006). Por otra parte, los bioensayos de citotoxicidad sobre *Artemia salina* Lineo (Ismael *et al.*, 1999; Baig *et al.*, 2006; Pagliara & Caroppo, 2012; Aquino-Cruz & Okolodkov, 2016; Mejía-Camacho *et al.*, 2021), larvas de erizos de *Paracentrotus lividus* Lamarck, y en copépodos del género *Canthocamptus* sp. Westwood (Boisnoir *et al.*, 2020), reportaron afectaciones en el desarrollo embrionario, inhibición del crecimiento y del movimiento. Las especies de *Amphidinium* se han asociado con efectos ictiotóxicos potenciales sobre peces de las especies *Acanthopagrus australis* Günther, *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker, *Anguilla reinhardtii* Steindachner, *Cephalopholis boenak* Bloch y *Mugil cephalus* Lineo, con daños patológicos, pérdida del equilibrio, baja oxigenación, disminución del flujo sanguíneo y de la frecuencia cardiaca, así como daños en células epiteliales branquiales (Nakajima *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1987; Tindall & Morton, 1998; Murray *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2020).

### 1.5.2 Género *Coolia*

El género *Coolia* pertenece al orden Gonyaulacales en la familia Pyrocystaceae (Guiry & Guiry, 2021); se originó y diversificó hace <136 Ma en el Mesozoico – Cretácico (Leaw *et al.*, 2016). Ha sido estudiado taxonómicamente por plasticidad morfológica y por ser potencialmente toxigénico. Es considerado como un taxón cosmopolita de hábitats marinos, en regiones costeras de aguas tropicales y subtropicales (Besada *et al.*, 1982a; Faust, 1992; Ten-Hage *et al.*, 2000; Penna *et al.*, 2005; Leaw *et al.*, 2010, 2016; Laza-Martinez *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2016).

El primer reporte del género fue *Coolia monotis* Meunier como especie tipo descrita en las costas de Bélgica (Meunier, 1919). A partir de entonces, se han identificado ocho especies: *C. monotis*, *C. tropicalis* Faust (Faust, 1995), *C. areolata* Ten-Hage (Ten-Hage *et al.*, 2000), *C. canariesis* Fraga (Fraga *et al.*, 2008), *C. malayensis* Leaw, Lim & Usup (Leaw *et al.*, 2010), *C. palmyrensis* Karafas, Tomas &



York, *C. santacroce* Karafas, Tomas & York (Karafas *et al.*, 2015), y *C. guanchica* David, Laza-Martínez, Rodríguez & Fraga (David *et al.*, 2020). Las especies han sido descritas de acuerdo con su distribución geográfica, basadas en las morfoespecies, evaluaciones taxonómicas mediante caracteres morfológicos específicos, con filogenias moleculares mediante el uso de marcadores moleculares de ADNr y el ITS, así como por su toxicidad (Leaw *et al.*, 2016).

Morfológicamente, este género se identificó con base en el sistema de placas propuesto por Biecheler (1952). Posteriormente la convención de placas fue modificada por Balech (1956), quien separó las placas y los poros con la fórmula: Po, 3', 0a, 7'' 6c, s, 5''', 0p, 2'''' (Mohammad-Noor *et al.*, 2013). Este patrón fue utilizado y citado por los autores posteriores a Besada *et al.* (1982a), quienes identificaron la primera placa apical, y propusieron la fórmula: Po, 4', 0a, 6'', 6c, s, 5''', 0p, 2'''' , ya que facilita la comparación de las placas homólogas con otras especies de Gonyaulacales (Fraga *et al.*, 2011; Mohammad-Noor *et al.*, 2013). Para la identificación de *Coolia* a nivel de especie se han utilizado varios caracteres morfológicos como las placas del anfiesma y sus ornamentaciones (lisas o areoladas con poros, y poros con perforaciones muy finas), la longitud y diferencias específicas entre las placas primera apical (1'), séptima placa precingular (7''); la relación entre en ancho y longitud de la 7'' y la tercera placa postcingular (3'''), el complejo del poro apical (CPA), y la longitud y ornamentaciones del poro apical (Po) (Faust, 1995; Ten-Hage *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010, 2016; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Momigliano *et al.*, 2013; Wakeman *et al.*, 2015; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Abdennadher *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021) (Fig. 2).

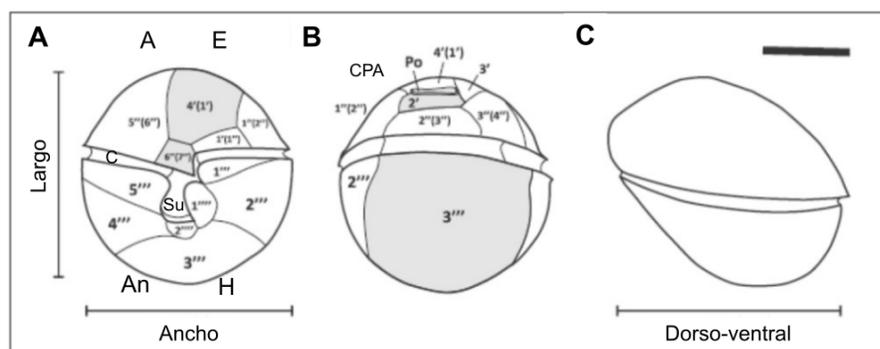


Figura 2. Morfología del género *Coolia*.



Tomado de Leaw *et al.* (2016). Patrón de tabulación de las placas tecales seguido por (Besada *et al.*, 1982) y tabulación kofoidiana en paréntesis. A= ápice, An= antápice, C= cíngulo, CPA= complejo del poro apical, E= epiteca, H= hipoteca, Su= sulco.

Debido a que existe una estrecha relación morfológica, y plasticidad fenotípica inducida por los factores ambientales, es necesario confirmar y discrepar entre especies crípticas y complejos de especies mediante análisis moleculares. Estos se basan en marcadores para reconstrucción de filogenias que utilizan el ADNr, particularmente las regiones D1/D2 y D1/D3, los ITS1/ITS2 y la estructura secundaria ribosomal para distinguir entre especies (Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010, 2016; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Momigliano *et al.*, 2013; Wakeman *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; David *et al.*, 2020; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Abdennadher *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que las especies de *Coolia* producen ficotoxinas y otros compuestos bioactivos, con una toxicidad específica de cada especie (Karafas *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Las cepas de *C. malayensis*, *C. palmyrensis*, *C. santacroce* y *C. tropicalis* han mostrado efectos tóxicos y hemolíticos sobre otros organismos. Se han realizado pruebas de citotoxicidad en líneas celulares humanas y bioensayos peritoneales en ratones, exposición de extractos en invertebrados marinos y peces (Holmes *et al.*, 1995; Rhodes & Thomas, 1997; Rhodes *et al.*, 2000, 2014; Laza-Martinez *et al.*, 2011; Karafas *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015; de Queiroz Mendes *et al.*, 2019; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2021). Por otra parte, no se han reportado efectos tóxicos de las cepas de *C. monotis*, *C. canariensis* y *C. guanchica* (Penna *et al.*, 2005; Laza-Martinez *et al.*, 2011; Karafas *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2018; David *et al.*, 2020). Sin embargo, los compuestos producidos por el género aún no están bien caracterizados (Nascimento *et al.*, 2019).

La cooliatoxina fue el primer compuesto identificado como un poliéter monosulfatado, un análogo de la yessotoxina (YTX) que fue detectado en cepas australianas de *C. tropicalis*, antes identificada como *C. monotis* cuando el género era considerado monotípico, y que presentó actividad neurotóxica (Holmes *et al.*, 1995; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2019). Esta especie presentó efectos



de toxicidad sobre *Artemia salina* y larvas del abulón *Haliotis virgínea* Gmelin (Laza-Martínez *et al.*, 2011; Rhodes *et al.*, 2014; Karafas *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017). Tanto en *C. malayensis* como en *C. tropicalis* se detectaron análogos de YTX, el 44-metil gambieron y gambieron (Wakeman *et al.*, 2015; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2020, 2021; Yan *et al.*, 2020).

Algunas de las cepas de *C. malayensis* producen análogos de YTX, AO y AZA1 únicos de la especie (Li *et al.*, 2020), con efectos potenciales sobre *A. salina* y larvas de erizos de la especie *Heliocidaris crassispina* Agassiz con actividad teratogénica, desarrollo anormal y letalidad (Leung *et al.*, 2017), y efectos en la actividad hemolítica (de Queiroz Mendes *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020). Igualmente, se han detectado interferencias en mecanismos de fosforilación oxidativa mitocondrial y el potencial de membrana en células de hígado de ratones (Varela *et al.*, 2020). Además, se ha propuesto que *C. tropicalis* contribuye potencialmente con los efectos tóxicos causado por ciguatera, ya que muestra efectos sobre nauplios de *A. salina* (Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020), en las cuales causa efectos hemolíticos, disminución de la frecuencia cardíaca y mortalidad sobre larvas de peces *Acanthopagrus schlegelii* y *Cephalopholis boenak* (Yan *et al.*, 2020), y sus extractos presentan efectos sobre el movimiento, el sistema nervioso, el desarrollo larval, causa daño apoptótico, estrés oxidativo y afecta el metabolismo energético en larvas del pez *Oryzias melastigma* McClelland (Gu *et al.*, 2021).

## II. ANTECEDENTES

En la última década los dinoflagelados bentónicos y epibentónicos han atraído la atención de la comunidad científica debido a la aparente expansión geográfica de las especies toxigénicas (GEOHAB, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014; García-Portela *et al.*, 2016). Esta se encuentra relacionada con los cambios ambientales en la columna de agua en los sistemas bentónicos, los procesos asociados con la dinámica poblacional y la capacidad de proliferación de especies poco conocidas (Fraga *et al.*, 2012; García-Portela *et al.*, 2016; Glibert *et al.*, 2018). Con el creciente desarrollo de la ecología química, se ha dilucidado la complejidad de las redes microbianas y las interacciones bióticas y bioquímicas entre las especies presentes en los FANb (lanora



*et al.*, 2012; Pichierri *et al.*, 2017). Por consiguiente, se ha hipotetizado que la alelopatía es uno de los mecanismos que intervienen en la dinámica y que tiene un papel relevante en la formación y el mantenimiento de los FANb, y su relación con los nutrientes (Smayda, 1997; Poulin *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Sin embargo, se sigue cuestionado el papel de la alelopatía en la formación de FANb (Jonsson *et al.*, 2009).

Las ficotoxinas y otros metabolitos secundarios producidos por los dinoflagelados pueden ser un factor clave para explicar su éxito ecológico (Ternon *et al.*, 2018). Además, es importante tomar en cuenta que, dentro de los efectos tóxicos se consideran los efectos alelopáticos, y estos no se limitan únicamente a las ficotoxinas, ya que existen otras moléculas implicadas en estos procesos (García-Portela *et al.*, 2016). La alelopatía también puede favorecer el crecimiento y el desarrollo de otras especies mediante la sucesión, las interacciones presa-depredador, y en el inicio de los florecimientos; además, afectan el crecimiento, el comportamiento y los procesos fisiológicos de sus competidores por los recursos (Legrand *et al.*, 2003; Suikkanen *et al.*, 2011; Hakanen *et al.*, 2014; García-Portela *et al.*, 2016; Xu & Kiørboe, 2018). Por lo tanto, las interacciones mediadas por sustancias aleloquímicas proporcionan información sobre procesos de adaptación, reproducción, sucesión y competencia (Legrand *et al.*, 2003; Granéli & Hansen, 2006; Zhang *et al.*, 2015; García-Portela *et al.*, 2016).

Los estudios sobre las interacciones bióticas en dinoflagelados bentónicos y/o toxigénicos son una minoría (Accoroni *et al.*, 2015; Ben Gharbia *et al.*, 2017), comparados con las investigaciones de los efectos potenciales de sustancias aleloquímicas sobre especies planctónicas. Estos estudios se basan en experimentos en cultivos mixtos (contacto celular), sin contacto celular y con adición de filtrados de exudados celulares (Ji *et al.*, 2012; Monti & Cecchin, 2012; García-Portela *et al.*, 2016; Pichierri *et al.*, 2017; Ternon *et al.*, 2018). Las pruebas con cultivos mixtos proporcionan información sobre la difusión continua de los compuestos alelopáticos de una especie a otra, y los experimentos sin contacto celular y de adición de filtrados permiten estudiar los efectos de las secreciones extracelulares en otras especies, eliminan el factor de la competencia por los recursos como el espacio, la colonización y la limitación por los nutrientes disponibles (Xu *et al.*, 2020).



Los estudios relacionados con las interacciones en dinoflagelados pertenecientes a los géneros *Amphidinium*, *Coolia* y otras especies coexistentes, se han centrado principalmente en evaluar el efecto de los filtrados celulares. Estos estudios iniciaron con las investigaciones de Sugg & VanDolah (1999), quienes evaluaron el efecto del ácido okadaico (0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) y extractos derivados de *P. lima* sobre especies asociadas a la intoxicación ciguatérica como *A. klebsii*, *C. monotis*, *Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fukuyo y *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo, mediante la inhibición del crecimiento y la producción de las fosfoproteínas serina/treonina. La experimentación evidenció que los lisados inhiben el crecimiento de *C. monotis*, la cual se recuperó a corto plazo, y *A. klebsii* presentó un crecimiento rápido sin efectos. Además, estas especies poseen proteínas fosfatasas sensibles al OA y las células vivas absorbieron la toxina a bajas concentraciones ( $\text{IC}_{50} \sim 5 \text{ nM}$ ).

En relación con el análisis y la caracterización de sustancias aleloquímicas, Ji *et al.* (2012), identificaron cuatro compuestos potencialmente alelopáticos derivados de *A. carterae*, identificados como butilhidroxitolueno ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ), 1-cloro(difluoro)metoxi-4-nitrobenzeno ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3\text{F}_2\text{NCl}$ ), citrato de tributilo ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_7$ ) y ftalato de butil bencilo ( $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ). Observaron que los filtrados de los cultivos en fase estacionaria de *A. carterae* inhiben el crecimiento y provocan lisis celular en la diatomea *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve y el dinoflagelado *Prorocentrum micans* Ehrenberg. Por el contrario, en el dinoflagelado *Scrippsiella trochoidea* (Saha *et al.*) Loeblich III y en la haptofita *Isochrysis galbana* Parke, la inhibición fue menor.

Paul *et al.* (2021) realizaron un estudio similar de los efectos de *A. carterae* sobre otras especies de fitoplancton adyacentes en ambientes intermareales rocosos de la costa occidental de India en el Mar Árabe. Los autores observaron una fuerte inhibición del crecimiento de *S. costatum* con modificaciones en el número de cadenas y en *Bysmatrum caponii* Faust & Steidinger se observaron cambios morfológicos y pérdida de movimiento al estar expuesto a concentraciones altas del dinoflagelado (75 y 100%), sin embargo, se observó un efecto estimulante en el crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco. Estos resultados ejemplifican la diversidad de respuestas que cada especie puede tener hacia un mismo competidor.

Se ha reportado que los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo las



interacciones alelopáticas de *A. carterae* afectan la fotosíntesis. En particular, en el estudio de Peltekis (2020) se detectó la inhibición de la actividad y tasa fotosintética en *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimda mediante la disipación del gradiente de protones electroquímicos a través de los tilacoides, posiblemente derivado de la producción de anfidiolos que forman poros en las membranas biológicas. *Amphidinium carterae* secreta compuestos que le confieren una ventaja competitiva y posiblemente cada especie produce sustancias aleloquímicas específicas.

En el género *Coolia*, Monti & Cecchin (2012), se han realizado experimentos con diferentes intensidades de luz (10, 100, 400, 650  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), así como con filtrados celulares obtenidos en la fase exponencial y la fase de senescencia de *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo sobre *C. monotis* en proporciones de abundancia 1:2 y 1:10. Los autores observaron efectos débiles de inhibición (20%) en el crecimiento de *C. monotis* en la proporción 1:2 en las intensidades de luz más elevadas. Estos resultados sugieren que *O. cf. ovata* podría provocar efectos alelopáticos sobre otros dinoflagelados, que a menudo coexisten en ambiente marino; además la intensidad de luz parece ser un factor clave para su distribución y aumento de biomasa celular.

En comparación con los estudios enfocados en filtrados celulares, las experimentaciones con cultivos mixtos son escasas para los géneros de este estudio. Sin embargo, con el incremento de los FANb producidos por el género *Ostreopsis* en las costas del Mediterráneo, se retoma la importancia de conocer la respuesta fisiológica de las especies del microfitobentos que ocupan el mismo nicho ecológico, como las diatomeas y los dinoflagelados (Accoroni *et al.*, 2015; Pichierri *et al.*, 2017; Ternon *et al.*, 2018; Pavaux *et al.*, 2020). En este contexto, de manera general, García-Portela *et al.* (2016), evaluaron las interacciones alelopáticas de dos cepas de *Ostreopsis* (*O. sp.* “tipo Lazarote” y *O.cf. ovata*) con especies bentónicas toxigénicas y no toxigénicas. En estos experimentos se observó una disminución en el crecimiento y movimiento de *C. monotis* expuesta a filtrados diluidos de *Ostreopsis sp.* “tipo Lazarote”. Efectos similares se presentaron en los experimentos de capacidad de adherencia, en donde *G. exentricus* presentó lisis celular y desprendimiento de la teca, y un efecto positivo sobre *Prorocentrum hoffmannianum* Faust que mostró un incremento en el número de células adheridas.



Es importante considerar que los diferentes patrones de crecimiento en cultivos mixtos y los cambios en la concentración de producción de toxinas secretadas por *O. cf. ovata* con *C. monotis* pueden ser una respuesta a la competencia por nutrientes y que la secreción de toxinas no está involucrada en los procesos de alelopatía (Pezzolesi *et al.*, 2011, 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

En zonas costeras, la proliferación de dinoflagelados bentónicos y/o epífitos toxigénicos pueden formar FANb y pueden afectar a organismos marinos herbívoros que se alimentan por filtración y que son capaces de acumular ficotoxinas. Estas toxinas pueden transferirse a otros niveles tróficos a través de la depredación y pueden bioacumularse en los depredadores superiores consumidos por los humanos. Se ha evidenciado una influencia importante de los FANb en la industria pesquera y la maricultura, ya que han causado importantes pérdidas económicas. En los eventos de FANb, debido a la termoestabilidad de las ficotoxinas, cada género de microalga es responsable de problemas específicos, sin embargo, en casos raros pueden conducir a la muerte de organismos marinos. Son pocos los casos reportados de FANb causados por especies de *Amphidinium* y *Coolia*; posiblemente esto se deba a que estos fenómenos regularmente son incoloros o suceden en el fondo marino y no son visibles a simple vista.

Actualmente ha aumentado el interés en la investigación sobre los FANb en las costas de Baja California Sur y en otras zonas del Golfo de California, el cual es una de las regiones más estudiadas en México. Se han reportado varias especies de dinoflagelados epibentónicos de los géneros *Amphidinium*, *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, que, de acuerdo con la literatura, son potencialmente toxigénicos. Varias de estas especies se han aislado y cultivadas para corroborar su identificación específica y su toxicidad.

Uno de los aspectos que se desconoce sobre los FANb de estas especies, son las interacciones bióticas entre ellas. La coexistencia de especies puede involucrar la producción de sustancias aleloquímicas. Las sustancias aleloquímicas pueden perturbar diversos procesos fisiológicos de un organismo, como la división celular, la



permeabilidad de las membranas, la absorción de iones y agua, la estructura y la morfología celular, la respiración, la fotosíntesis, la actividad enzimática, la transducción de señales y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Los compuestos bioactivos producidos por las especies de *Amphidinium* y *Coolia* han sido poco explorados, así como los efectos provocados por las sustancias aleloquímicas que producen al estar en interacción con las especies en los ecosistemas naturales. Conocer la interacción entre especies nos permitirá comprender de mejor manera la dinámica de los FANb. Derivado de esto, en este estudio se investigaron las interacciones alelopáticas entre *A. thermaeum* y *C. malayensis* en condiciones de laboratorio, géneros que comúnmente coexisten en los ecosistemas bentónicos de la Bahía La Paz, además de ser residentes casi todo el año en esta bahía.

## VI. HIPÓTESIS

Las interacciones alelopáticas y la competencia en los ecosistemas epibentónicos promueven la dominancia de algunas especies que coexisten en ambientes naturales y son limitadas por el sustrato. Se ha reportado que algunas especies del género *Amphidinium* producen una gran variedad de metabolitos secundarios que son potencialmente tóxicos y producen efectos líticos, citotóxicos, apoptóticos, así como daños en el metabolismo celular. Por estos motivos, en condiciones de cultivo *in vitro* se observará el efecto alelopático de una cepa de *Amphidinium* (s/i 74) sobre una cepa del género *Coolia* (s/i 75), lo que promoverá la disminución en el crecimiento, cambios en la morfología y lisis celular de la segunda, al mantenerlas en cultivos mixtos.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar las interacciones alelopáticas de dinoflagelados epibentónicos de los géneros *Amphidinium* y *Coolia* en condiciones de cultivo.



## 5.2 Objetivos específicos

- 1) Confirmar la identidad taxonómica de las cepas de *Amphidinium* y *Coolia* mediante análisis morfológicos y moleculares por medio de la amplificación del gen ribosomal 28S.
- 2) Determinar las curvas y tasas de crecimiento de los dinoflagelados en cultivo.
- 3) Evaluar los cambios en las densidades celulares y las tasas de crecimiento de los dinoflagelados en cultivos mixtos, sin contacto y expuestos a filtrados celulares.
- 4) Documentar los cambios morfológicos, ultraestructurales y reproductivos de las especies en cultivos mixtos, sin contacto y expuestos a filtrados celulares.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas

#### 6.1.1 Establecimiento de los cultivos

Se trabajó con cultivos monoclonales no axénicos de las cepas de los géneros *Amphidinium* y *Coolia* aisladas de la Bahía de La Paz con las siguientes claves: s/i 73, s/i 74, s/i 75 y s/i 76, la cuales se encuentran depositadas en la Colección de Dinoflagelados Marinos del Laboratorio de Docencia 1 del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (Tabla 1).

Tabla 1. Información del aislamiento de *Amphidinium* y *Coolia*

Género	Cepa	Lugar y año de aislamiento	Aislado por
<i>Amphidinium</i>	s/i 73	Bahía de La Paz, B.C.S. "El conchalito" (24° 08' 38.4'' N, 110° 20' 41.99 '' W). Marzo - 2019	Leyberth Fernández
	s/i 74	Bahía de La Paz, B.C.S. "El conchalito" (24° 08' 38.4'' N, 110° 20' 41.99 '' W). Marzo - 2019	Leyberth Fernández
<i>Coolia</i>	s/i 75	Bahía de La Paz, B.C.S. "El Mogote" (24° 13.256' N, 110° 36.143' W). Mayo - 2017	Ignacio Leyva
	s/i 76	Bahía de La Paz, B.C.S. "Playa Balandra" (24° 33.054' N, 110° 33.277' W). Mayo - 2017	Ignacio Leyva



## 6.2 Medio y condiciones de cultivo

Las cepas se mantuvieron en medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001) con la adición de extracto de lombricomposta (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015). El medio de cultivo se preparó con agua de mar esterilizada por filtración (0.22  $\mu\text{m}$ ), a una salinidad de 34. Las vitaminas se esterilizaron por filtración y el resto de los nutrientes por calor húmedo (121 °C, 15 lb de presión por 15 min) a un pH de 7.5. Los cultivos se incubaron en un cuarto con fotoperiodo de luz y oscuridad de 12:12 h, iluminado con luz blanca fría a 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 6.3 Identificación morfológica y determinación taxonómica

Se realizaron observaciones de los organismos en cultivo y se identificaron los caracteres morfológicos y reproductivos en microscopía fotónica (GEOHAB) y electrónica de barrido (MEB). En cada tratamiento se tomaron fotografías y se realizaron mediciones.

Para la identificación de las especies se utilizaron claves y bibliografía especializada para el género. Las características morfológicas consideradas para *Amphidinium* fueron tamaño celular, forma, forma del epicono e hipocono, forma de la inserción flagelar y ventral, la ubicación del pirenoide, la presencia de púsula y movimiento metabólico (Murray & Patterson, 2002; Murray *et al.*, 2004, 2012; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Karafas *et al.*, 2017). En el caso de *Coolia*, los caracteres morfológicos considerados fueron: la forma de la célula, el tamaño celular, diferencias específicas entre las placas primera apical (1'), séptima placa precingular (7''), la tercera placa postcingular (3'''), el complejo del poro apical y las placas sulcales.

### 6.3.1 Microscopía fotónica (GEOHAB)

Las identificaciones se realizaron cuando el cultivo se encontraba en crecimiento exponencial, en un microscopio invertido Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). Para la observación se prepararon laminillas en fresco. Se tomaron alícuotas de los cultivos, se colocaron en portaobjetos y se observaron con los objetivos 20, 40 y 63. Se obtuvieron imágenes con una cámara digital AxioCam Cc



5 (CarlZeiss, Göttingen, Alemania).

### 6.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para las observaciones en MEB se siguieron los métodos propuestos por Gómez-Lizárraga *et al.* (2019) para el género *Coolia* y Pérez-López *et al.* (2020) para el género *Amphidinium*. Se concentró y se fijó 1 mL de muestra de los cultivos. Las muestras de *Amphidinium* se fijaron con 1 mL de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) y las células de *Coolia* con glutaraldehído al 2%. Se dejaron 90 min en oscuridad. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril y se centrifugaron (Thermo Scientific™ Sorvall™ Legend™ XTR) a 800 x g, 5 °C durante 4 min, eliminando el sobrenadante en cada paso. Se realizaron deshidrataciones consecutivas con etanol (EtOH) a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 99% para *Amphidinium*, Para *Coolia* las concentraciones fueron de 10, 30, 50, 70, 90 y 99%. Posteriormente se resuspendieron suavemente durante 1 min y se centrifugaron a 800 x g a 4°C durante 6 min. Las muestras se colocaron en portamuestras metálicos y se dejaron en un desecador con gel de sílice durante 48 h. Posteriormente fueron recubiertas con oro en un ionizador (Ion Sputter JEOL-JFC-1100, Japón) durante 5 min. Estas preparaciones fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido tipo JEOL JMS-6360-LV en el Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido (SAMEB) en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML), UNAM.

### 6.3.3 Ciclo de vida

Se describieron las etapas de los ciclos de vida a partir de los cultivos monoclonales. Se registró el tamaño de las células, y se detectaron las etapas de reproducción (sexual y asexual), de las cuales derivaron la formación de quistes de reproducción, división celular y formación de agregados mucilaginosos.

## 6.4 Identificación molecular

### 6.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó utilizando el kit Quick-DNA™



Miniprep Plus Kit ZYMO RESEARCH (California, E.U.A). Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del proveedor: En cada tubo Eppendorf se mezclaron 200  $\mu$ L de cultivo celular concentrado y 20  $\mu$ L de proteinasa K, se incubaron a 55°C por 10 min en un Thermoblock (VWR® Mini Block Heater, E.U.A). Enseguida, se agregó un volumen 1:1 de solución Genomic Binding Buffer a la muestra digerida. La muestra se transfirió a una columna de filtración, se centrifugó a 12 000 x g por un minuto y se recuperó la columna en un tubo nuevo. A esta se le agregarán 400  $\mu$ L de DNA Pre-Wash Buffer y se centrifugó de nuevo por un minuto, dos veces cambiando los volúmenes de DNA Pre-Wash Buffer a 700 y 200  $\mu$ L. Finalmente, para diluir el ADNg, la columna se transfirió a un tubo nuevo, agregando 50  $\mu$ L de DNA Elution Buffer, se incubaron durante cinco minutos, se centrifugaron por un minuto para recuperar el ADNg y se congeló a -20 °C hasta su uso.

#### *6.4.2 Amplificación de fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa*

Los fragmentos específicos del ADNg se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener secuencias parciales de la región 28S del ADNr, como las utilizadas en el estudio de Hosoi-Tanabe *et al.* (2006). Para ello se utilizaron los cebadores DIF (5' -ACCCGCTGAATTTAAGCATA- 3') y D2R (5' -CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA- 3') (Scholin *et al.*, 1994). Se utilizó el kit Thermo Scientific TM Dream Taq Green PCR Mix (2X). Se prepararon mezclas de 25  $\mu$ L siguiendo las instrucciones del proveedor: Cada reacción contenía 1  $\mu$ L de ADN, 1  $\mu$ L de cebador A (Forward), 1  $\mu$ L de cebador B (Reverse) (1 – 10  $\mu$ M), 12.5  $\mu$ L Dream Taq Green PCR Mix de Taq DNA polimerasa y 9.5  $\mu$ L de agua mili-Q. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador iCycler PCR System (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 1:10 min, extensión a 72 °C por 1:10 min y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Para comprobar la longitud del producto de PCR se preparó en un gel de agarosa al 1.5 % con de 3  $\mu$ L de cada muestra, 2  $\mu$ L de buffer de carga, 1  $\mu$ L de GelRed



(Biotium) y se corrió en una cámara de electroforesis con TBE 1X durante 30 min a 70 v. Las bandas de los productos de las amplificaciones en los geles se visualizaron en un transiluminador con fotodocumentador (BIORAD PowerPac Basic, E.U.A.).

#### 6.4.3 Secuenciación

La purificación y secuenciación en ambas direcciones se realizó utilizando el servicio de secuenciación de MACROGEN en Corea (<https://dna.macrogen.com/>).

#### 6.4.4 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas (forward y reverse), fueron editadas y ensambladas con el programa Sequencher v4.1.4 para obtener una secuencia consenso que se utilizó para corroborar la identidad taxonómica en un alineamiento local básico con la herramienta de búsqueda básica en la página Nucleotide BLAST del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Consecutivamente, se descargaron las secuencias de los géneros de estudio previamente publicadas (Anexo 1 y 2). Como grupos externos filogenéticamente relacionados se utilizaron secuencias de los géneros *Karlodinium* y de *Heterocapsa* para *Amphidinium*, y para *Coolia* se utilizaron secuencias del género *Ostreopsis* (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Leaw *et al.*, 2010, 2016; Murray *et al.*, 2012; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Karafas *et al.*, 2017; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020). Se realizaron matrices con secuencias de especies de mismo género que fueron editadas en los programas BioEdit v.7.2.5 y MEGA-X v.10.1.8. El alineamiento múltiple de las secuencias tipo MUSCLE se realizó en el servidor de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Madeira *et al.*, 2019). La transformación de las matrices a los formatos fasta, nexus y phylip se realizó en el programa Mesquite v.3.61., que sirvieron para llevar a cabo los análisis de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) de las inferencias filogenéticas. Para encontrar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó con la matriz de datos se utilizó el programa JModelTest 2.1.10 v20160303 (Darriba *et al.*, 2012) con el criterio de información Akaike (AIC), a partir del cual se infirió el modelo general de tiempo reversible con la gamma y la proporción de sitios invariables (GTR



+ G+ I). El análisis de MV se obtuvo con el programa raxmlGUI 2.0 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Edler *et al.*, 2021), bajo el algoritmo de búsqueda heurística (ML + thorough bootstrap), con 100 corridas y 1000 réplicas de secuencias aleatorias. El árbol consenso (Bootstrap+consensus) se realizó con un bootstrap de 1000 réplicas. El análisis de IB se realizó en el programa MrBayes v 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). Para en análisis de IB se utilizó un modelo de sustitución de salto reversible (nst = 6) y una tasa de sustitución con distribución gamma (rates = invgamma). Se realizó el análisis por duplicado un total de 10,000,000 generaciones (ngen = 10000000) con un muestreo de los árboles cada 1000 generaciones (samplefreq = 1000).

## 6.5 Procesamiento de imágenes

Las imágenes obtenidas por microscopía se transformaron a formato jpg en el programa ZEN 2.3 lite. Los árboles filogenéticos obtenidos de los programas se visualizaron y editaron en el portal en línea iTOL (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/v>). Posteriormente, las imágenes se editaron en el programa INKSCAPE 1.0 (<https://inkscape.org/es/>).

## 6.6 Curvas de crecimiento

### 6.6.1 Curvas en cajas multipozos

Se realizaron curvas de crecimiento en placas multipozos (VWR® Tissue Culture Plates, ciudad, China) con volúmenes de 240  $\mu\text{L}$  y 1 mL de medio de cultivo GSe. En cada pozo se inoculó una célula de cada cepa. Para los volúmenes de 240  $\mu\text{L}$  se realizaron 15 réplicas y en los pocillos de 1 mL se realizaron ocho réplicas. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con mesa de agitación orbital INO 900M a 100 rpm y sin agitación en las condiciones antes mencionadas, con una iluminación con luz blanca fría a  $200 - 350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Se realizaron los conteos de las células vivas de todo el pozo cada tercer día. Cuando el cultivo presentó mayor densidad celular, se realizaron fotografías por capas para estimar la densidad celular de todo el cultivo. En ambas curvas de crecimiento se



registraron los cambios en el tamaño celular, morfología y los estadios del ciclo de vida. Se calculó el promedio y la desviación estándar de los conteos. Los promedios de cada conteo fueron graficados para obtener la curva de crecimiento y determinar las fases de crecimiento de las cepas.

### 6.6.2 Curvas en matraces Erlenmeyer

Para la determinación de las curvas de crecimiento en matraces se prepararon inóculos de las cepas de *Amphidinium thymaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75). Cada aislado fue inoculado a una densidad promedio de  $548 \pm 110$  cel mL<sup>-1</sup> y  $682 \pm 50$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente en volúmenes de 300 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL, por triplicado con medio GSe con las características antes mencionadas. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con mesa de agitación orbital INO 900M a 100 rpm con fotoperiodo de luz y oscuridad de 12:12 h, iluminados con luz blanca fría a  $90 - 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Posteriormente se realizaron estimaciones mediante conteos celulares. Para la cepa s/i 74 cada segundo día se tomaron muestras de los cultivos y para la cepa s/i 75 cada cuatro días. En ambos casos se tomaron 2 mL de cultivo hasta la fase de decaimiento y se fijaron con Lugol ácido al 1% (Thronsdén, 1979). Los conteos se realizaron en una cámara Sedgwick-Rafter de 1 mL en un microscopio óptico invertido Axio Vert. A1.

### 6.6.3 Tasa de crecimiento y tiempo de generación

La tasa de crecimiento ( $K$ ) para cada cepa se determinó a partir de la fase de crecimiento exponencial. Para ello se utilizó la ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$K = \frac{\text{Ln}(C_2 - C_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde:  $C_2$  y  $C_1$  representan el número de células por mililitro final e inicial, respectivamente,  $t_2$  y  $t_1$  corresponden al tiempo final e inicial del crecimiento exponencial en días;  $K$  es el resultado expresado en número de divisiones por día.

Se calculó el tiempo de generación ( $t_g$ ) a partir de la tasa de crecimiento mediante la ecuación propuesta por Guillard (1973):



$$t_g = 0.301/K$$

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento de ambas cepas, se identificaron la fase de aclimatación, exponencial, estacionaria y de decaimiento.

## 6.7 Experimentación de interacciones alelopáticas

### 6.7.1 Cálculos de biovolumen de las cepas

Durante el desarrollo de los cultivos se realizaron mediciones del tamaño celular de ambas especies, a través del cálculo del biovolumen con la fórmula propuesta por Hillebrand *et al.* (1999) con la modificación de Sun & Liu (2003):

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot a \cdot b \cdot c$$

Donde *a* corresponde a la longitud en vista ventral, *b* es el ancho en vista lateral, *c* representa la altura y *V* es el resultado expresado en  $\mu\text{m}^3$  del biovolumen.

### 6.7.2 Cultivos madre para experimentos de interacción

Se realizaron cultivos de los aislados s/i 74 y s/i 75 en medio GSe en matraces de 1 L, con un volumen de cultivo de 600 mL. Los cultivos monoclonales se mantuvieron en las mismas condiciones mencionadas en el apartado 6.2. A partir de estos cultivos se tomó el inóculo en la fase exponencial tardía para realizar los experimentos de interacción.

### 6.7.3 Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular

#### 6.7.3.1 Cultivos mixtos en cajas multipozos

Se realizaron cultivos monoclonales de las cepas s/i 74 y s/i 75. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase exponencial tardía, se tomaron muestras para iniciar los cultivos de contacto celular.

Los cultivos se realizaron en cajas de cultivo celular de 96 pozos con volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  de medio GSe. Se inocularon con densidades iniciales en proporciones de biovolumen 1:1 (6 células de *A. thermaeum*: 1 célula de *Coolia*), 1:2 (6 células de *A. thermaeum*: 2 células de *C. malayensis*) y 2:1 (12 células de *A. thermaeum*: 1 célula



de *C. malayensis*) como cultivos de ambas especies con contacto entre sí. Cada proporción se realizó con 10 réplicas. Para el control se utilizaron las mismas concentraciones celulares en cultivos monoalgales para descartar una posible autoinhibición. Se realizaron conteos celulares de todo el pozo cada segundo día durante 14 días para determinar los cambios en las densidades celulares bajo un microscopio invertido Axio Vert. A1 a 200x.

### 6.7.3.2 Matrazes de alelopatía

Los matraces de alelopatía fueron diseñados a partir del modelo propuesto por Paul *et al.* (2013) y Ternon *et al.* (2018), tipo cámara de cultivo (Fig. 3). Estos constan de dos recipientes de vidrio en forma tubular de 25 cm de largo y una base ligeramente cóncava, una apertura con el borde plano de 5.5 cm en la parte media y un cuello redondo de 2.5 cm en la parte superior para un volumen final de 500 mL. Este modelo se eligió porque permitió cultivar especies epibentónicas. Ambos recipientes, se unieron con empaques de teflón y una abrazadera de plástico atornillable, para garantizar su sellado a prueba de fugas. La apertura superior se utilizó para llenar con medio e inocular en cada tratamiento. Todos los recipientes fueron esterilizados bajo las mismas condiciones que se menciona en el apartado 6.2 y antes de su uso, se ensamblaron en una campana con mechero.



Figura 3. Matraz de alelopatía, compuesto de dos cámaras tubulares.



### 6.7.3.3 Cultivos mixtos en matraces de alelopatía

Se realizaron los experimentos para los cultivos en contacto celular en volúmenes de 300 mL por triplicado en medio GSe para analizar los efectos de la dominancia entre ambas especies. Se diseñaron dos experimentos de cultivos mixtos de *A. thermaheum* (s/li 74) y *C. malayensis* (s/li 75), iniciando con una densidad celular en la proporción 1:1 de  $2.72 \times 10^3 \pm 386 \text{ cel mL}^{-1}$  y  $267 \pm 85 \text{ cel mL}^{-1}$ , respectivamente. En la proporción 1:2 las densidades utilizadas fueron  $3.52 \pm 5.15 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  y  $1.18 \times 10^3 \pm 143 \text{ cel mL}^{-1}$ , respectivamente. Se inocularon ambas especies con las proporciones de cada tratamiento para su interacción directa. Como controles se utilizaron las mismas concentraciones celulares en cultivos monoclonales, para descartar un efecto de autoinhibición. Los experimentos se mantuvieron durante 14 días.

### 6.7.4 Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular

#### 6.7.4.1 Cultivos sin contacto celular en matraces de alelopatía

Se realizaron los experimentos para los cultivos sin contacto celular en volúmenes de 300 mL por triplicado en medio GSe para analizar los efectos de la producción de sustancias aleloquímicas sin contacto celular entre las especies. Estos experimentos se llevaron a cabo con los cultivos en fase exponencial tardía de *A. thermaheum* y *C. malayensis* en las proporciones de biovolumen 1:1 y 1:2. En cada experimento se colocó una membrana de fibra de vidrio GF/F Whatman™ de  $2.5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro en la parte media para evitar el contacto celular entre las especies.

En la proporción 1:1, cada cámara se llenó con un volumen final de 150 mL, se colocó la membrana de fibra de vidrio GF/F Whatman™ de  $2.5 \mu\text{m}$ . Las densidades celulares iniciales de *A. thermaheum* fueron de  $3.13 \times 10^3 \pm 329 \text{ cel mL}^{-1}$  y de *C. malayensis*  $810 \pm 107 \text{ cel mL}^{-1}$ . El experimento tuvo una duración de 10 días debido a que la membrana se rompió por el contacto prolongado con el cultivo. Considerando tal efecto, se decidió cambiar a una malla de nylon de  $5 \mu\text{m}$  en la proporción 1:2 (*A. thermaheum*: *C. malayensis*).

En el experimento de la proporción 1:2, cada cámara se llenó con un volumen



final de 150 mL, se colocó una membrana de nylon con un poro de tamaño de 5  $\mu\text{m}$ . Las densidades celulares iniciales de *A. thermaheum* fueron de  $1.36 \times 10^3 \pm 262$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y de *C. malayensis*  $2.07 \times 10^3 \pm 206$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Los cultivos se mantuvieron durante 14 días.

#### 6.7.5 Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados

##### 6.7.5.1 Cultivos con filtrados celulares en matraces de alelopatía

Se realizaron los experimentos para los cultivos sin contacto celular en volúmenes de 300 mL por triplicado, para determinar la actividad alelopática entre las especies inducida por sustancias químicas o exudados celulares liberados en el medio de cultivo como parte de su metabolismo.

Las especies se cultivaron en la fase exponencial tardía. Estos cultivos se centrifugaron a  $3,500 \times g$  durante 20 min a  $20^\circ\text{C}$  para obtener un sobrenadante libre de células. Los sobrenadantes de *A. thermaheum* y de *C. malayensis* se filtraron a través de una membrana estéril de fibra de vidrio GF/F Whatman™ de  $0.7 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y posteriormente a través de una membrana de fibra de vidrio Ahlstrom-Munksjö de  $0.4 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, con una bomba manual en condiciones estériles para obtener los filtrados celulares. Los filtrados se ajustaron a un pH de 7.5. Posteriormente, se realizaron los experimentos en los matraces de alelopatía con exposición a los filtrados celulares de *A. thermaheum* y *C. malayensis* a una concentración de 50 y 100% del volumen final. Los filtrados celulares con una concentración de 50% se obtuvieron a partir de una densidad celular total de  $1.06 \times 10^5$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *A. thermaheum* y de  $1.13 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *C. malayensis*; mientras que los filtrados al 100% se obtuvieron de una concentración celular total de  $9.77 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *A. thermaheum* y de  $1.30 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$  de *C. malayensis*. Se inocularon con la cepa de *C. malayensis* con una densidad celular inicial de  $948 \pm 164$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y  $1.22 \times 10^3 \pm 244$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. El tratamiento control fueron los monocultivos, a los cuales se les agregó el mismo volumen de sus propios filtrados celulares y otro control consistió en agregar medio de cultivo GSe. El experimento tuvo una duración de 14 días.



### 6.7.6 *Conteos y observaciones morfológicas*

Los datos de las densidades celulares se obtuvieron tomando 5 mL de cada lote experimental; estos se fijaron con Lugol ácido y se realizaron conteos celulares en una cámara de Sedgewick-Rafter en un microscopio invertido Axio Vert. A1 a 200x. Los efectos de cada tratamiento se registraron mediante observaciones de los cambios morfológicos de las células vivas que se describieron y documentaron mediante el registro fotográfico. Se registró el tamaño de las células, los detalles del proceso reproductivo, las evidencias de las células lisadas, las deformaciones y/o la pérdida de movilidad.

### 6.7.6 *Pruebas estadísticas*

Para establecer las diferencias entre los tratamientos control y los efectos del tratamiento en interacción se realizó una comparación de las medias mediante un análisis de varianza (ANDEVA) ( $\alpha = 0.05$ ). Para establecer la normalidad de los datos se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, y una prueba *a posteriori* de Kruskal Wallis en la paquetería de acceso libre de R y RStudio v4.0.5 (<https://www.rstudio.com/>).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 *Identificación morfológica y determinación taxonómica*

#### 7.1.1 *Amphidinium sp.*

Cepa: s/i 73

Células fotosintéticas biflageladas con forma ovoide a elipsoidal en vista ventral (Figs. 4A-B, 5A-B), dorsoventralmente comprimidas, más anchas en la parte media y en el extremo posterior antapical (Figs. 4C-D, 5C-D). Longitud de 20 a 50  $\mu\text{m}$  ( $\pm 7.72$ ,  $n = 46$ ) y de 14 a 32  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 4.41$ ,  $n = 46$ ). La relación largo-ancho (L/A) es de 1.15 a 2.20  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.17$ ,  $n=46$ ). El epicono es aplanado en la parte apical con una longitud de 3 a 10  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2.17$ ,  $n= 25$ ) y está ubicado en la parte central de la célula. En vista ventral presenta forma triangular con una base plana y la punta está desviada



hacia la izquierda. El ángulo de la punta anterior derecha es casi de  $90^\circ$  y el ángulo de la punta izquierda es de aproximadamente  $30^\circ$ . El epicono se sobrepone ligeramente hacia el lado anterior del hipocono. El hipocono es más ancho en la parte media de la célula con forma elíptica a redonda; en la mayoría de los casos es simétrico, en raras ocasiones, no. El cíngulo es descendente ligeramente desplazado con forma de V, del cual deriva el flagelo transversal en forma de espiral. El flagelo longitudinal liso nace de la inserción flagelar del sulco, localizada a un tercio de distancia de la parte antapical y a la derecha del eje central, al inicio es estrecho y conforme se acerca a la parte posterior del antápice se hace más ancho (Figs. 4A-E, 5A-H). Presenta múltiples cloroplastos lobulados y alargados de coloración dorado-marrón que irradian hacia la periferia y están dispersos en la parte central de la célula. Las púsulas son globulares, presenta gránulos incoloros dispersos en toda la célula. El núcleo está en la parte posterior de la célula y tiene una forma ovalada o de medialuna. Tiene una inclusión globular redonda en la parte media, ubicada arriba del núcleo de coloración naranja (estigma), que en ocasiones no se observa (Figs. 4A-E). No se observaron pirenoides.

La división asexual es por fisión binaria y se presenta en células con movimiento. La división comienza en la parte antapical y termina de dividirse en dos epiconos, el sulco permanece durante el proceso mitótico (Figs. 4F-I, 5I-J). En raras ocasiones se observan células con forma y movimiento ameboide mediante la extensión de los epiconos, en el cual existe un paso del protoplasma, proceso posiblemente derivado de la conjugación sexual (Figs. 4J-L). Posteriormente, la célula recupera su forma original. No se observaron planocigotos biflagelados, células inmóviles, ni la formación de quistes de reproducción. Tampoco se observó movimiento metabólico. La cepa produce sustancias mucilaginosas, las cuales le confieren la capacidad de adherirse al sustrato y estar embebidas dentro de estas (Figs. 4M-O).

### 7.1.2 *Amphidinium thermaeum* Dolapsakis & Economou-Amilli 2009 (156, Figs. 1-47)

Cepa: s/i 74

Células fotosintéticas biflageladas con forma variable, ovaladas, redondeadas u ovoides en vista ventral, ligeramente comprimidas dorsoventralmente, en ocasiones



la parte media de la célula es más ancha que los extremos anterior y posterior (Figs. 6A-G, 7A-C). Longitud de 10 a 31  $\mu\text{m}$  ( $\pm 4.23$ ,  $n = 89$ ) y de 7 a 24  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 3.4$ ,  $n = 89$ ), la relación L/A es de 0.9 a 2  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.28$ ,  $n = 89$ ). El movimiento es metabólico y metamórfico la mayor parte del tiempo (Figs. 6H-L). El epicono es pequeño con forma de lengua doblada y desviado hacia la izquierda; nace del lado ventral del ápice del hipocono y se extiende hacia la parte dorsal. El epicono puede presentar una elevación apical pequeña que cubre la parte anterior del hipocono (Figs. 6A-C, 7A-C). El flagelo transversal se origina del epicono (Figs. 6A-B, 7F). El hipocono es asimétrico, redondeado en la parte antapical, truncado u oblicuo con lados convexos. En ocasiones, el lado derecho del hipocono tiende a ser más convexo que el izquierdo (Figs. 6A-C, 7A-C). El cíngulo está desplazado y descendente en vista ventral y dorsal (Figs. 6A-D, 7A-D). En la parte central de la célula en vista ventral, se encuentra el sulco como una hendidura profunda de donde se origina el flagelo longitudinal. El flagelo longitudinal está insertado aproximadamente a 1/6 de la parte media de la célula. La parte sulcal presenta una curvatura hacia la derecha y continua con una ligera inclinación hacia la izquierda de manera profunda y ancha; posteriormente se desvanece antes de llegar a la parte antapical. Hay una cresta estrecha y prominente en vista ventral que recorre la inserción flagelar en forma de V (Figs. 6C-D, Figs. 7A-B). El cloroplasto es de coloración dorada, lobulado y largo que irradia hacia la periferia de la célula desde el pirenoide. El pirenoide es redondo, está ubicado en el centro de la célula, envuelto en almidón en forma de anillo. Frecuentemente se observan gránulos de almacenamiento y asimilación, pequeñas inclusiones globulares rojas en toda la célula, posiblemente derivados de productos de degradación. Presenta púsculas pequeñas alrededor del pirenoide ( $\sim 2$ ). El núcleo es redondo u ovalado y está ubicado en la parte posterior del hipocono (Figs. 6A-G).

La cepa produce sustancias mucilaginosas espesas, gelatinosas y acuosas, forma estratos o capas tanto en el fondo como en el sobrenadante, que les confieren la capacidad de adherirse al sustrato y estar embebidas dentro de estas (Figs. 6K-L). Se observaron células esféricas en la fase de cultivo exponencial temprana, que presentaban movimiento reducido. Las células alargadas y ovoides con movimiento metabólico activo se observaron durante la fase exponencial tardía y estacionaria.



*Amphidinium thermaeum* presenta procesos de reproducción asexual mediante fisión binaria, formación de quistes hialinos temporales, y un proceso sexual por conjugación (Fig. 8). La división asexual por fisión binaria en células móviles comienza en el hipocono formando una ranura longitudinal (Figs. 8A-B) y termina dividiéndose en dos epiconos. El sulco permanece durante el proceso mitótico (Figs. 8C, 7G). En raras ocasiones, las células comienzan a dividirse en dos epiconos, posteriormente incrementan de tamaño de manera notoria. Durante la división, las células hijas (amorfas) se retuercen entre sí, y justo antes de la separación, las dos células hijas se encuentran conectadas por una estructura en forma de banda (Figs. 8C-F). No pudimos observar cómo se lleva a cabo la transformación de la siguiente fase. Este proceso de reproducción se observó durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo.

La división celular en los quistes hialinos se realiza en una sola o en múltiples divisiones dentro del mismo quiste (Fig. 9). Las células dentro de los quistes no presentan movimiento. Los sacos hialinos parecen tener doble capa, contienen paquetes por número de pares de células (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, >16), están cubiertos por gránulos y una sustancia mucilaginosa (Figs. 10A-I). Generalmente se presentan en las fases de aclimatación hasta la exponencial tardía. Posteriormente, los quistes maduran y liberan células de vida libre (Figs. 9J-K). Cuando no existen las condiciones propicias para su desarrollo, como en agitación continua, se mantienen los quistes sin madurar a lo largo de todo el cultivo. Las células dentro de los quistes presentan una morfología ovalada de forma irregular con las estructuras retraídas (no lisas); algunas llegan a desarrollar por completo el epicono (Figs. 9A-F, 7J). Los quistes se encuentran embebidos en gruesas matrices mucilaginosas (Fig. 9L).

La reproducción por conjugación sexual comienza con la división celular (Fig. 10A), posteriormente, mediante células con forma y movimiento ameboide, los epiconos se extienden y se conectan como probóscide en cada célula, y se observa transferencia del protoplasma entre ambas células (Figs. 10B-D, 7H). Al terminar la reproducción por conjugación sexual la célula recupera su forma original. Este proceso se observó en raras ocasiones, únicamente en cultivos en cajas multipozos. No se observaron planocigotos biflagelados.



Todos los procesos de reproducción pueden llevarse a cabo simultáneamente.

Localidad tipo: Golfo de Thermaikos, Grecia.

Holotipo: (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009), (157, Fig. 1).

Distribución: Golfo de Thermaikos, Grecia dentro del Mar Egeo; Australia y Nueva Zelanda (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray et al., 2012; Rhodes & Smith, 2019; Rhodes et al., 2020).

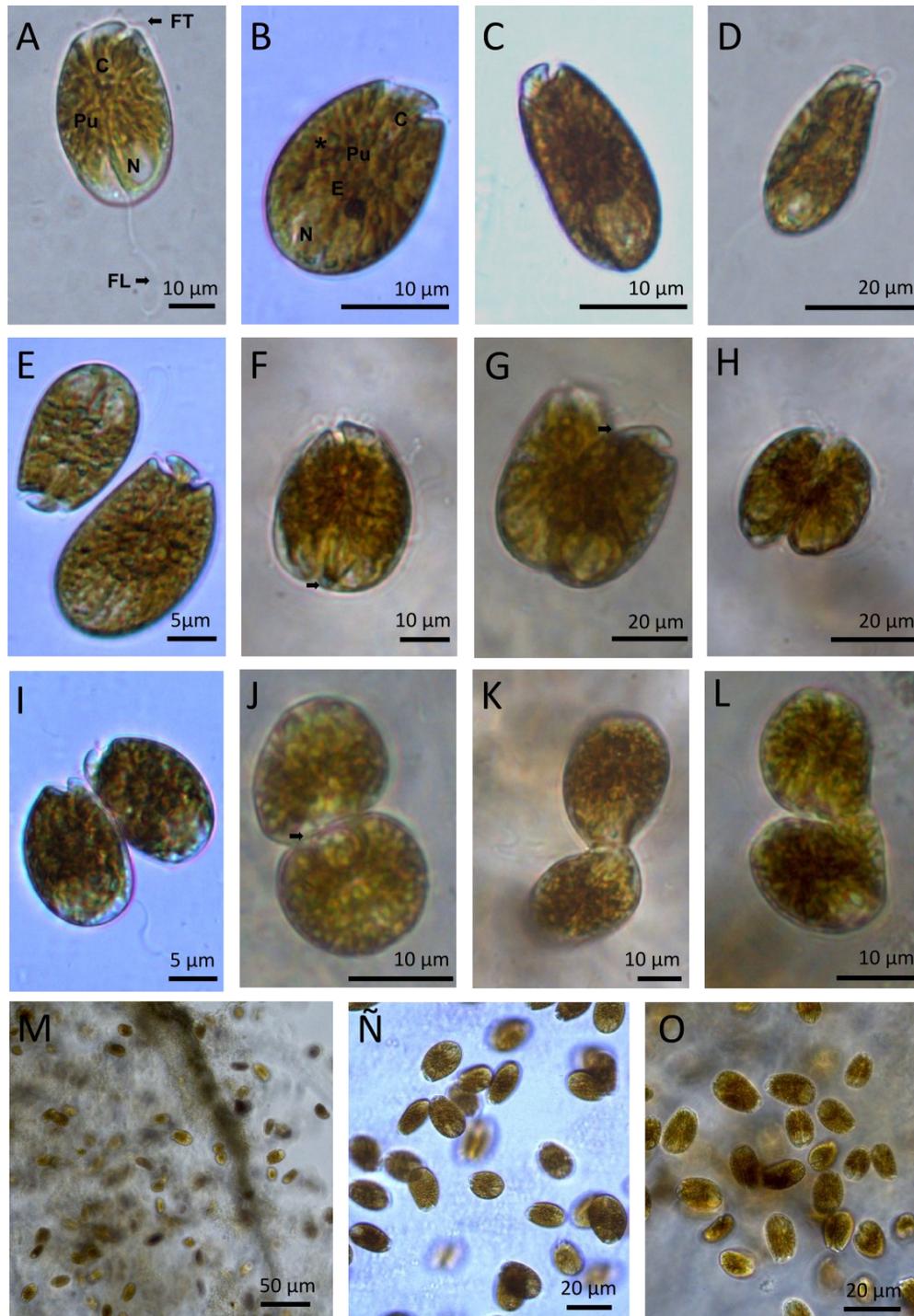


Figura 4. Células vegetativas de *Amphidinium* sp. (s/li 73) en microscopía fotónica. A-B) vista ventral, C) vista dorsal, D) vista lateral, E) células vegetativas en movimiento, F-G) células en división por fisión binaria en vista ventral, H) células en división por fisión binaria en vista dorsal, I) proceso de separación de las células hijas J-L) células ameboides en conjugación sexual, M-O) células en movimiento e inmersas en mucílago. C= cíngulo, E= estigma, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, N= núcleo, Pu= púsula, \* gránulos incoloros.

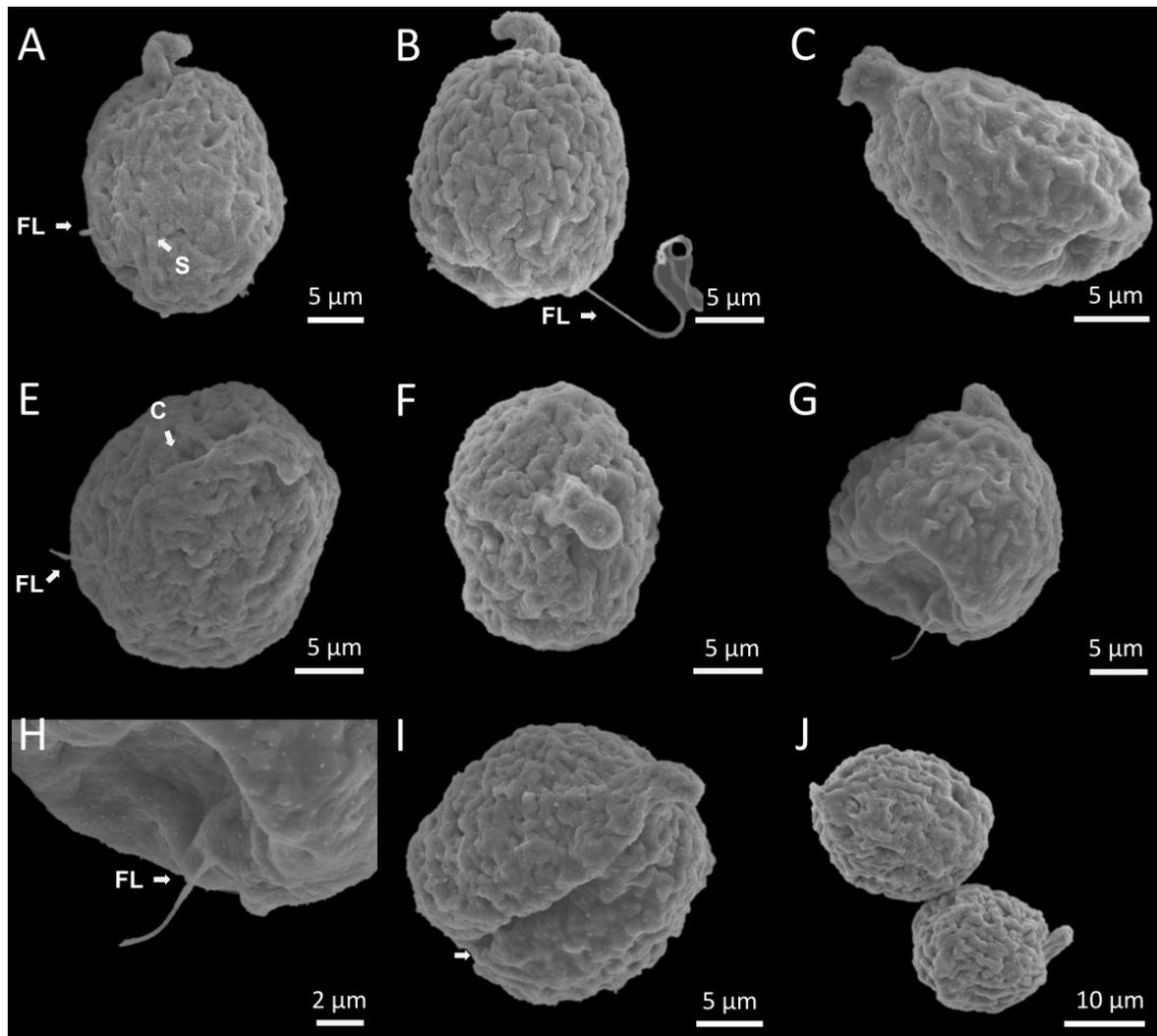


Figura 5. Células vegetativas de *Amphidinium* sp. (s/i 73) en microscopía electrónica de barrido.

A) vista ventral, B) vista dorsal, C) vista lateral, E-F) vista apical, G-H) flagelo longitudinal vista antapical con invaginación, I) células en división por fisión binaria en vista ventral, J) células vegetativas en vista ventral. C= cíngulo, FL= flagelo longitudinal, S= sulco.

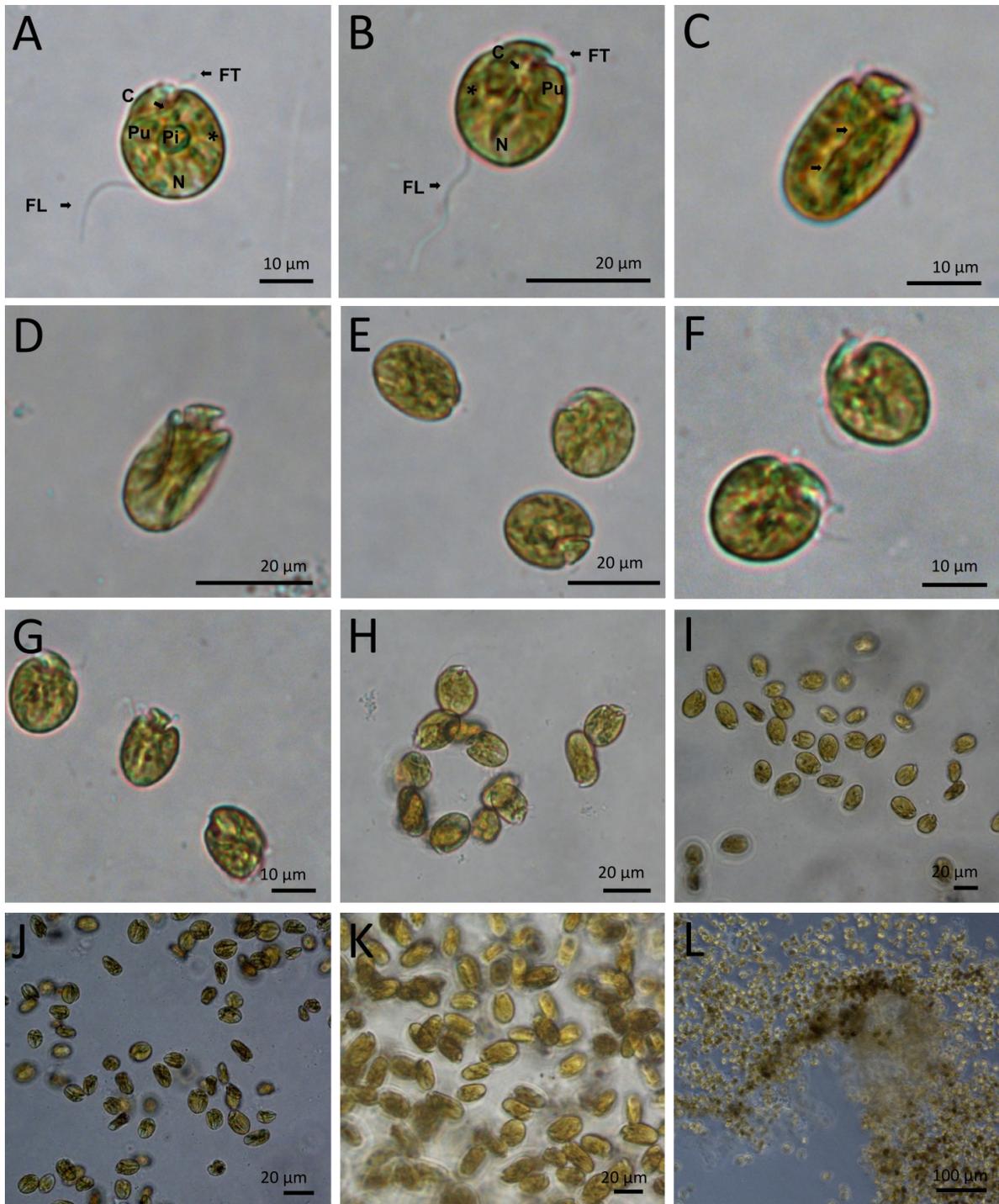


Figura 6. Células vegetativas de *Amphidinium thermaeum* (s/li 74) en microscopía fotónica. A-D) vista ventral, E-G) células vegetativas redondas y esféricas en movimiento, H-I) células vegetativas elipsoidales u oblongas en movimiento, J) células con movimiento metabólico, K-L) células embebidas en mucílago. C= cíngulo, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, N= núcleo, Pi= pirenoide, Pu= púsula, \* gránulos incoloros.

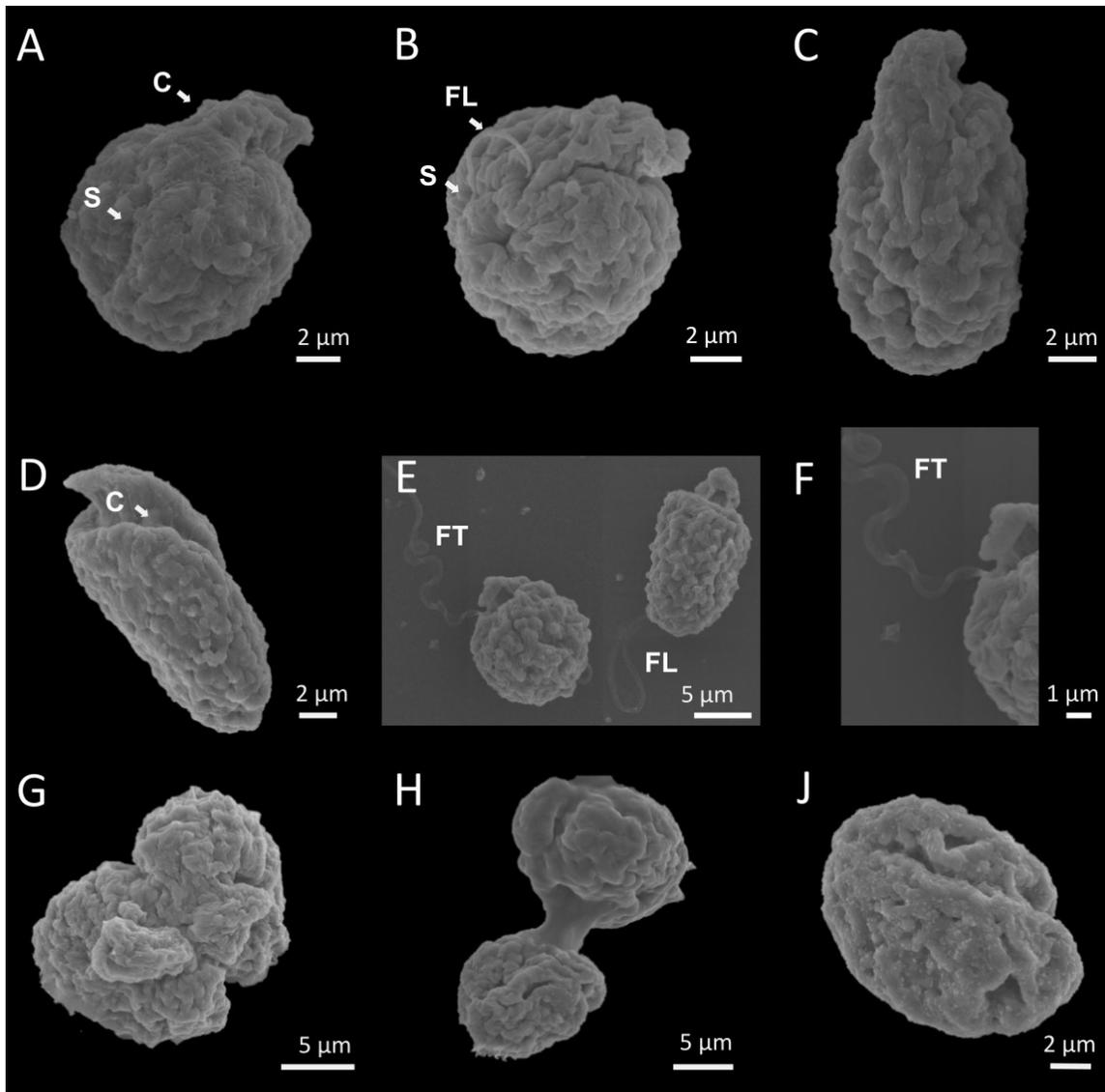


Figura 7. Células vegetativas de *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) en microscopía electrónica de barrido.

A-C) vista ventral, D) vista lateral, E) vista dorsal, F) flagelo transversal del epicono, G) células en fisión binaria en vista apical, H) células en conjugación sexual, J) quiste de reproducción. C= cíngulo, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, S= sulco.

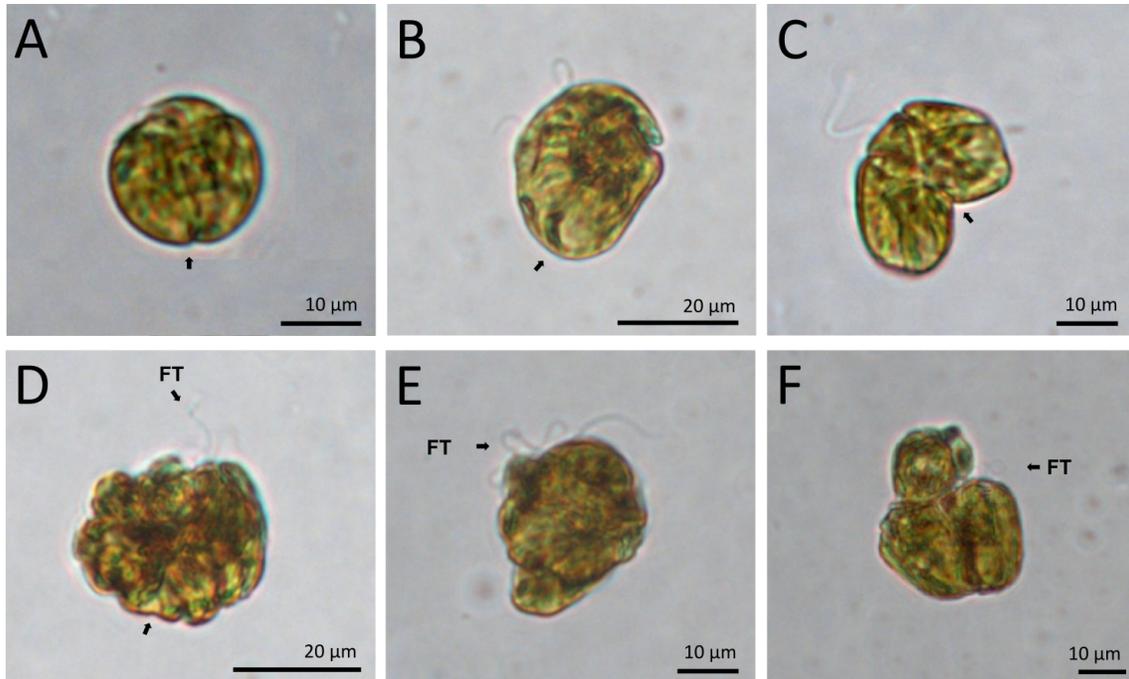


Figura 8. Proceso de reproducción por fisión binaria de *Amphidinium thermaeum* (sl/i 74) en microscopía fotónica.

A) inicio de la división en el hipocono, B) ranuras longitudinales en células hinchadas, C) las dos células hijas inicialmente se separan en el antápice y los epiconos son las últimas partes en dividirse; D-F) células amorfas en movimiento, inicio de la división en el epicono. FT= flagelo transversal.

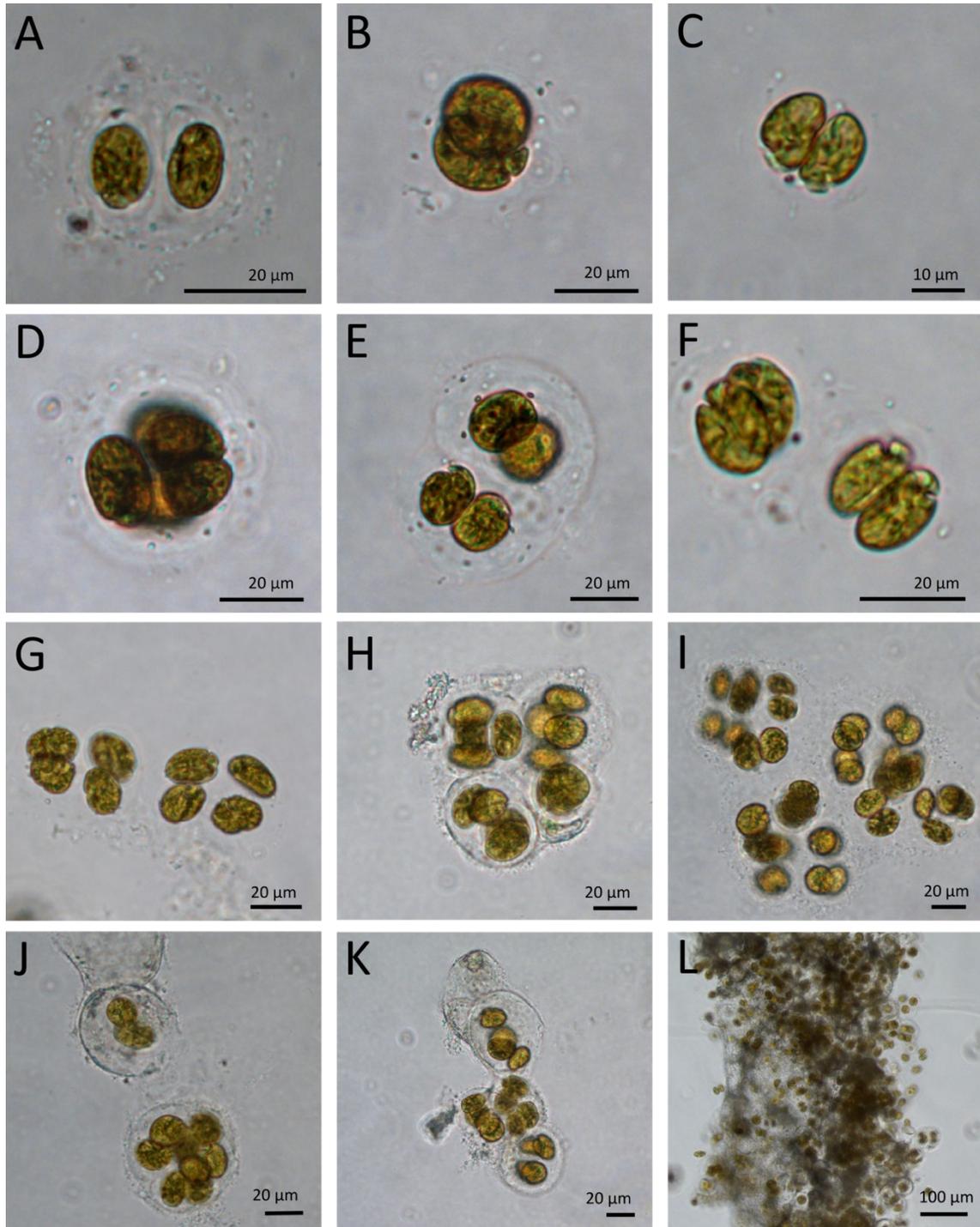


Figura 9. Proceso de reproducción por quistes hialinos de *Amphidinium therraeum* (s/lí 74) en microscopía fotónica.

A) quiste rodeado de una doble membrana hialina, B-G) células enquistadas en división, H-I) grupo de células enquistadas con múltiples divisiones, J-K) quistes maduros liberando células vegetativas con movimiento, L) quistes embebidos en mucílago.

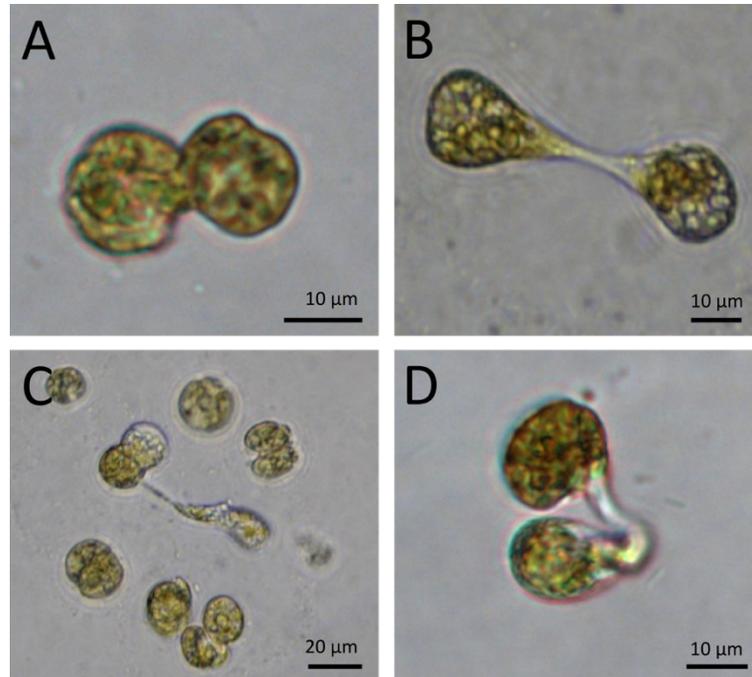


Figura 10. Proceso de reproducción por conjugación sexual de *Amphidinium therraeum* (s/i 74) en microscopía fotónica. A) células en división, B-C) dos células ameboides en una posible conjugación sexual con una prolongación de los epiconos, D) fusión de los dos epiconos prolongados (probóscide).

### 7.1.3 *Coolia malayensis* Leaw, P.-T.Lim & Usup in Leaw et al. 2001 (164, Figs. 1-6)

Cepa: s/i 75

Células fotosintéticas biflageladas, solitarias y tecadas (presentan placas de celulosa). Tienen forma redonda a esférica en vista dorsoventral (Figs. 11A-C, 12A-B) y oblicuamente redondeada o elipsoidales en vista lateral (Figs. 11H, 12C-F). En vista apical y antapical son casi esféricas, en esta última con una ligera hinchazón del lado izquierdo (Figs. 11D-G, 12G-I). En vista ventral mide de 28 a 42  $\mu\text{m}$  de largo ( $\pm 3.37$ ,  $n = 45$ ) y de 27 a 38  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 2.60$ ,  $n = 45$ ), la relación largo-ancho (L/A) es de 0.79 a 1.26  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.10$ ,  $n=45$ ), y en vista apical mide de 28 a 39  $\mu\text{m}$  de largo ( $\pm 2.53$ ,  $n = 36$ ) y de 27 a 38  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 2.63$ ,  $n = 36$ ), la L/A es de 0.88 a 1.13  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.06$ ,  $n = 31$ ). La hipoteca es ligeramente más grande que la epiteca. Presenta numerosos cloroplastos discoides de color marrón amarillento con distribución radial en toda la célula. El núcleo es subsférico o ligeramente elongado y está ubicado en la parte dorsal del hipocono. La púsula es grande y redonda, se encuentra en la unión con el



cíngulo y sulco (Figs. 11A-C). El flagelo longitudinal se origina del cíngulo y el flagelo transversal del sulco estrecho (Figs. 11C, E). Las células producen sustancias mucilaginosas formando redes y estratos, tanto en el fondo como en el sobrenadante. Dentro de estas redes de mucílago se llevan a cabo los procesos reproductivos; también pueden estar células embebidas dentro de este (Figs. 11J-K).

La tabulación de las tecas empleada para la identificación de la cepa de *C. malayensis* fue propuesta por Leaw *et al.* (2010): Po, 3', 7'' 6c, 6(s), 5''', 2'''''. La superficie de las tecas es lisa con poros grandes avalados y redondos distribuidos irregularmente. En la epiteca, el complejo del poro apical (CPA), con un poro apical (Po) recto o curvado, puede estar abierto o estrecho, con una longitud de 3 a 5  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.78$ ,  $n = 9$ ), ancho de 1 a 2  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.4$ ,  $n = 7$ ) y una proporción de la L/A de 2 a 3  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.32$ ,  $n = 7$ ) (Figs. 12 K-L). El CPA está dorsalmente desplazado y contiguo a las placas apicales 2', 3' y 4''. El poro apical se desplaza con una hendidura alargada hacia el lado dorsal izquierdo del ápice (episoma); por lo tanto, el eje de la célula se inclina dorsoventralmente (Figs. 12C-H). La placa 2' es la más pequeña de la serie apical y dentro alberga al poro apical. La tercera placa apical (3') es cuadrangular en la mayoría de los casos, contigua con las placas del CPA, 1', 2', 4'', 5'' y 6''. La primera placa apical (1') es oblonga y hexagonal, el margen derecho es estrecho y alargado. La sexta placa precingular (6'') es la más ancha de la epiteca, contigua a las placas 1', 3', 5'' y 7''. La séptima placa precingular (7'') es pequeña y cuadrangular con aproximadamente de seis a nueve poros ( $n = 5$ ), una longitud de 4 a 7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.39$ ,  $n=5$ ), ancho de 4 a 7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.5$ ,  $n = 5$ ), y relación de L/A de 0.8 a 1  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.07$ ,  $n = 5$ ) (Figs. 12 F-H). El cíngulo es estrecho, profundo, descendente y está cubierto de poros. El sulco es profundo, corto y ancho hacia el antápice. Dentro del sulco se encuentran las placas sulcales: la placa anterior sulcal (S.a.), la placa izquierda anterior sulcal (S.s.a.), la placa derecha anterior sulcal (S.d.a.), la placa izquierda posterior sulcal (S.s.p.), la placa derecha posterior sulcal (S.d.p.), la placa posterior sulcal (S.p.) que se compone de la placa derecha posterior sulcal (S.p. $\alpha$ ) y la placa izquierda posterior sulcal (S.p. $\beta$ ) que se encuentran contiguas a las placas postcingulares 5''', 1'''' y 2'''''. La primera y la segunda placa antapicales (1'''' y 2''''') están separadas por el sulco. La placa 2'''' presenta una forma triangular, la cual se encuentra rodeada por las placas



4<sup>'''</sup>, 3<sup>'''</sup> y 1<sup>'''</sup>, sin tocar con las placas 5<sup>'''</sup> y 2<sup>'''</sup> (Figs. 12A-C).

En la hipoteca, la tercera placa postcingular (3<sup>'''</sup>) es la placa más grande y ancha con una longitud de 15 a 21  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2.61$ ,  $n = 5$ ), un ancho de 11 a 19  $\mu\text{m}$  ( $\pm 3.37$ ,  $n = 5$ ) y una relación de L/A de 0.8 a 1.6  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.31$ ,  $n = 5$ ), se encuentra contigua a las placas antapicales 4<sup>'''</sup> y 2<sup>'''</sup>. La placa 2<sup>'''</sup> es más ancha en vista ventral y la placa 4<sup>'''</sup> es más larga en vista antapical (Figs. 12A-C, I).

El proceso de reproducción asexual es mediante fisión binaria y la formación de quistes temporales. El proceso sexual se lleva a cabo por conjugación, formación de gametos y posiblemente mediante la formación de quistes temporales. Durante los procesos de reproducción asexual y sexual se observaron células con gran variabilidad en los morfotipos, desde células pigmentadas y oscuras, células con granulaciones anaranjadas, células pequeñas e incoloras y quistes temporales con una pared celular delgada (Figs. 13, 14, 15).

El proceso de reproducción asexual se realiza mediante fusión binaria. Inicia con la división del núcleo, dando lugar a un núcleo doble, de mayor tamaño, que comparte las mismas placas tecales, proceso conocido como desmoquisis (Figs. 13A-C). Posteriormente, comienza la citoquinesis, que es la separación del citoplasma que da lugar a dos células hijas flageladas que se dividen gradualmente a lo largo de la parte central celular y terminan la división en el poro apical (Figs. 13D-F). También se observaron células con múltiples divisiones, formando triadas unidas en la parte apical y antapical (Figs. 13G-H).

En el proceso de reproducción sexual se observaron células de diferente tamaño, los gametos flagelados con movimiento se diferencian de las células vegetativas por ser pequeños; contienen cromosomas condensados que cubren casi toda la célula, presentan menor número de cloroplastos y la pigmentación es casi nula, presentan vacuolas y granulaciones translúcidas (Figs. 14A-C). Conforme aumenta la edad del cultivo, aumentan de tamaño, recuperan la pigmentación y la forma de una célula vegetativa (Figs. 14D-G).

Las parejas de gametos en apareamiento se unen en la región sulcal (Fig. 15A). También se pueden fusionar mediante conjugación con gametos del mismo tamaño (isogamia) (Figs. 15B-D) o gametos de diferente tamaño (anisogamia) (Figs. 15E-F).



Los gametos en apareamiento presentan movimiento con un patrón giratorio. No se observaron planocigotos biflagelados.

Los quistes temporales presentan una pared hialina delgada de una sola capa, son de corto plazo y posiblemente derivan del ciclo vegetativo o de los cigotos (Figs. 16A-C). Posteriormente, mediante ecdisis se desprenden las placas tecales que se encuentran adheridas en la parte superior de la película (Fig. 16D). Esta germinación libera una célula desnuda que comienza a dividirse (Figs. 16E-F). Los quistes temporales se encuentran embebidos en estratos de una matriz mucilaginosa (Fig. 16G-I).

Localidad tipo: Kota Kinabalu, (05° 59' N, 116° 04' E), Sabah, Malasia, Sur del mar de China.

Holotipo: (Leaw *et al.*, 2010), (164, Fig. 1, cepa CmSA01). Cepa CmSA01 depositada en la Colección de Cultivos de Microalgas de la Universidad de Kebangsaan, Malasia.

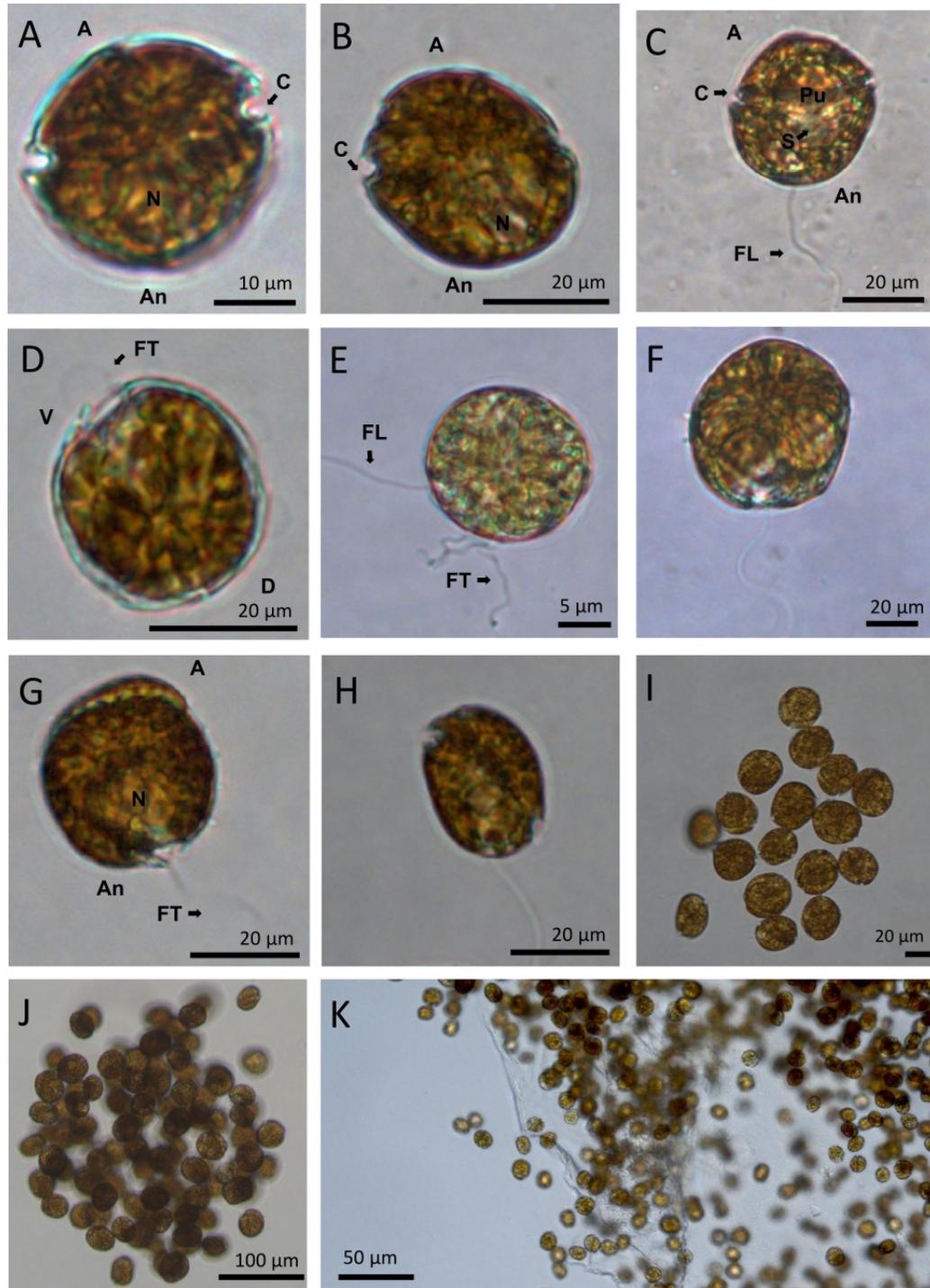


Figura 11. Células vegetativas de *Coolia malayensis* (s/i 75) en microscopía fotónica. A-C) vista ventral, D-F) vista apical. G) vista antapical, H) vista lateral, I) células vegetativas en movimiento, J) agregado celular unido por mucílago, K) red mucilagínosa con células embebidas. A= ápice, An= antápice, C= cíngulo, D= dorsal, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, N= núcleo, Pu= púsula, S= sulco, V= ventral.

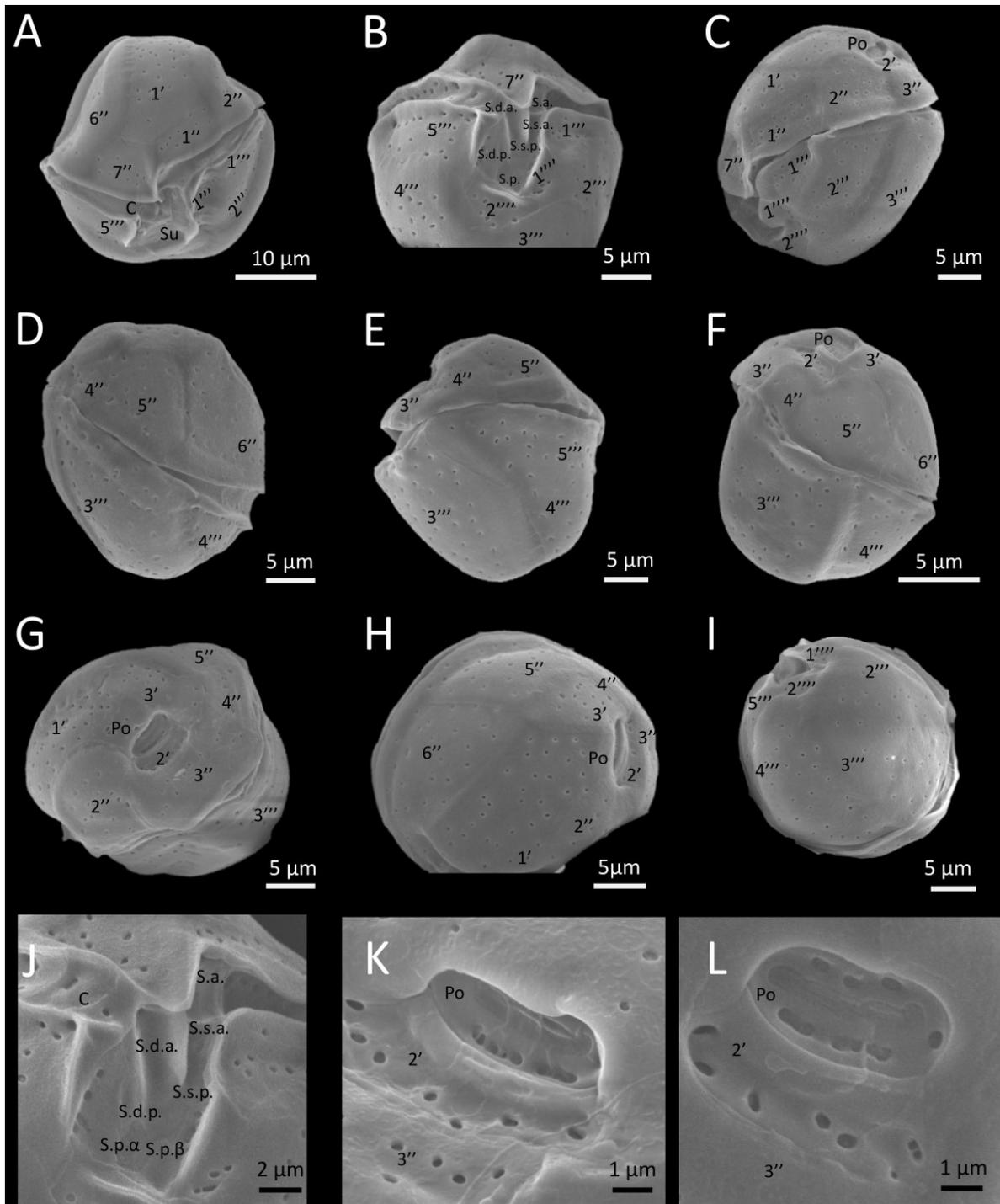


Figura 12. Células vegetativas de *Coolia malayensis* (s/l 75) en microscopía electrónica de barrido.

A-B) vista ventral, C-E) vista lateral, F-G) vista dorsal, H) vista apical, I) vista apical, I) vista antapical, J) complejo sulcal, K-L) complejo del poro apical (Po). C= cíngulo, Su= sulco.

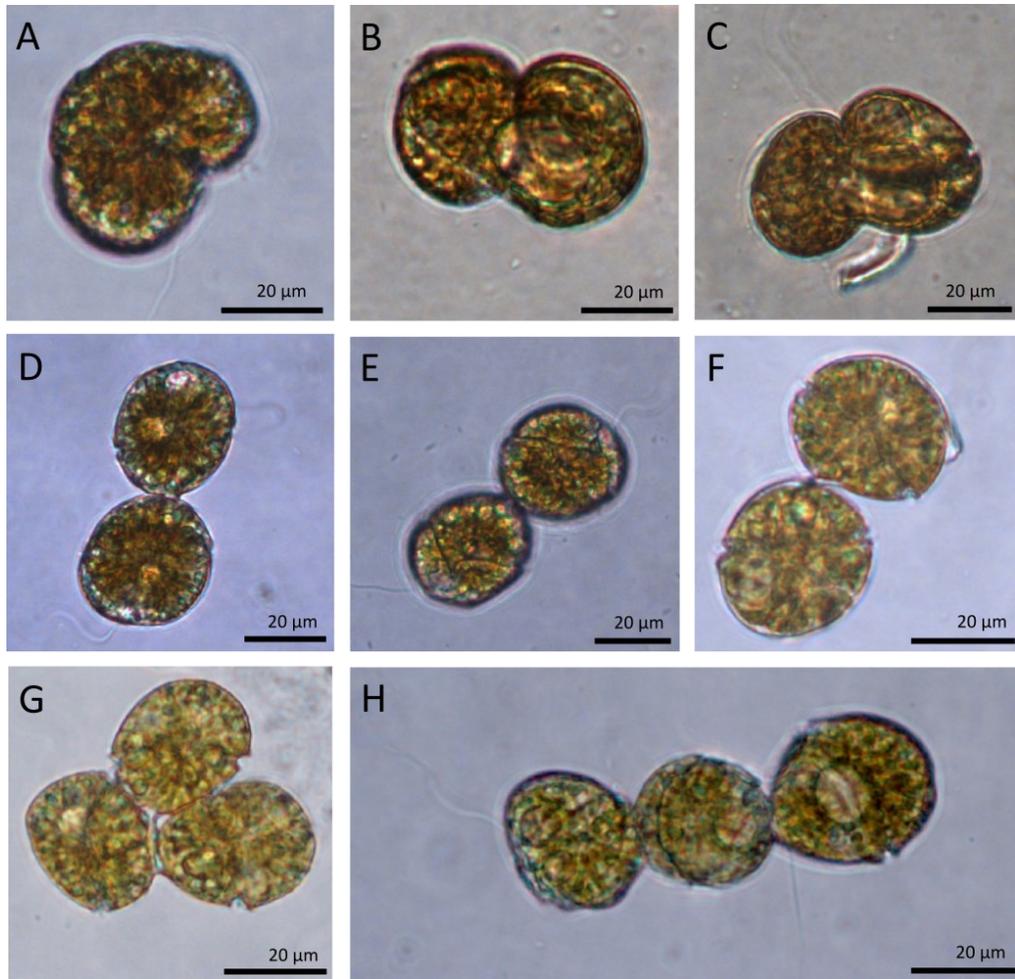


Figura 13. Proceso de reproducción por fisión binaria de *Coolia malayensis* (s/i 75) en microscopía fotónica.  
A-C) división del núcleo, D-F) células hijas en proceso de separación a partir del poro apical.

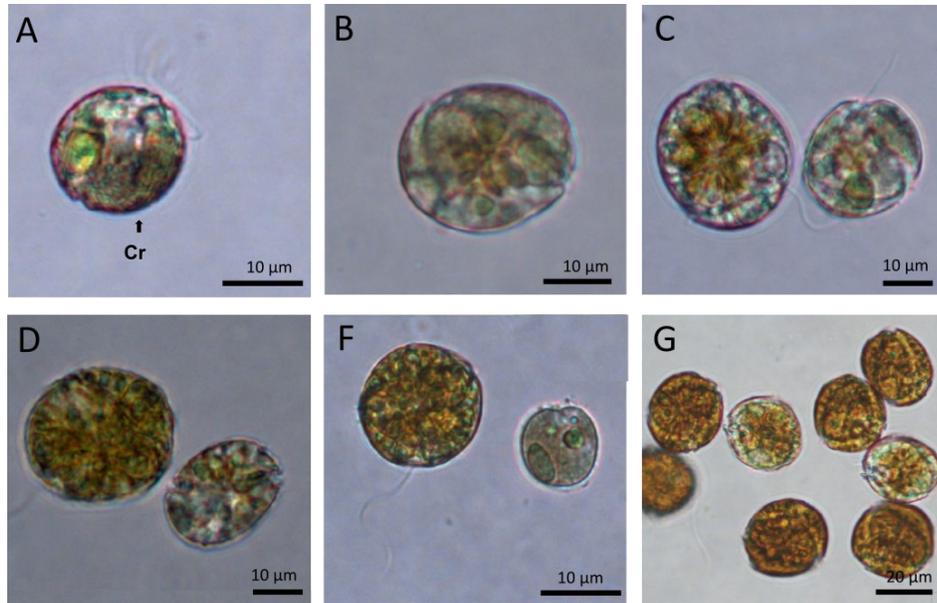


Figura 14. Estados de las células vegetativas del proceso sexual de *Coolia malayensis* (sli 75) en microscopía fotónica. A-C) gametos incoloros en movimiento con los cromosomas condensados D-G) células vegetativas y gametos en movimiento. Cr= cromosomas.

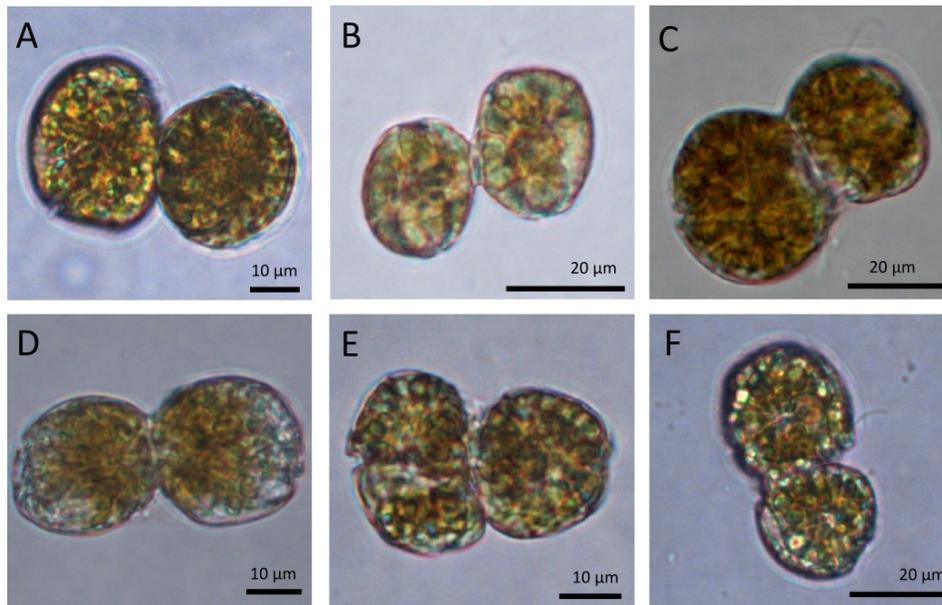


Figura 15. Proceso de reproducción por conjugación sexual de *Coolia malayensis* (sli 75) en microscopía fotónica. A-B) isogametos alineados lateralmente para la fertilización, C-D) isogametos fusionados formando un puente para la fertilización, E-F) anisogametos fusionados.

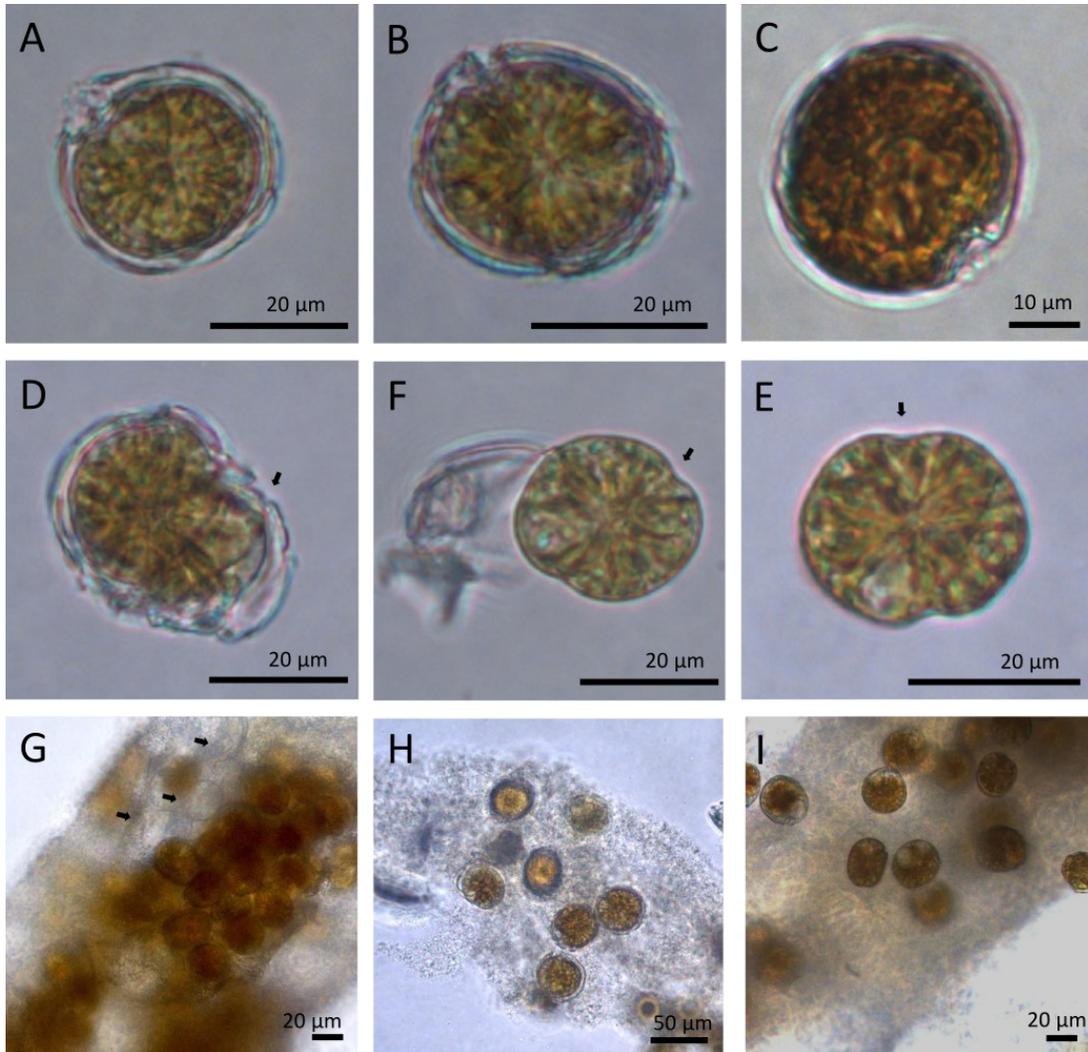


Figura 16. Proceso de reproducción sexual mediante quistes temporales de *Coolia malayensis* (s/i 75) en microscopía fotónica.

A-C) quiste temporal rodeado con una membrana hialina delgada, D) ecdisis, F-E) liberación de célula inmóvil en división, G-H) quistes embebidos en mucílago y membranas vacías, I) células vegetativas en movimiento.

#### 7.1.4 *Coolia malayensis* Leaw, P.-T.Lim & Usup in Leaw et al. 2001 (164, Figs. 1-6)

Cepa: s/i 76

Células fotosintéticas biflageladas solitarias y tecadas. Presentan forma redonda a esférica en vista dorsoventral (Figs. 17A-C, 18A-B) y oblicuamente redondeadas o elipsoidales en vista lateral (Figs. 17F, 18C). En vista apical y antapical son casi esféricas; en esta última se observa una ligera hinchazón del lado izquierdo (Figs. 17D-E, 18E-G). La longitud en vista ventral es de 30 a 41  $\mu\text{m}$  de largo ( $\pm 4.29$ , n



= 42), de 23 a 40  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 4.37$ ,  $n = 42$ ), y tienen una relación largo-ancho (L/A) de 0.91 a 1.40  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.08$ ,  $n = 42$ ). En vista apical miden de 23 a 37  $\mu\text{m}$  de largo ( $\pm 3.72$ ,  $n = 31$ ) y de 23 a 38  $\mu\text{m}$  de ancho ( $\pm 3.72$ ,  $n = 31$ ), la relación L/A es de 0.89 a 1.10  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.05$ ,  $n = 31$ ). La hipoteca es ligeramente más grande que la epiteca. Presenta numerosos cloroplastos discoides de color marrón amarillento con distribución radial en toda la célula. El núcleo es subsférico o ligeramente elongado ubicado en la parte dorsal del hipocono. La púsula es grande y redonda, se encuentra contigua en la unión con el cíngulo y sulco. El flagelo longitudinal se origina del cíngulo (Figs. 17A-C). Las células producen sustancias mucilaginosas formando redes y estratos tanto en el fondo como en el sobrenadante. Dentro del mucílago se llevan a cabo los procesos reproductivos y también pueden estar células embebidas dentro de este (Figs. 17J-K).

Se utilizó la tabulación propuesta Leaw *et al.* (2010) para realizar la identificación de *C. malayensis*: Po, 3', 7'' 6c, 6(s), 5''', 2'''''. La superficie de las tecas es lisa con poros grandes ovalados y redondos con distribución irregular. Los poros presentan pequeñas perforaciones dentro (Fig. 18H). En la epiteca, el complejo del poro apical (CPA) contiene un poro (Po) recto o curvado y alargado en algunos casos, puede estar abierto o estrecho, mide de 3 a 7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.45$ ,  $n = 5$ ) de longitud, de 1.17 a 1.7  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.28$ ,  $n = 5$ ) de ancho y tiene una relación de L/A de 3 a 4  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.5$ ,  $n = 5$ ). El CPA esta dorsalmente desplazado y contiguo a las placas apicales 2', 3' y 4'' (Fig. 18I). El poro apical se desplaza con una hendidura alargada hacia el lado dorsal izquierdo del ápice, por lo tanto, el eje de la célula se inclina dorsoventralmente (Figs. 18C-E). La placa 2' es la más pequeña de la serie apical y dentro de ella se encuentra el poro apical. La placa 3' es cuadrangular en la mayoría de los casos, contigua con las placas del CPA, 1', 2', 4'', 5'' y 6'''. La placa 1' es oblonga y hexagonal; el margen derecho es estrecho y alargado. La placa más ancha de la epiteca es la 6'' que está contigua a las placas 1', 3', 5'' y 7'''. La séptima placa precingular (7'') es pequeña y cuadrangular con aproximadamente siete poros ( $n = 3$ ), con una longitud de 3 a 4.5  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.3$ ,  $n = 3$ ), un ancho de 4 a 5.8  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.78$ ,  $n = 3$ ) y una relación de L/A de 0.7 a 1  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.9$ ,  $n = 3$ ) (Figs. 18A, F). El cíngulo es estrecho, profundo, descendiente y se encuentra rodeado de poros. El sulco es profundo, corto y ancho hacia el antápice.



Dentro del sulco se encuentran las placas sulcales S.a., S.d.a., S.d.p y S.p, estas se encuentran contiguas a las placas postcingular 5''', 1'''' y 2'''''. La primera y la segunda placas antapicales (1'''' y 2''''') están separadas por el sulco. La placa 2'''''' presenta una forma triangular, la cual se encuentra rodeada por las placas 4''', 3'''' y 1''''', y no están en contacto con las placas 5'''' y 2'''' (Figs. 18A-B).

En la hipoteca, la tercera placa postcingular (3'') es la placa más grande y ancha con una longitud de 13 a 20  $\mu\text{m}$  ( $\pm 3.43$ ,  $n = 3$ ), ancho de 11 a 16  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.91$ ,  $n = 3$ ) y tienen una relación L/A de 1 a 1.4  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.08$ ,  $n = 3$ ); se encuentra contigua a las placas antapicales 4'''' y 2'''''. La placa 2'''' es más ancha en vista ventral y la placa 4'''' es más larga en vista antapical (Figs. 18D-E, G). En esta cepa se observó únicamente el proceso de reproducción mediante fisión binaria como se describe en el apartado 7.1.3 para la cepa s/i 75 (Figs. 17G-H).

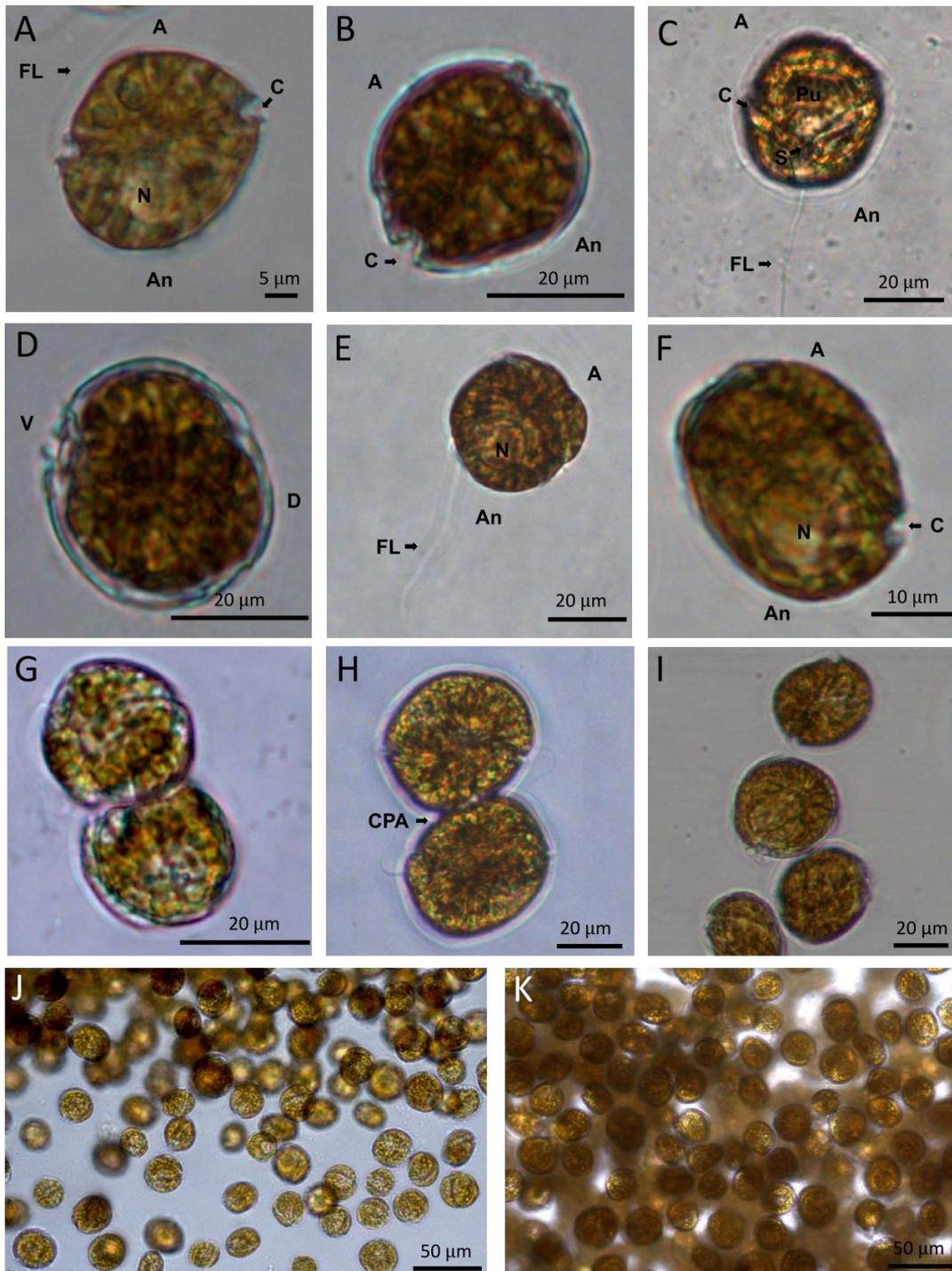


Figura 17. Células vegetativas de *Coolia malayensis* (s/i 76) en microscopía fotónica. A-C) vista ventral, D) vista apical. E) vista antapical, F) vista lateral, G) fusión de gametos, H) fisión binaria por finalizar, I) células vegetativas en movimiento, J-K) agregados y red mucilaginosa con células embebidas. A= ápice, An= antápice, C= cíngulo, CPA= complejo del poro apical, D= dorsal, FL= flagelo longitudinal, FT= flagelo transversal, N= núcleo, Pu= púsula, S= sulco, V= ventral.

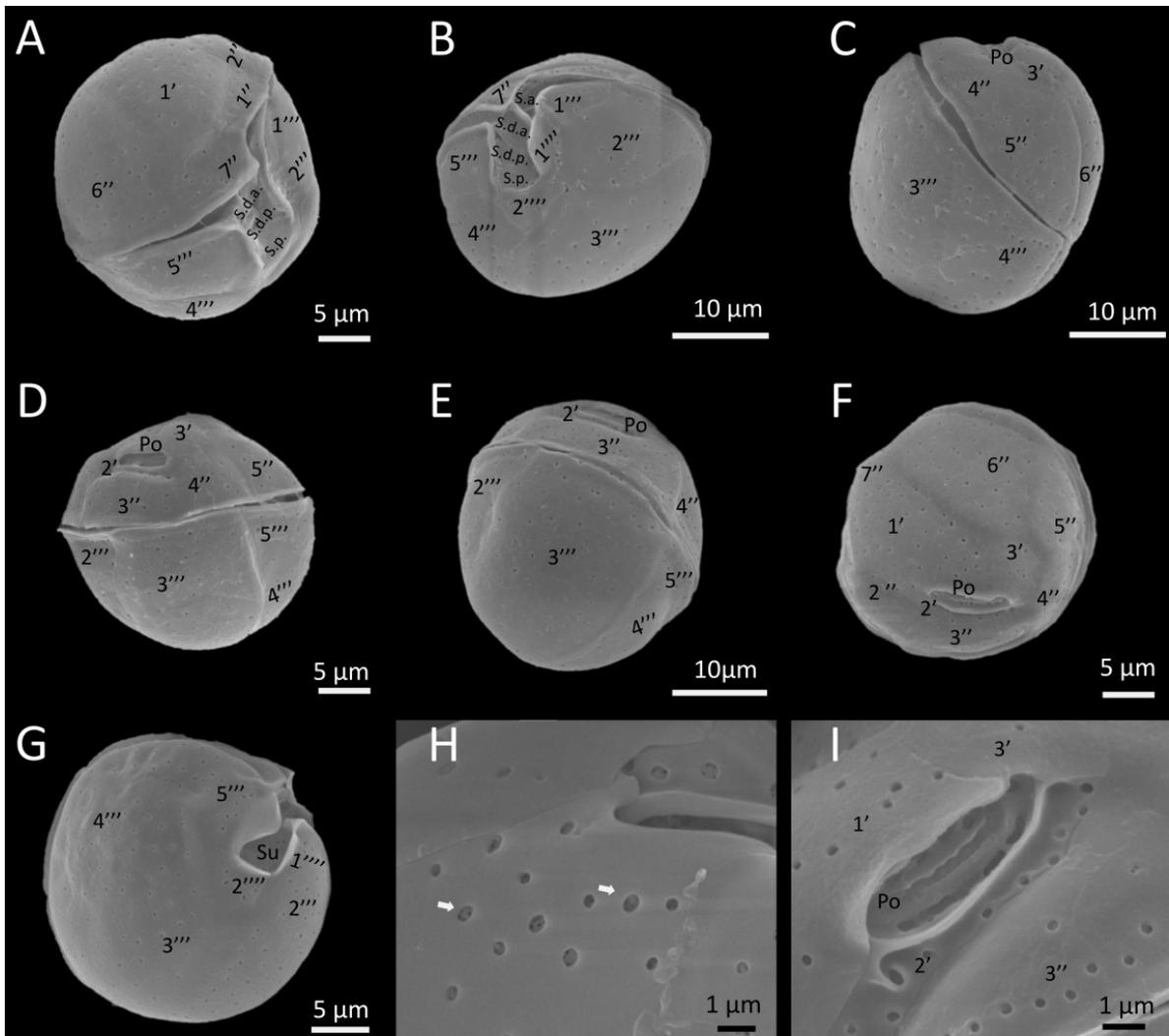


Figura 18. Células vegetativas de *Coolia malayensis* (s/li 76) en microscopía electrónica de barrido.

A) vista ventral y apical, B) vista ventral y antapical con detalle del complejo sulcal, C) vista lateral, D-E) vista dorsal, F) vista apical, G) vista antapical, H) poros con perforaciones, I) complejo del poro apical (Po). C= cíngulo, Su= sulco.

## 7.2 Identificación molecular y análisis filogenético

A partir de las cuatro cepas de estudio, se lograron amplificar y secuenciar los aislados de cultivos clonales de *A. thermaeum* (s/li 74) y *C. malayensis* (s/li 75 y s/li 76). Para la cepa de *Amphidinium* sp. (s/li 73) no se logró obtener información molecular. La identificación de las especies fue evaluada mediante la reconstrucción de los análisis filogenéticos de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). A partir de secuencias parciales de la región LSU de las



regiones D1/D3 del ADNr se confirmó la identidad molecular de la cepa s/i 74 como *A. thermaeum*, y *C. malayensis* para las cepas s/i 75 y s/i 76 (Figs. 19-20). Los análisis filogenéticos de MV e IB presentaron una topología similar, excepto por la distribución de algunas muestras de los clados principales en el interior del filograma.

Se obtuvo una secuencia consenso de la cepa s/i 74 con longitud de 578 pares de bases, la cual se incluyó en una matriz de 54 secuencias con una longitud 815 pares de bases del género *Amphidinium*. Se consideraron las especies *Karlodinium armiger* (DQ114467), *Heterocapsa steinni* (LC541732) y *Heterocapsa minima* (LC541733) como grupos externos. En la reconstrucción filogenética la cepa s/i 74 se agrupó dentro del clado de *A. thermaeum* con un valor de soporte de bootstrap de 100 para MP, y de 100 para MV, con una probabilidad posterior de 1.0 para IB. Esta rama está integrada por los especímenes JQ394809 aislados del Golfo de Thermaikos en Grecia y GQ200834 de Australia, así como los especímenes contiguos, KY070364 de la Bahía de Cofresí en la Republica Dominicana y KY070365 de Cayo Siesta en Florida, EUA (Fig. 19). Las secuencias de *A. thermaeum* s/i 74, JQ394809 y GQ200834 se caracterizaron por presentar una guanina en la posición 536 y una citocina en la posición 380, con respecto a los especímenes contiguos.

Para las cepas de *C. malayensis* (s/i 75 y s/i 76) se obtuvieron secuencias consenso para cada una, con longitud de 673 y 209 pares de bases, respectivamente. Estas se incluyeron en una matriz de 65 secuencias con una longitud 661 pares de bases del género *Coolia*. Se consideró a la especie *Ostreopsis ovata* (FM994897, FM994895) como grupo externo. En la reconstrucción filogenética las cepas s/i 75 y s/i 75 se agruparon dentro del clado de *C. malayensis* con un valor de soporte de bootstrap de 60 para MP, y de 97 para MV, con una probabilidad posterior de 1.0 para IB. Sin embargo, el aislado de la cepa s/i 75 formó una rama separada, dando lugar a un haplotipo diferente al aislado de s/i 76 junto a s/i 72. Ambas ramas son contiguas a los especímenes MT295365 procedente de Brasil, KJ422854 de la Isla Rarotonga en Nueva Zelanda y de KP172278 de Carolina del Norte, E.U.A. (Fig. 20). Las secuencias se caracterizaron por presentar diferencias en la posición 382, donde s/i 75 contiene una adenina y s/i 76 una timina, así como en la posición 417, el cambio es de una adenina a timina, respectivamente.

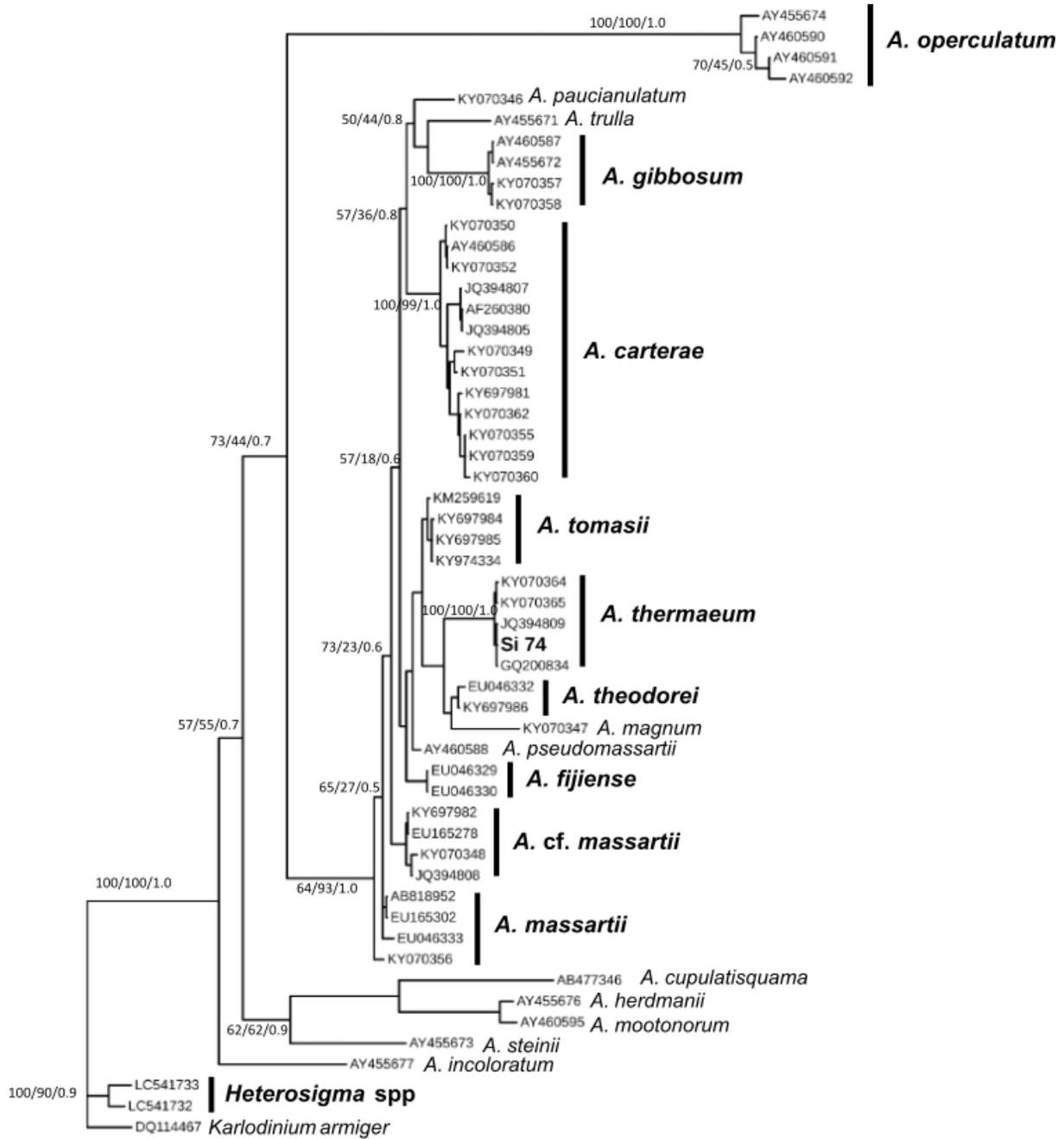


Figura 19. Análisis filogenético de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana del género *Amphidinium* inferido a partir de la subunidad larga de la LSU del ADNr (D1/D3).

Los valores de soporte en los nodos muestran los valores de bootstrap para MP y MV, la probabilidad posterior de IB, respectivamente. La escala indica las sustituciones por sitio.

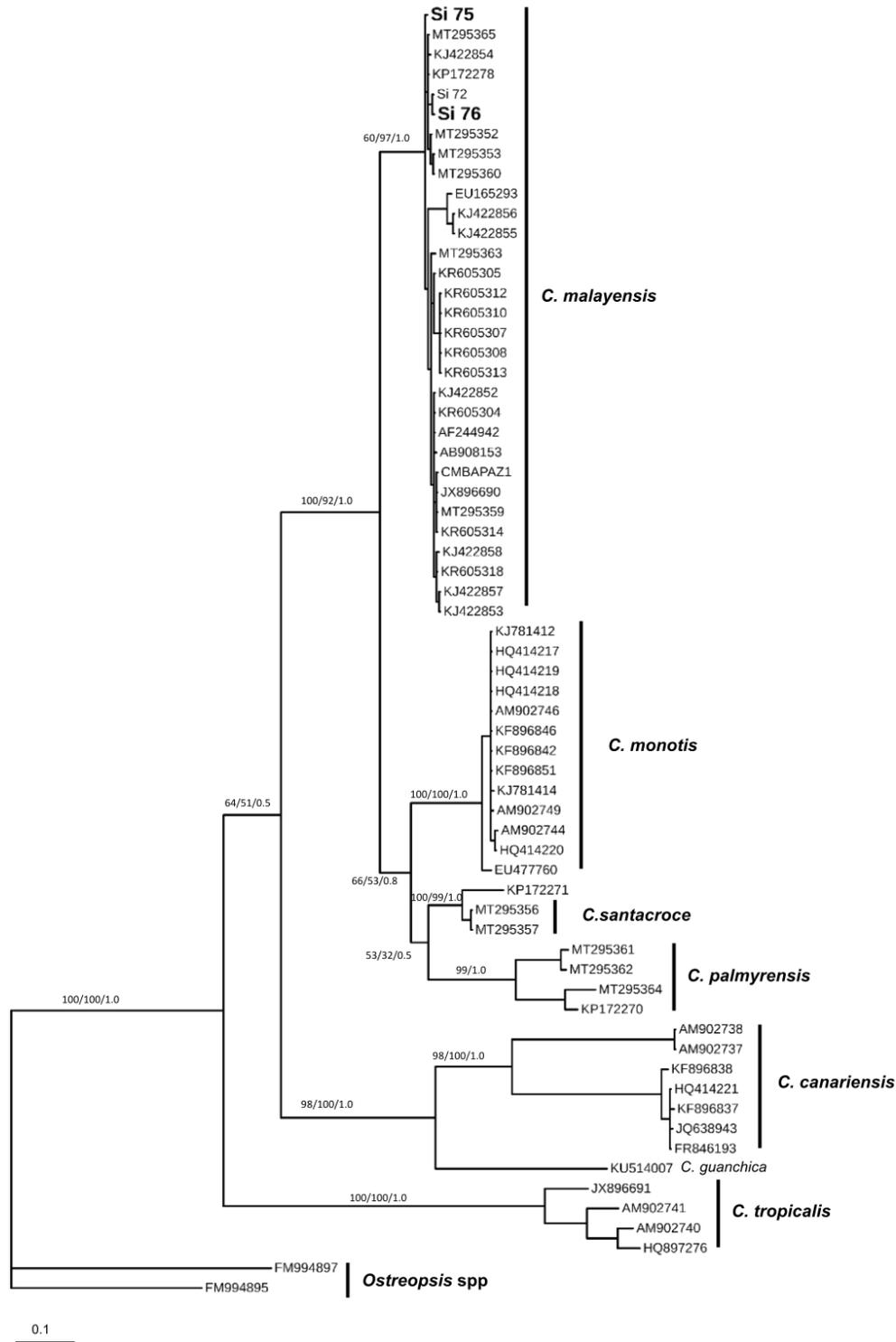


Figura 20. Análisis filogenético de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana del género *Coolia* inferido a partir de la subunidad larga de la LSU del ADNr (D1/D3).

Los valores de soporte en los nodos muestran los valores de bootstrap para MP y MV, la probabilidad posterior de IB, respectivamente. La escala indica las sustituciones por sitio.



## 7.3 Curvas de crecimiento

### 7.3.1 Curvas en cajas multipozos

Las curvas de crecimiento en cajas multipozos con volúmenes de 240  $\mu\text{L}$  y 1 mL sin agitación y con agitación se realizaron con ambas especies para estimar su crecimiento y observar su adhesión a un sustrato artificial. *Amphidinium therrmaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) presentaron patrones diferentes en cada condición. Ambas especies tuvieron una mayor densidad en el volumen de 1 mL y una mayor tasa de crecimiento en 240  $\mu\text{L}$  en los cultivos sin agitación (Figs. 21-27, Tabla 2).

#### *Amphidinium therrmaeum* (s/i 74)

Las curvas de crecimiento de *A. therrmaeun* con agitación en ambos volúmenes no mostraron crecimiento celular a partir del cuarto día. El crecimiento se inhibió completamente en los cultivos inoculados a partir de una célula, mientras que los cultivos sin agitación sí presentaron crecimiento.

El cultivo en volumen de 240  $\mu\text{L}$  (Fig. 21) se analizó durante 26 días para establecer la curva de crecimiento. Esta curva presentó una fase de aclimatación que se extendió hasta el día ocho, una fase de crecimiento exponencial hasta el día 22 con una densidad máxima de  $9.72 \times 10^3 \pm 8.57 \times 10^2$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y finalmente una fase de decaimiento gradual a partir del día 24. Se obtuvo una tasa de crecimiento exponencial de  $0.33 \pm 0.003$  div  $\text{día}^{-1}$  con un tiempo de generación de  $0.92$   $\text{día}^{-1}$  (Fig. 27, Tabla 2).

El cultivo en volumen de 1 mL se analizó durante 34 días para establecer la curva de crecimiento (Fig. 22). Presentó una fase de aclimatación prolongada hasta el día 12, una fase de crecimiento exponencial pronunciada, que terminó en el día 24, con una densidad máxima de  $5.84 \pm 1.18 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$  en el día 26, a partir del cual comenzó la fase de decaimiento y disminuyó el crecimiento de manera gradual. Se obtuvo una tasa de crecimiento exponencial de  $0.26 \pm 0.039$  div  $\text{día}^{-1}$  y un tiempo de generación de  $1.17$   $\text{día}^{-1}$  (Fig. 27, Tabla 2).

Ambas curvas de *A. therrmaeum* se caracterizaron por presentar quistes hialinos a lo largo del cultivo, células vegetativas de vida libre con movimiento y se observaron los estadios del ciclo de vida como fisión binaria, conjugación y producción de quistes



hialinos. También se observaron células de vida libre y quistes hialinos embebidos en capas mucilaginosas durante la fase exponencial.

### *Coolia malayensis* (s/i 75)

Las curvas de crecimiento con agitación para los volúmenes de 240  $\mu\text{L}$  y 1 mL no presentaron crecimiento celular. A partir del segundo día, el crecimiento los cultivos inoculados con una célula se inhibieron, a diferencia de las curvas sin agitación que crecieron durante varios días. El cultivo en 240  $\mu\text{L}$  (Fig. 23) se analizó durante 18 días para establecer la curva de crecimiento. Este presentó una fase de aclimatación corta hasta el cuarto día, una fase de crecimiento exponencial tardía hasta los 16 días, alcanzando una densidad máxima de  $134 \pm 72.18 \text{ cel mL}^{-1}$ , a partir de la cual comenzó una fase de decaimiento abrupta. En la fase exponencial presentó una tasa de crecimiento de  $0.43 \pm 0.16 \text{ div día}^{-1}$  y un tiempo de generación de  $0.71 \text{ día}^{-1}$  (Fig. 27, Tabla 2).

El cultivo de *C. malayensis* en un volumen de 1 mL (Fig. 24) se analizó durante 38 días para establecer la curva de crecimiento. Se observó una fase de aclimatación prolongada hasta el día 18, una fase de crecimiento exponencial que terminó a los 30 días, con una densidad máxima de  $1.77 \pm 1.34 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$  y posteriormente una fase de decaimiento. La tasa de crecimiento exponencial fue de  $0.24 \pm 0.01 \text{ div día}^{-1}$  con un tiempo de generación de  $1.26 \text{ día}^{-1}$  (Fig. 27, Tabla 2).

En ambas curvas no se presentó una fase estacionaria, ya que posterior a la fase exponencial comenzó el declive celular; además, el patrón de crecimiento no fue similar en ambas condiciones de cultivo. *Coolia malayensis* se caracterizó por presentar células vegetativas de vida libre con movimiento, se observaron todas las fases del ciclo de vida, además secretaban redes mucilaginosas con células adheridas que aumentaban su densidad y grosor con forme transcurrían los días de cultivo hacia la fase exponencial y cubrieron la mayor parte del fondo del pozo.

### 7.3.2 Curvas en matraces Erlenmeyer

Se cultivaron ambas especies en 300 mL en matraces con agitación a 100 rpm para estimar su crecimiento, su producción de mucílago y tratar de evitar la formación



de agregados celulares. Se observó que las densidades máximas y tasas de crecimiento en este tratamiento fueron menores en comparación con las curvas de crecimiento en cajas multipozos (Figs. 25-27, Tabla 2)

#### *Amphidinium therrmaeum* (s/i 74)

El cultivo se analizó durante 46 días para establecer la curva de crecimiento. Presentó una fase de aclimatación hasta el doceavo día, seguida de una fase exponencial hasta el día 40 con una densidad máxima de  $1.79 \times 10^4 \pm 2.10 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y un declive inmediato en el crecimiento. Presentó una tasa de crecimiento exponencial de  $0.10 \pm 0.003$  div día<sup>-1</sup> y un tiempo de generación de 2.90 día<sup>-1</sup>. Esta especie no presentó una fase estacionaria por lo que una vez alcanzada la fase exponencial tardía comenzó la fase de decaimiento (Fig. 25 y 27, Tabla 2). El cultivo se caracterizó por presentar quistes hialinos embebidos en mucílago adheridos al fondo y pocas células de vida libre en la fase exponencial.

#### *Coolia malayensis* (s/i 75)

El cultivo se analizó durante 68 días para establecer la curva de crecimiento. Presentó una fase de aclimatación hasta el día ocho, seguida de una fase exponencial hasta el día 44, alcanzando una densidad máxima de  $9.78 \pm 2.52 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>, seguida de una fase de decaimiento. Se obtuvo una tasa de crecimiento exponencial de  $0.05 \pm 0.01$  div día<sup>-1</sup> y un tiempo de generación de 5.86 día<sup>-1</sup> (Fig. 26 y 27, Tabla 2). Los cultivos de *C. malayensis* se caracterizaron por presentar células vegetativas con movimiento y crecimiento lento, poca biomasa celular y agregados mucilaginosos. Por este motivo, la fase exponencial de este tratamiento presentó densidades irregulares, derivado de los agregados celulares que dificultaron la cuantificación de las células.

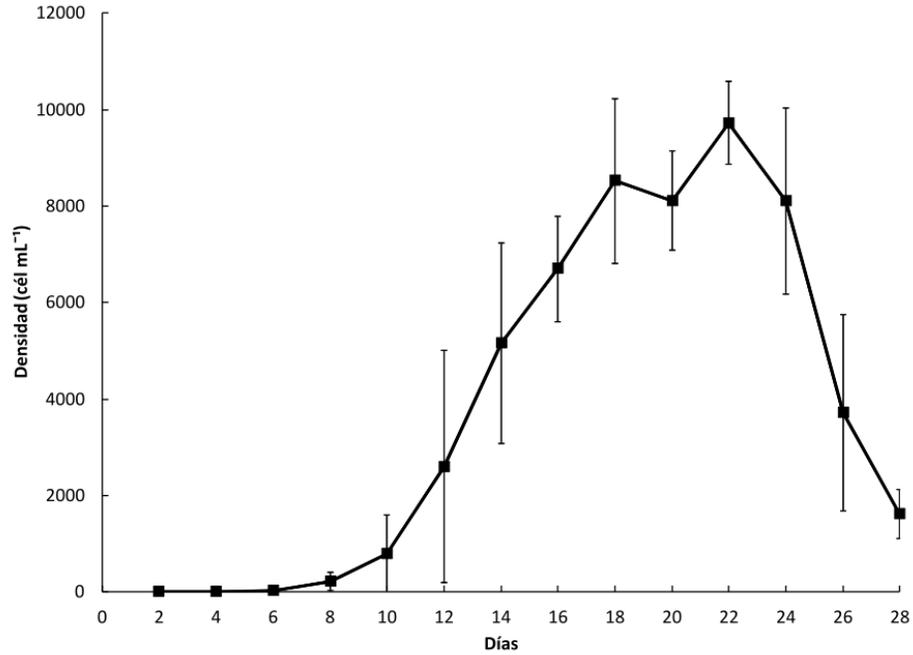


Figura 21. Curva de crecimiento de *A. therrmaeum* (si/ 74) en placas multipozos de 240 µL. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n = 15).

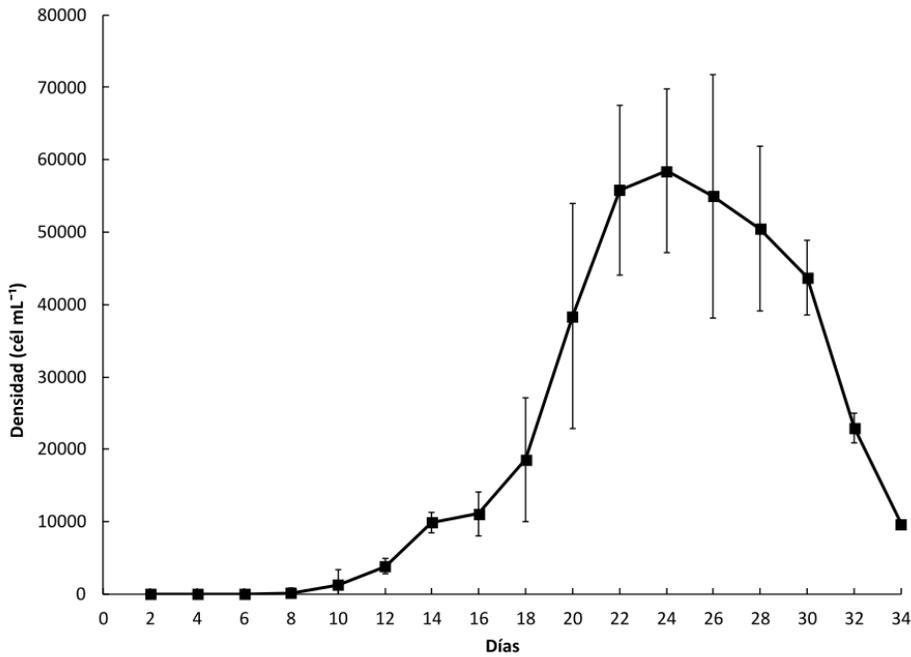


Figura 22. Curva de crecimiento de *A. therrmaeum* (si/ 74) en placas multipozos de 1 mL. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n = 8).

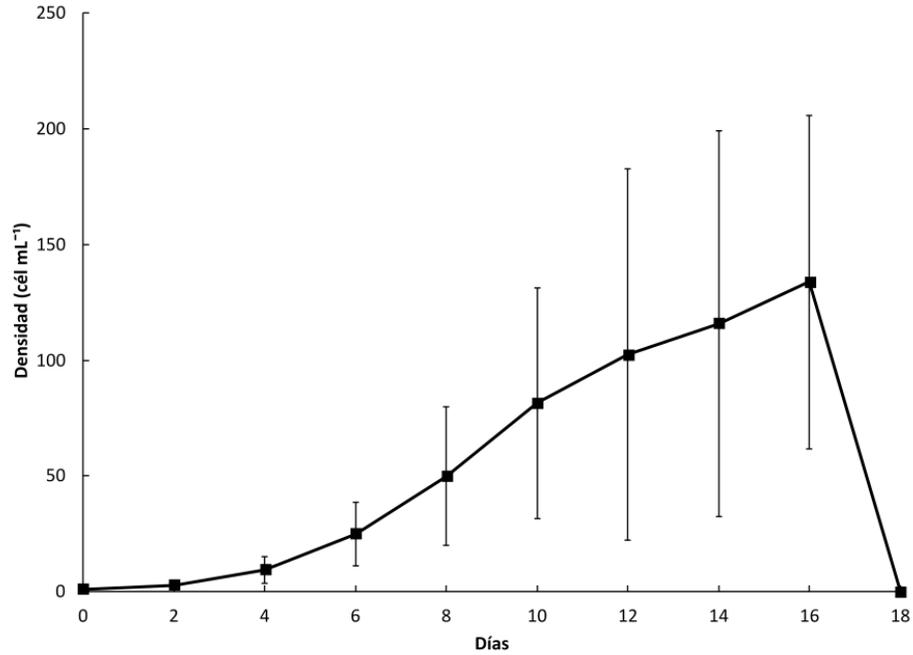


Figura 23. Curva de crecimiento de *C. malayensis* (si/ 75) en placas multipozos de 240  $\mu$ L. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (n = 15).

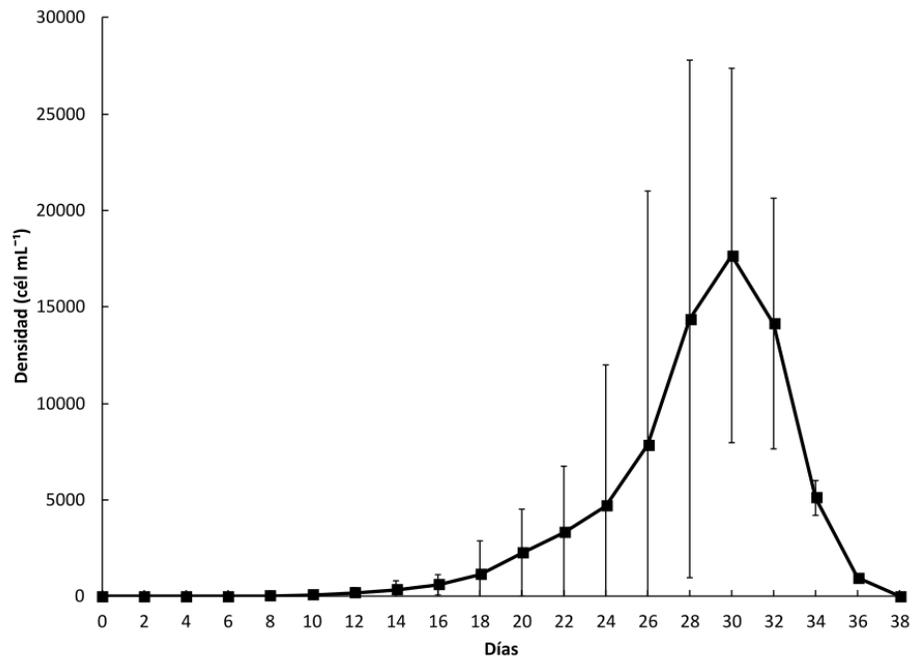


Figura 24. Curva de crecimiento de *C. malayensis* (si/ 75) en placas multipozos 1 mL. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (n = 8).

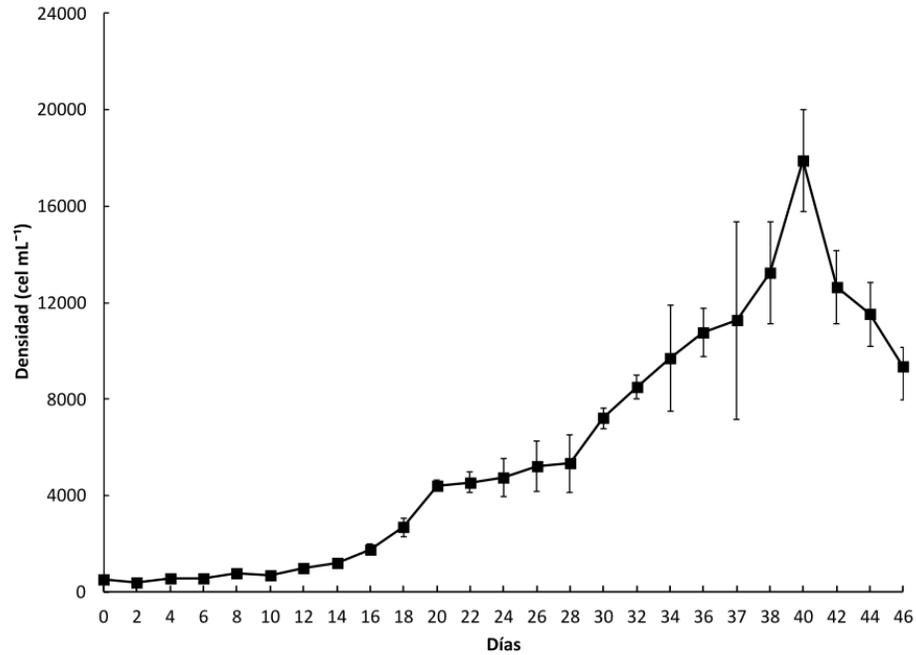


Figura 25. Curva de crecimiento de *A. theraeum* (si/ 74) en matraces Erlenmeyer en 300 mL.  
Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

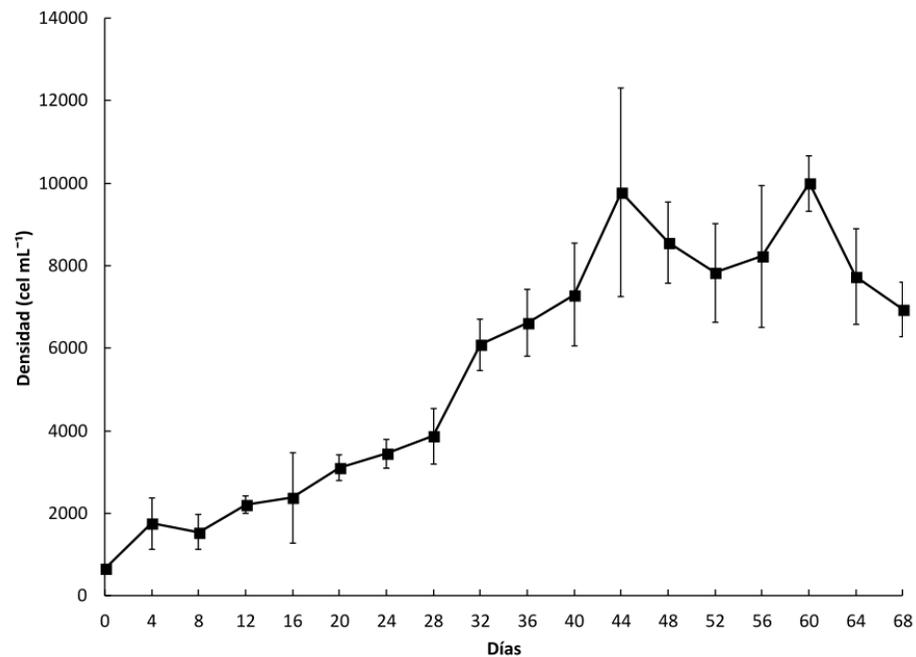


Figura 26. Curva de crecimiento de *C. malayensis* (si/ 75) en matraces Erlenmeyer en 300 mL.  
Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (n = 3).



Tabla 2. Crecimiento de *Amphidinium therrmaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en diferentes volúmenes.

Cepa	Volumen	Densidad máxima del control (cel mL <sup>-1</sup> )	Tasa de crecimiento (div día <sup>-1</sup> )	Tiempo en alcanzar la densidad máxima (días)	Inicio de la fase exponencial (días)	Fin de la fase exponencial (días)	Tiempo de generación (días)
<b><i>Amphidinium therrmaeum</i> (s/i 74)</b>	240 µL	$9.72 \times 10^3 \pm 8.57 \times 10^2$	$0.33 \pm 0.003$	22	8	24	0.92
	1 mL	$5.84 \pm 1.18 \times 10^4$	$0.26 \pm 0.03$	24	14	26	1.17
	300 mL	$1.79 \times 10^4 \pm 2.10 \times 10^3$	$0.1 \pm 0.003$	40	12	42	2.90
<b><i>Coolia malayensis</i> (s/i 75)</b>	240 µL	$134 \pm 72$	$0.43 \pm 0.16$	16	4	18	0.71
	1 mL	$1.77 \pm 1.34 \times 10^4$	$0.24 \pm 0.007$	30	18	32	1.26
	300 mL	$9.78 \pm 2.52 \times 10^3$	$0.05 \pm 0.01$	44	8	64	5.86

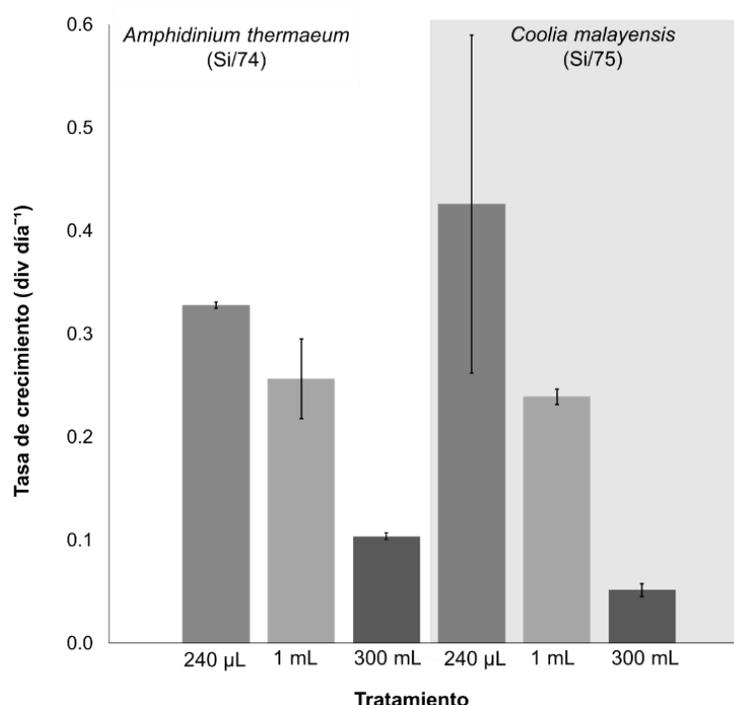


Figura 27. Promedios de las tasas de crecimiento.

*Amphidinium theraeum* (s/i 74) (área blanca) y *Coolia malayensis* (s/i 75) (área gris) en diferentes volúmenes (240 µL, 1 mL y 300 mL) en cultivo. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales (n = 15, 8 y 3, respectivamente).

## 7.4 Interacciones alelopáticas

### 7.4.1 Cálculo del biovolumen

Se calculó el biovolumen para *A. theraeum* s/i 74 y *C. malayensis* s/i 75. El biovolumen de *A. theraeum* fue de  $2,950 \pm 2.39 \mu\text{m}^3$  y de *C. malayensis* fue de  $19,116 \pm 3.23 \mu\text{m}^3$ . A partir de estos valores se estableció una proporción de 6:1 con base en la relación de biovolumen del tamaño celular.

### 7.4.2 Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular

#### 7.4.2.1 Cultivos mixtos en cajas multipozos

Los efectos observados en los cultivos con contacto celular en volúmenes de 200 µL de *A. theraeum* (s/i 74) y *C. malayensis* (s/i 75) se presentan en las Figs. 28 y 29. Las densidades celulares en las proporciones de biovolumen 1:1, 1:2 y 2:1



(*Amphidinium: Coolia*) se siguieron durante 14 días. En todos los tratamientos se observó una dominancia por parte de *A. thermaeum* sobre *C. malayensis*. Se observó una mayor inhibición del crecimiento de *C. malayensis* en la proporción 1:1 y una menor inhibición en las proporciones 1:2 y 2:1.

En la proporción 1:1 (6 células de *Amphidinium*: 1 célula de *Coolia*), *A. thermaeum* y *C. malayensis* presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control. Sin embargo, sus densidades máximas celulares en interacción fueron más bajas al día 14, con  $2.59 \pm 1.06 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> y  $163 \pm 131$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente, con respecto a los controles, que mostraron densidades máximas de  $4.47 \times 10^4 \pm 9.47 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y  $433 \pm 176$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Ambas especies tuvieron una tasa de crecimiento de  $0.4 \pm 0.10$  div día<sup>-1</sup>, tanto en los tratamientos control como en los experimentos de interacción. Al cultivarse juntas en la proporción 1:1, se observó una inhibición en el crecimiento en las dos especies respecto al control con un porcentaje del 47% y 62%, respectivamente, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $F= 0.17$ ,  $P= 0.68 > 0.05$ ;  $F= 0.32$ ,  $P= 0.57 > 0.05$ ) (Fig. 28A).

En la proporción 1:2 (6 células de *Amphidinium*: 2 células de *Coolia*), *A. thermaeum* y *C. malayensis* presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control:  $4.93 \times 10^4 \pm 9.47 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y  $780 \pm 453$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Las densidades máximas celulares en interacción en crecimiento exponencial presentaron valores levemente bajos en comparación con los controles a los 14 días, de  $3.32 \times 10^4 \pm 4.99 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y  $633 \pm 437$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. La tasa de crecimiento en el control y en el experimento de interacción en *A. thermaeum* fue de  $0.4 \pm 0.1$  div día<sup>-1</sup>, y para *C. malayensis* fue de  $0.5 \pm 0.1$  div día<sup>-1</sup>. En ambas especies se observó una ligera inhibición en el crecimiento con un porcentaje del 32% y 18%, respectivamente, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $F= 0.07$ ,  $P= 0.78 > 0.05$ ;  $F= 0.01$ ,  $P= 0.92 > 0.05$ ) (Fig. 28B).

En la proporción 2:1 (12 células de *Amphidinium*: 1 célula de *Coolia*), *A. thermaeum* y *C. malayensis* nuevamente presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control:  $4.72 \times 10^4 \pm 2.04 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> y  $433 \pm 176$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Las máximas densidades celulares en los cultivos de interacción



fueron ligeramente menores con respecto a los controles a los 14 días, de  $3.74 \times 10^4 \pm 1.40 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> y  $367 \pm 216$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. La tasa de crecimiento en el control y en los experimentos de interacción para *A. thermaeum* fue de  $0.5 \pm 0.1$  div día<sup>-1</sup>, y para *C. malayensis* de  $0.4 \pm 0.1$  div día<sup>-1</sup>. En ambas especies se observó un ligero efecto de inhibición en el crecimiento, con un porcentaje del 20% y 15%, respectivamente, pero tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $F= 0.07$ ,  $P= 0.78 > 0.05$ ;  $F= 0.03$ ,  $P= 0.85 > 0.05$ ) (Fig. 28C).

En todos los tratamientos ambas cepas se mantuvieron interactuando. *Amphidinium thermaeum* se caracterizó por colonizar todo el pozo, presentar quistes hialinos grandes (>16 células) en los primeros días de cultivo, y posteriormente, células de vida libre con movimiento. No se observaron efectos, ni cambios morfológicos. Además, conforme aumentaron los días de cultivo, se observó la formación de mucílago en forma de estratos, con células de ambas especies embebidas, con un crecimiento similar al control (Figs. 29A-B, E-J). Por el contrario, *C. malayensis* presentó efectos negativos; disminuyó su densidad celular, así como la producción de mucílago. También disminuyó el movimiento en la mayoría de las células. Se observaron células incoloras con efectos de clorosis y granuladas, y finalmente, en pocos casos se observó lisis celular (Figs. 29G-J). La morfología de las células fue muy diferente comparada con el control (Figs. 29C-D, E-J).

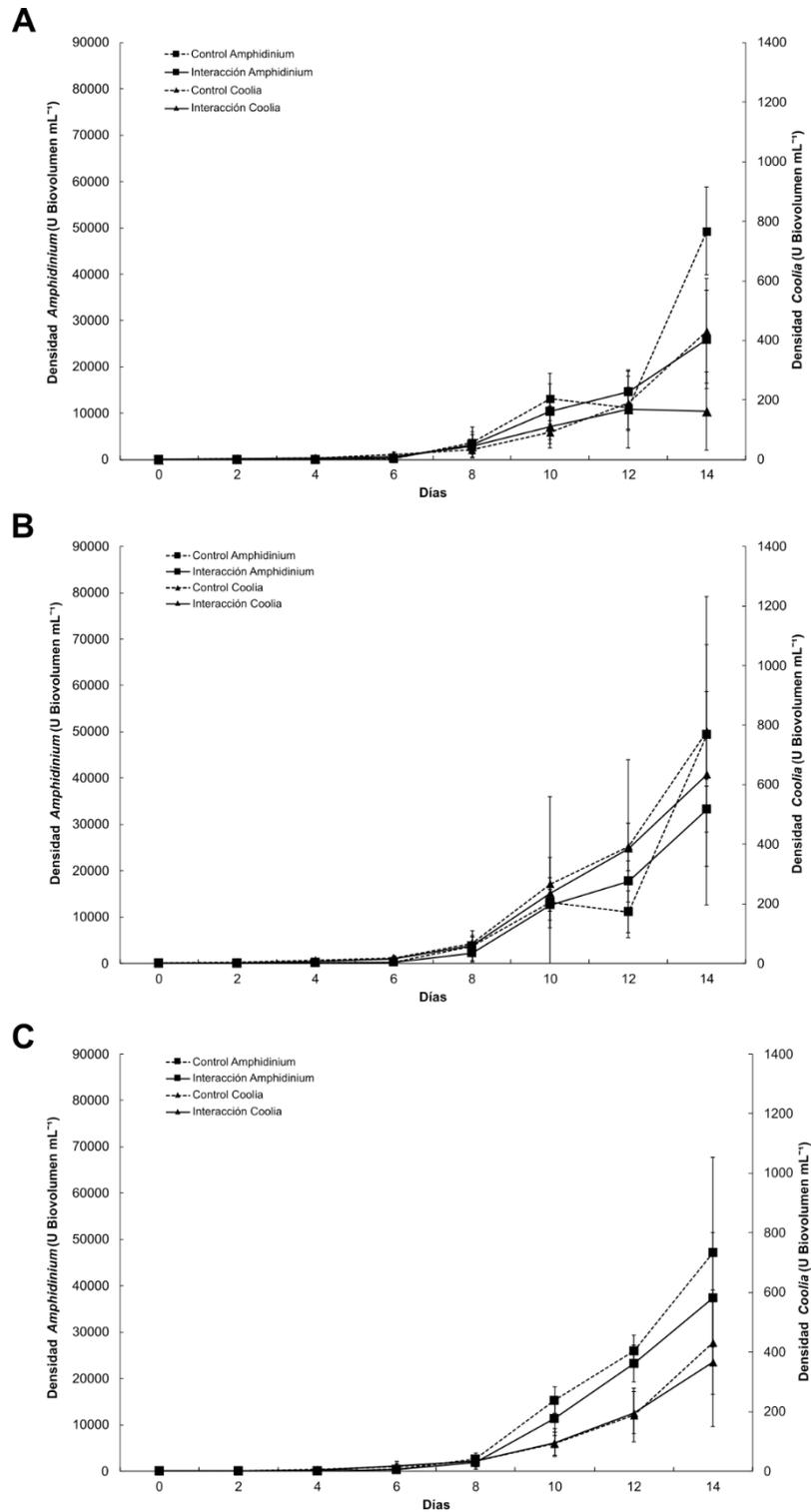


Figura 28. Interacción alelopática en cultivos mixtos de *Amphidinium thermaeum* (s/li 74) y *Coelia malayensis* (s/li 75) en 200  $\mu$ L, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1, B) 1:2 y C) 2:1. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales (n = 15).

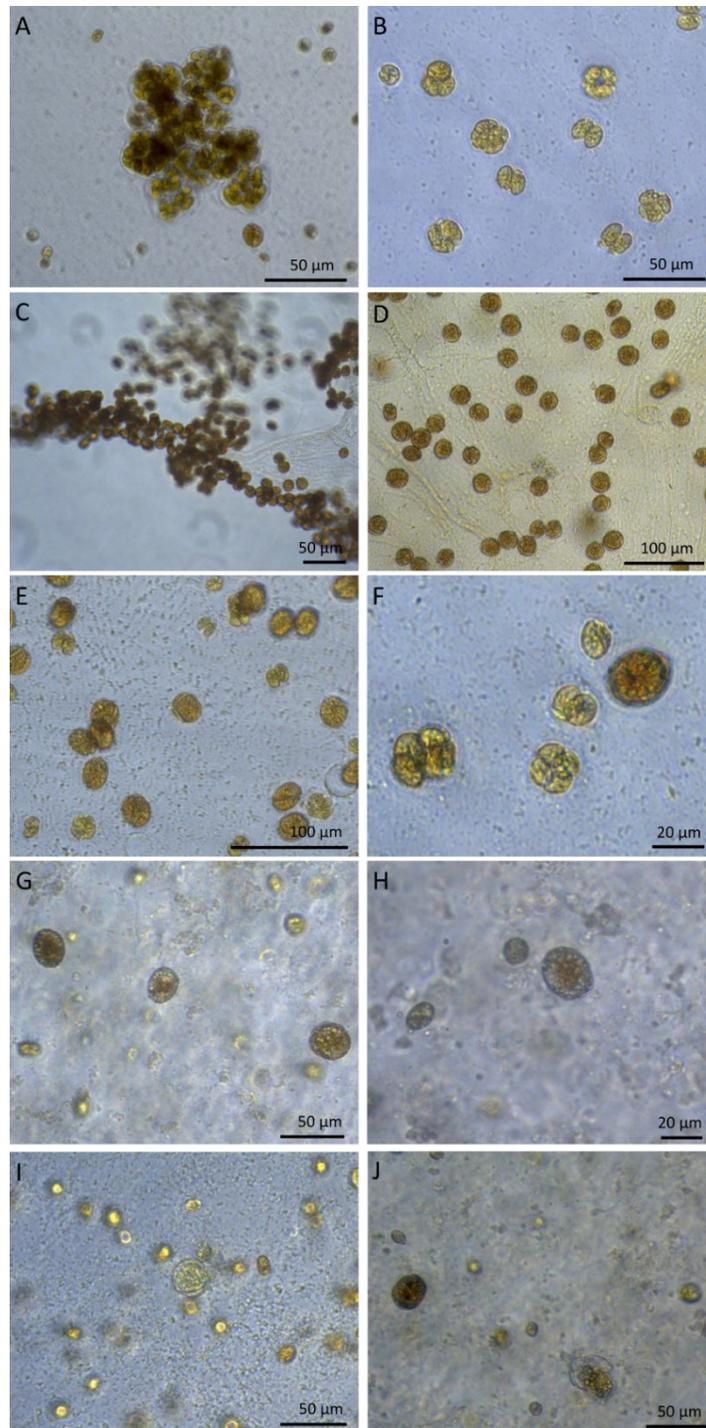


Figura 29. Morfología de *Amphidinium therraeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos mixtos.

A-B) control de *A. therraeum*, C-D) control *C. malayensis*, E-F) ambas especies en cultivos mixtos, G-H) clorosis y gránulos en células de *C. malayensis*, I-J) lisis celular de *C. malayensis*.



#### 7.4.2.2 Cultivos mixtos en matracas de alelopatía

Los efectos observados en los cultivos con contacto celular en volúmenes de 300 mL de *A. thermaeum* (s/i 74) y *C. malayensis* (s/i 75) en las cámaras de alelopatía se presentan en las figuras 30 y 31. Los tratamientos con densidades celulares iniciales en proporciones de biovolumen 1:1 y 1:2 se siguieron durante 14 días de cultivo. Al igual que en los tratamientos en 200  $\mu$ L, se observó dominancia de *A. thermaeum* sobre *C. malayensis*; esta última presentó efectos negativos en la curva de crecimiento y en las tasas de crecimiento a partir del sexto día de cultivo.

En la proporción 1:1, con densidades iniciales de *A. thermaeum* de  $2.72 \times 10^3 \pm 386$  cel mL<sup>-1</sup> y para *C. malayensis* de  $267 \pm 85$  cel mL<sup>-1</sup>, *A. thermaeum* creció con densidades similares al control; presentó una fase de aclimatación en el día dos, posteriormente una fase exponencial hasta los seis días y una fase estacionaria con una densidad máxima de  $1.24 \times 10^4 \pm 1.93 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.15 \pm 0.02$  div día<sup>-1</sup>. En esta especie se observó un efecto de inhibición casi nulo, del 1.5%, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento comparado con el control ( $F= 0.03$ ,  $P= 0.86 > 0.05$ ) (Fig. 30A). Sin embargo, *C. malayensis* presentó una disminución en el crecimiento comparado con el control en el sexto día, con una densidad máxima de  $262 \pm 22$  cel mL<sup>-1</sup> y una tasa de crecimiento de  $0.2 \pm 0.1$  div día<sup>-1</sup>, con un fuerte efecto de inhibición de 85% a los 14 días de cultivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de *C. malayensis* en interacción en comparación con el control ( $F= 10.4$ ,  $P= 0.00 < 0.05$ ) (Fig. 30A).

En la proporción 1:2 con densidades iniciales de *A. thermaeum* de  $3.52 \times 10^3 \pm 5.15 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> y para *C. malayensis* de  $1.18 \times 10^3 \pm 143$  cel mL<sup>-1</sup>, *A. thermaeum* creció con densidades similares al control; presentó una fase de aclimatación hasta el día dos, posteriormente una fase exponencial hasta los ocho días y una fase estacionaria con una densidad máxima de  $1.14 \times 10^4 \pm 1.74 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.24 \pm 0.03$  div día<sup>-1</sup>. En esta especie se observó un ligero efecto de inhibición del 15%, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento, comparado con el control ( $F= 0.35$ ,  $P= 0.86 > 0.05$ ) (Fig. 30B). Por el contrario, *C. malayensis* presentó una densidad



máxima en interacción en el día cuatro, de  $1.60 \times 10^3 \pm 164$  cel mL<sup>-1</sup> y una tasa de crecimiento de  $0.1 \pm 0.0$  div día<sup>-1</sup>. Se presentó una disminución en el crecimiento comparado con el control en el día seis, con una inhibición del 70% a los 14 días de cultivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de *C. malayensis* en interacción con *A. thermaeum*, en comparación con el control ( $F=24.1$ ,  $P=0.00 < 0.05$ ) (Fig. 30B).

En los dos tratamientos ambas especies se mantuvieron interactuando en la fase de aclimatación. Posteriormente, en la fase de crecimiento exponencial *A. thermaeum* incrementó su densidad celular afectando el crecimiento y desarrollo celular de *C. malayensis* (Figs. 31C-H). El dinoflagelado *A. thermaeum* se caracterizó por colonizar toda la cámara de cultivo, formar agregados de quistes hialinos grandes (>16 células) los primeros días de cultivo y posteriormente se observaron células de vida libre activas con movimiento metabólico. Para esta especie, no se observaron efectos ni cambios morfológicos, además, conforme aumentaron los días de cultivo secretó sustancias mucilaginosas. Este patrón de crecimiento también se observó en el cultivo control (Figs. 31A, D-L). Por otra parte, el crecimiento de *Coolia malayensis* se inhibió gradualmente conforme aumentaban los días del cultivo, con una disminución significativa en la densidad celular y producción de mucílago. Se observaron células incoloras y granuladas. Posteriormente, se observó disminución del movimiento (Figs. 31G-H), ecdisis mediante desprendimiento de las tecas (Figs. 31I-J), y finalmente, en la mayoría de los casos, se observó lisis celular (Figs. 31K-L). Los efectos en la forma de las células fueron muy evidentes en comparación con el control (Fig. 31B).

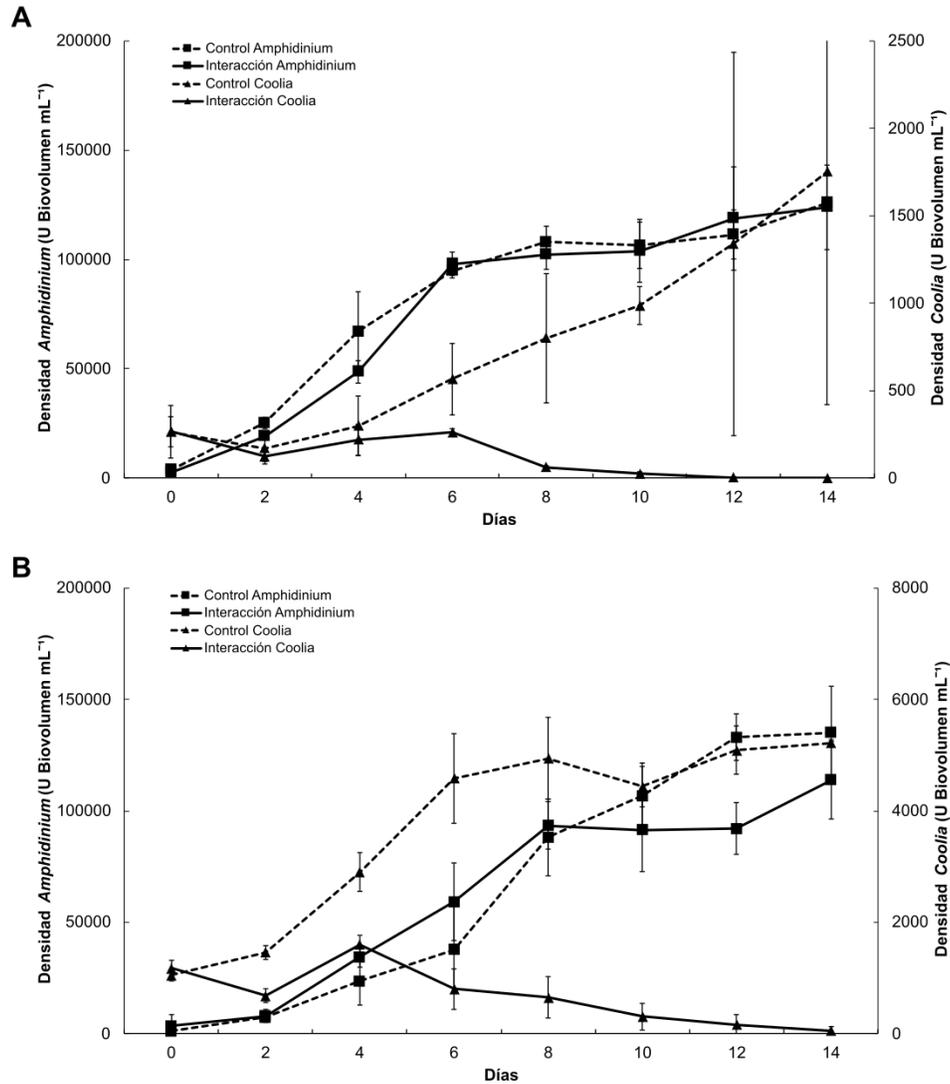


Figura 30. Interacción alelopática en cultivos mixtos de *Amphidinium therraeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en 300 mL, iniciados con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1, B) 2:1. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales (n = 3).

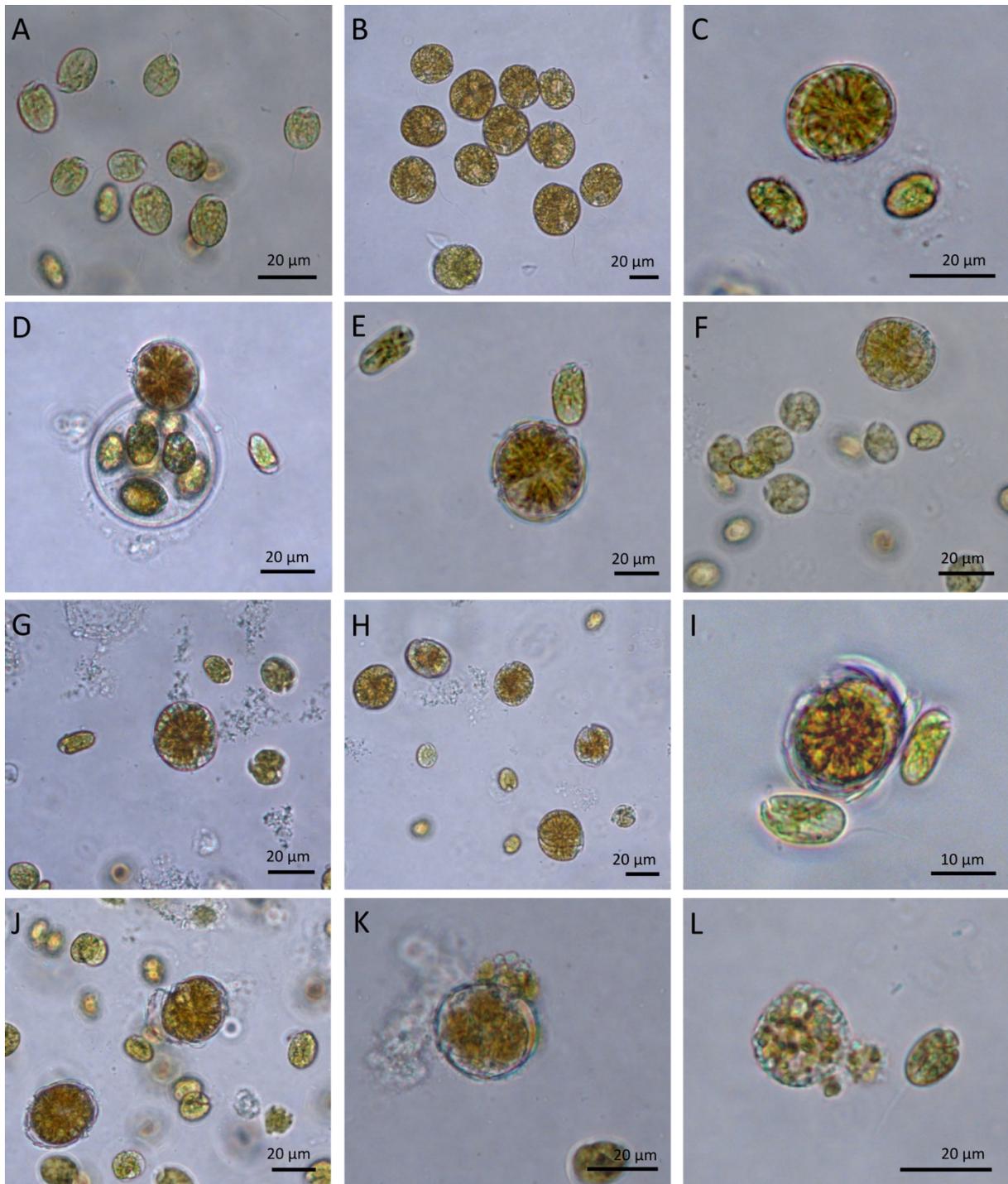


Figura 31. Morfología de *Amphidinium theraeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos mixtos.

A) control de *A. theraeum*, B) control *C. malayensis*, C-F) interacción y coexistencia de las cepas, G-I) clorosis, I-J) ecdisis, K-L) lisis.



### 7.4.3 Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular

#### 7.4.3.1 Cultivos sin contacto celular en matraces de alelopatía

Los efectos en cultivos con exposición de los metabolitos secundarios sin contacto celular en volúmenes de 300 mL de *A. thermaeum* (s/i 74) y *C. malayensis* (s/i 75) se presentan en las figuras 32-35. Estos tratamientos permitieron evidenciar los efectos de la producción de sustancias aleloquímicas sin interacción directa entre las células, mediante la difusión de los metabolitos secundarios producidos en cada una de las cámaras de cultivo por separado.

El tratamiento con las densidades celulares en la proporción de biovolumen 1:1, separados con la membrana de 2.5  $\mu\text{m}$  se siguió durante diez días, y el tratamiento con la proporción 2:1 separados por una malla de 5  $\mu\text{m}$ , durante 14 días. En ambos se presentó un patrón de crecimiento similar en la fase de aclimatación y principios de la fase exponencial, sin embargo, por cuestiones metodológicas se modificaron los efectos de la proporción 2:1, los cuales se describirán más adelante.

En la proporción 1:1 con densidades iniciales de *A. thermaeum* de  $3.13 \times 10^3 \pm 329 \text{ cel mL}^{-1}$  y para *C. malayensis* de  $810 \pm 107 \text{ cel mL}^{-1}$ , ambas especies presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control. Las densidades máximas se presentaron a los diez días del cultivo, con un valor de  $9.48 \times 10^4 \pm 4.77 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ , con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.22 \pm 0.036 \text{ div día}^{-1}$  para *A. thermaeum*, y para *C. malayensis* una densidad máxima de  $2.78 \times 10^4 \pm 2.39 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$  con una tasa de crecimiento de  $0.5 \pm 0.00 \text{ div día}^{-1}$ . Se observó una ligera inhibición en el crecimiento de *A. thermaeum*, con un porcentaje del 15%. Por el contrario, *C. malayensis* no presentó inhibición en su crecimiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ( $F= 0.04$ ,  $P= 0.85 > 0.05$ ;  $F= 0.00$ ,  $P= 0.9 > 0.05$ , respectivamente) (Fig. 32A).

La cepa de *A. thermaeum* se caracterizó por colonizar el espacio de la cámara correspondiente al cultivo, formó agregados de quistes hialinos grandes (>16 células) los primeros días de cultivo. Posteriormente se observaron células de vida libre, activas y con movimiento metabólico, y conforme aumentaron los días de cultivo, secreción de mucílago. Este patrón de crecimiento se observó también en el cultivo control (Figs.



33A-B). De igual modo, *C. malayensis* presentó crecimiento similar al control; se observaron células vegetativas de vida libre en movimiento, células en reproducción y formación de grandes matrices mucilaginosas con células adheridas (Figs. 33C-D).

En la proporción 1:2 se inició el experimento con densidades iniciales de *A. thermaeum* de  $1.36 \times 10^3 \pm 262$  cel mL<sup>-1</sup> y para *C. malayensis* de  $2.07 \times 10^3 \pm 206$  cel mL<sup>-1</sup>, *A. thermaeum* presentó densidades similares al control: una fase de aclimatación hasta el segundo día, posteriormente una fase exponencial hasta los doce días con una densidad máxima de  $1.10 \times 10^5 \pm 1.01 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> y una tasa de crecimiento de  $0.21 \pm 0.02$  div día<sup>-1</sup>. En esta especie se observó una inhibición del 15% y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento, en comparación con el control ( $F= 0.04$ ,  $P= 0.95 > 0.05$ ) (Fig. 34B). Sin embargo, *C. malayensis* presentó disminución en el crecimiento en comparación con el control en el día cuatro, con una densidad máxima de  $361 \times 10^3 \pm 806$  cel mL<sup>-1</sup> y una tasa de crecimiento de  $0.08 \pm 0.06$  div día<sup>-1</sup>, con un efecto de inhibición del 45% a los 14 días de cultivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento en interacción, comparado con el control ( $F= 15.68$ ,  $P= 0.001 < 0.05$ ) (Fig. 34B). Este efecto en el día cuatro fue consecuencia de que *A. thermaeum* logró atravesar por la malla de nylon de 5 µm hacia el otro lado de la cámara, posiblemente por el movimiento metabólico, además presentó un tamaño celular en cultivo sin contacto con una longitud de 10 a 19 µm ( $\pm 2.05$ ,  $n = 32$ ) y de 7 a 14 µm de ancho ( $\pm 1.75$ ,  $n = 32$ ), y una relación largo-ancho (L/A) de 0.93 a 2.18 µm ( $\pm 0.32$ ,  $n = 32$ ). A partir de ese momento, *A. thermaeum* comenzó a colonizar de manera exponencial e inmediata el otro lado de la cámara, y consecuentemente, provocó la inhibición del crecimiento de *C. malayensis*.

En *A. thermaeum* se observó un patrón de crecimiento similar al control; se caracterizó por colonizar el espacio de la cámara correspondiente al cultivo, formó agregados de quistes hialinos grandes los primeros días de cultivo y posteriormente se observaron células de vida libre activas con movimiento metabólico (Fig. 35A). Sin embargo, *C. malayensis* presentó un crecimiento similar al control en los primeros días de cultivo con células vegetativas en movimiento, posteriormente por efecto de la colonización de *A. thermaeum*, se observó daño celular con clorosis, ecdisis y lisis (Fig.



35C-D).

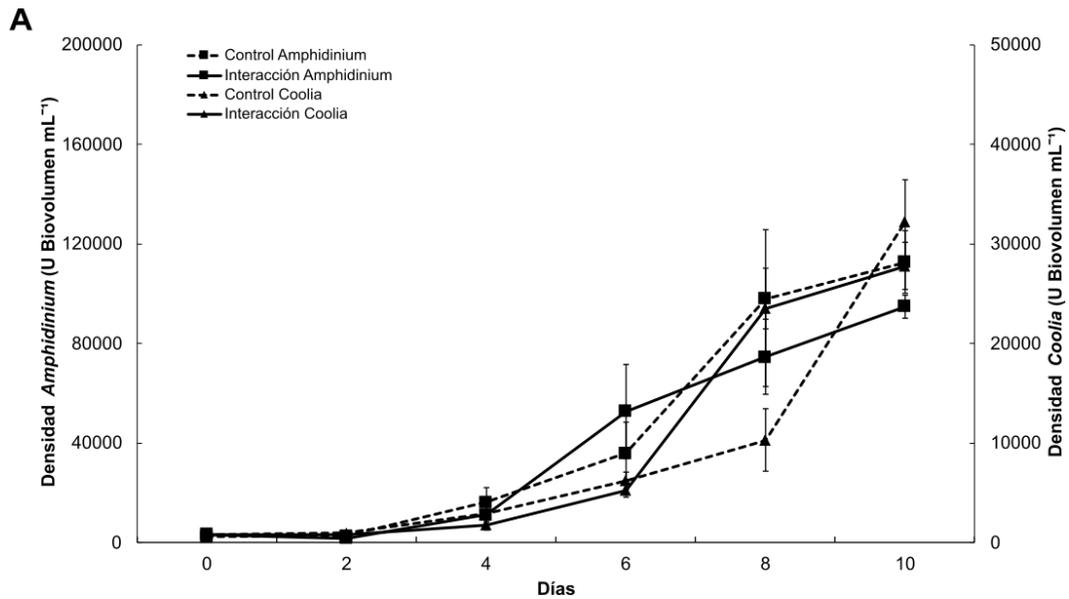


Figura 32. Cultivos sin contacto celular de *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en 300 mL, separados por la membrana de 2.5  $\mu$ m, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad): A) 1:1. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales (n = 3).

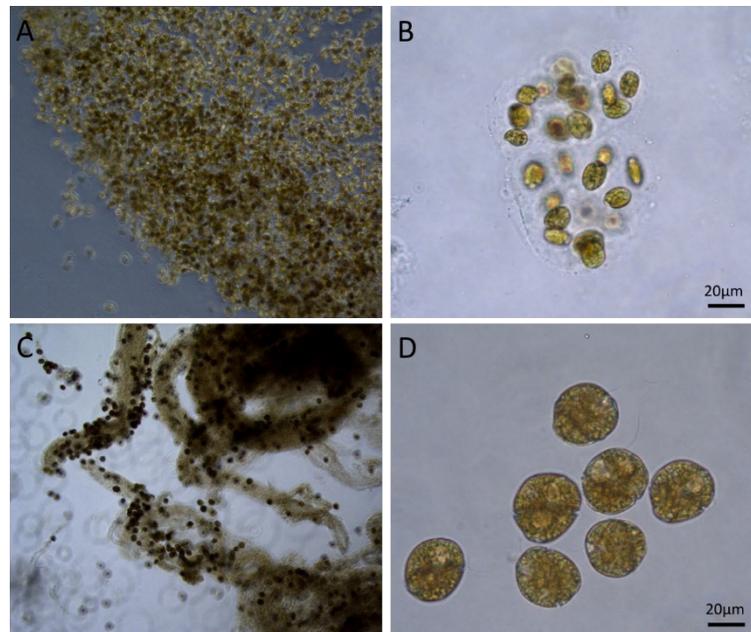


Figura 33. Morfología de *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos sin contacto celular en proporción de biovolumen 1:1. A) agregado de células vegetativas en movimiento de *A. thermaeum*, B) agregado de quistes hialinos de *A. thermaeum*, C) agregación mucilaginosa de *C. malayensis*, D) células vegetativas en movimiento de *C. malayensis*.

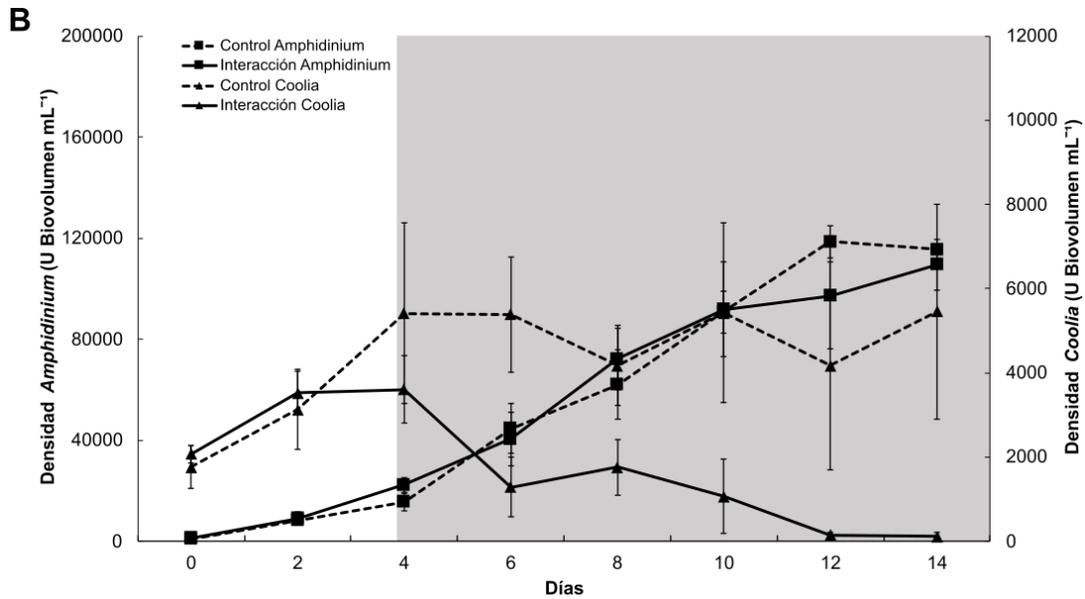


Figura 34. Cultivos sin contacto celular *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en 300 mL, con proporciones de biovolumen 6:1 (tamaño/densidad). B) 1:2. El área gris a partir del día cuatro representa el paso de *A. thermaeum* a través de la malla de 5  $\mu\text{m}$  hacia la cámara de *C. malayensis* y el efecto de colonización. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales ( $n = 3$ ).

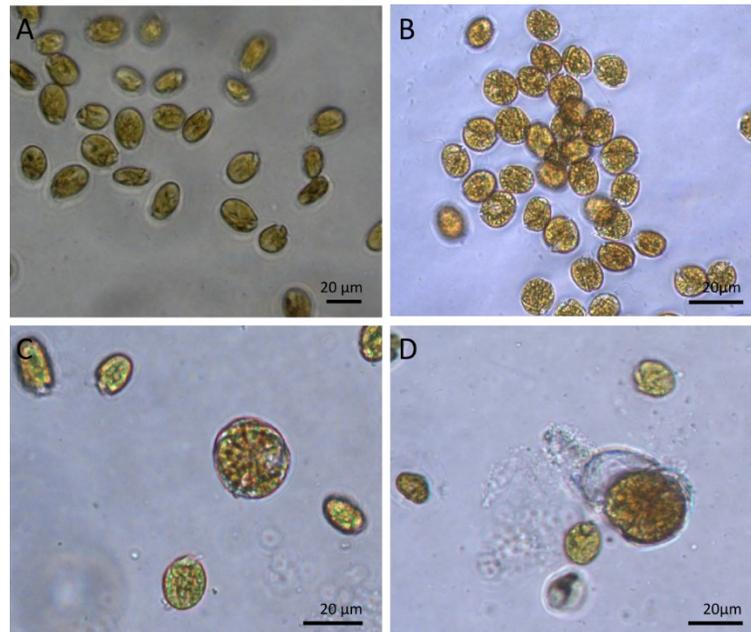


Figura 35. Morfología de *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos sin contacto celular en proporción 1:2. A) control de *A. thermaeum*, B) control *C. malayensis*, C) interacción y coexistencia de las cepas posterior al paso a través de la malla de 5  $\mu\text{m}$  de *A. thermaeum*. D) ecdisis de *C. malayensis*.



#### 7.4.4 Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados

##### 7.4.4.1 Cultivos con filtrados celulares en matraces de alelopatía

Los efectos observados en los cultivos de *C. malayensis* (s/i 75) con exposición a filtrados celulares de *A. thermaeum* (s/i 74) y *C. malayensis* a una concentración de 50 y 100% en las cámaras de alelopatía en volúmenes de 300 mL, se presentan en las figuras 30-41. Los tratamientos con concentración de 50% y 100% se siguieron durante 14 días de cultivo. Se observaron diferentes efectos sobre la morfología de *C. malayensis* en cada tratamiento. En los filtrados celulares de *C. malayensis* de ambos tratamientos no se observó inhibición del crecimiento, sin embargo, en los filtrados celulares al 100% de *A. thermaeum* se observó inhibición del crecimiento.

Los cultivos con exposición a los filtrados celulares de 50% se iniciaron con una densidad celular de  $948 \pm 164$  cel mL<sup>-1</sup> de *C. malayensis*. Los filtrados celulares se iniciaron con densidades celulares totales de  $1.06 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> de *A. thermaeum* y de  $1.13 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> de *C. malayensis*. Los cultivos de *C. malayensis* con exposición presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control, el cual presentó una densidad máxima de  $5.21 \times 10^3 \pm 69$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.1 \pm 0.007$  div día<sup>-1</sup>. En todos los cultivos, *C. malayensis* presentó una fase de aclimatación en el día dos, posteriormente una fase exponencial hasta los ocho días y una fase estacionaria hasta los 14 días de cultivo. El cultivo expuesto al filtrado celular de *A. thermaeum* al 50% presentó una densidad máxima de  $6.29 \times 10^3 \pm 437$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.08 \pm 0.003$  div día<sup>-1</sup>. Se observó un incremento en el crecimiento del 20% con respecto al control y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento comparado con el control ( $F= 0.01$ ,  $P= 0.94 > 0.05$ ). El cultivo expuesto al filtrado celular de *C. malayensis* al 50% presentó una densidad máxima de  $6.07 \times 10^3 \pm 394$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.07 \pm 0.01$  div día<sup>-1</sup>. Se observó un incremento en el crecimiento del 16% con respecto al control y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento comparado con el control ( $F= 0.01$ ,  $P= 0.99 > 0.05$ ) (Fig. 36A). Sin embargo, la morfología de *C. malayensis* fue muy diferente comparada con el control (Figs. 37A-C), en ambos tratamientos con



exposición a los filtrados celulares se observaron efectos sobre la morfología de las células de *C. malayensis*. Se observaron células en movimiento con protuberancias, deformaciones, aumento de tamaño y efectos sobre las células en fisión binaria, y además se formaron triadas celulares (Figs. 37).

Los cultivos con exposición a los filtrados celulares a una concentración de 100% se iniciaron con una densidad celular de  $1.22 \times 10^3 \pm 244$  cel mL<sup>-1</sup> de *C. malayensis*. Los filtrados celulares se iniciaron con densidades celulares totales de  $9.77 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> de *A. thermaeum* y de  $1.30 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> de *C. malayensis*. Los cultivos de *C. malayensis* con exposición presentaron un patrón de crecimiento exponencial similar al control, el cual presentó una densidad máxima de  $8.95 \times 10^3 \pm 689$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.1 \pm 0.02$  div día<sup>-1</sup>. El cultivo expuesto al filtrado celular de *A. thermaeum* al 100% presentó una densidad máxima de  $2.54 \times 10^3 \pm 16$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.06 \pm 0.004$  div día<sup>-1</sup>. Se observaron efectos de inhibición en el crecimiento hasta el día cuatro del 72% y diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento comparado con el control ( $F= 5.1$ ,  $P= 0.02 < 0.05$ ). El cultivo de *C. malayensis* expuesto a su propio filtrado celular presentó una fase de aclimatación en el día cuatro, posteriormente una fase exponencial hasta los diez días y una fase de decaimiento hasta los 12 días de cultivo. El cultivo presentó una densidad máxima de  $9.14 \times 10^3 \pm 315$  cel mL<sup>-1</sup>, con una tasa de crecimiento exponencial de  $0.15 \pm 0.01$  div día<sup>-1</sup>. Se observó un incremento en el crecimiento del 2% y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento comparado con el control ( $F= 5.1$ ,  $P= 0.93 > 0.05$ ) (Fig. 38B). Sin embargo, la morfología de *C. malayensis* fue muy diferente comparada con el control (Fig. 39). En el cultivo expuesto a los filtrados celulares de *A. thermaeum*, se observaron células con daño celular con clorosis, ecdisis y lisis. Posteriormente, las células que resistieron este efecto después del día cuatro, presentaron fuertes pigmentaciones, granulaciones, deformaciones y efectos sobre las células en fisión binaria (Fig. 40). Por el contrario, en el cultivo expuesto a los filtrados celulares de *C. malayensis*, se observaron la formación de quistes temporales, efectos sobre las células en fisión binaria y formaron triadas celulares, células en movimiento con protuberancias, deformaciones y aumento de tamaño (Fig. 41).

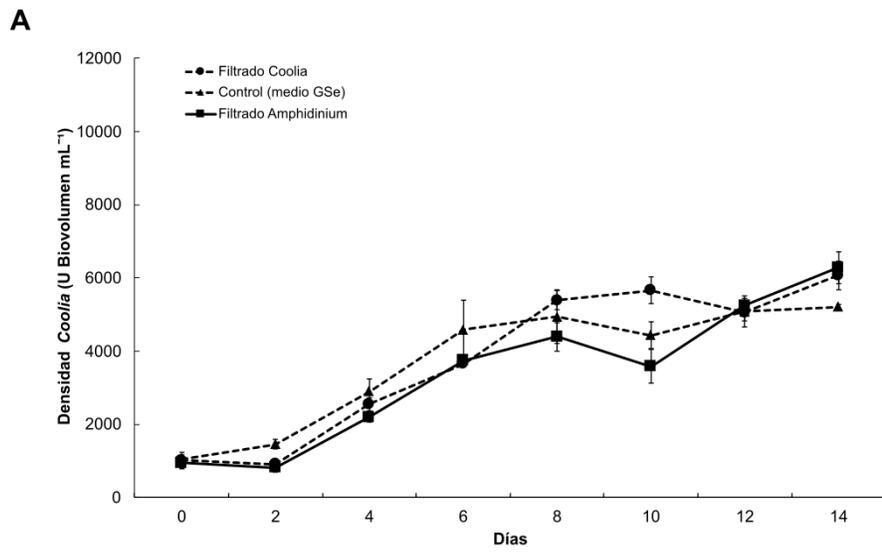


Figura 36. Cultivos con exposición a filtrados celulares de *Amphidinium thermaeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en 300 mL, a una concentración de 50%. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales (n = 3).

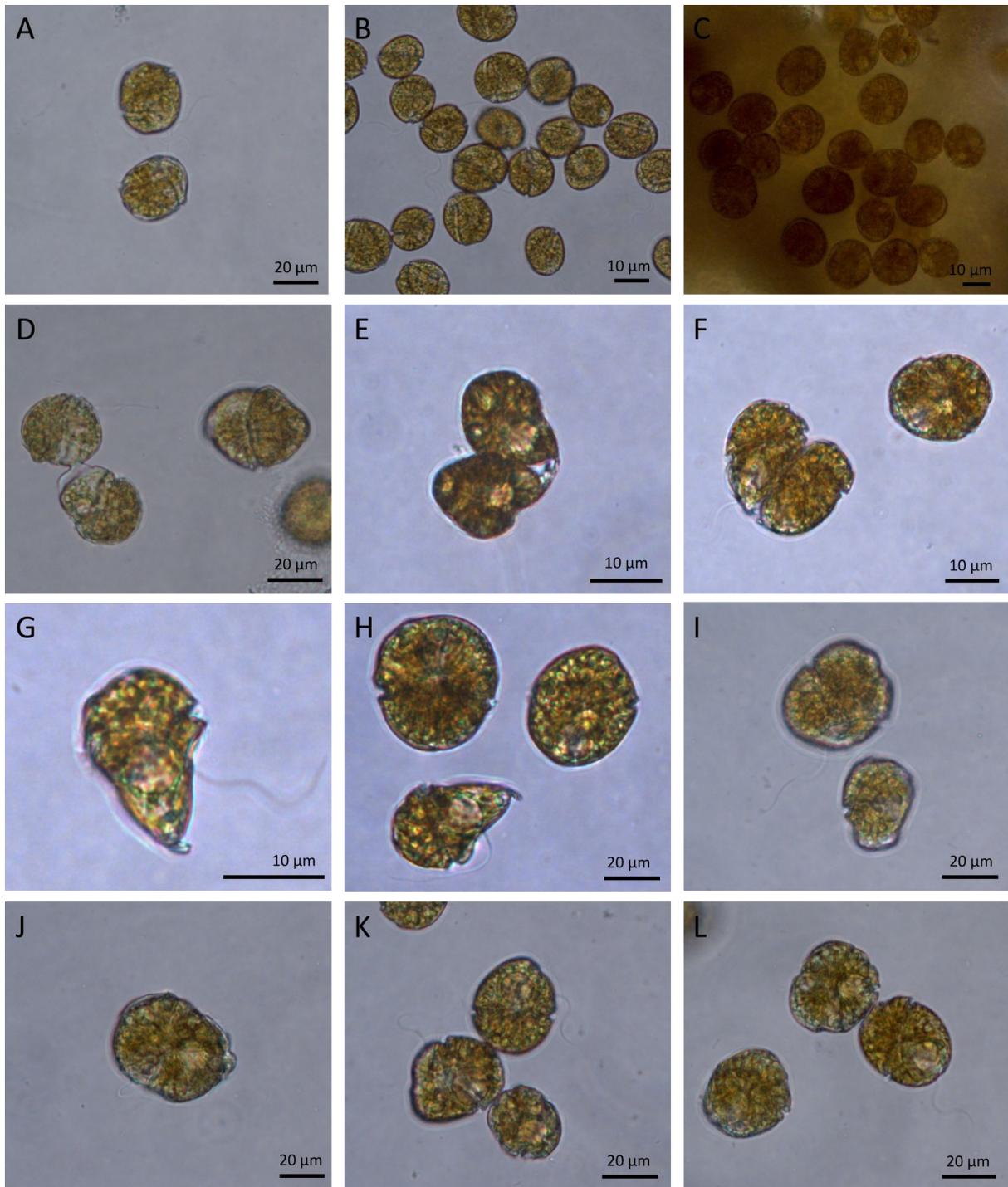


Figura 37. Morfología de *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 50% de *A. thermaeum* y *C. malayensis*. A-B) células de *C. malayensis* en el cultivo control en medio GSe, D-F) células con protuberancias en reproducción mediante fisión binaria, G-L) células vegetativas con protuberancias, morfología amorfa y aumento de tamaño. \*Todas morfologías se presentaron en ambos cultivos con exposición.

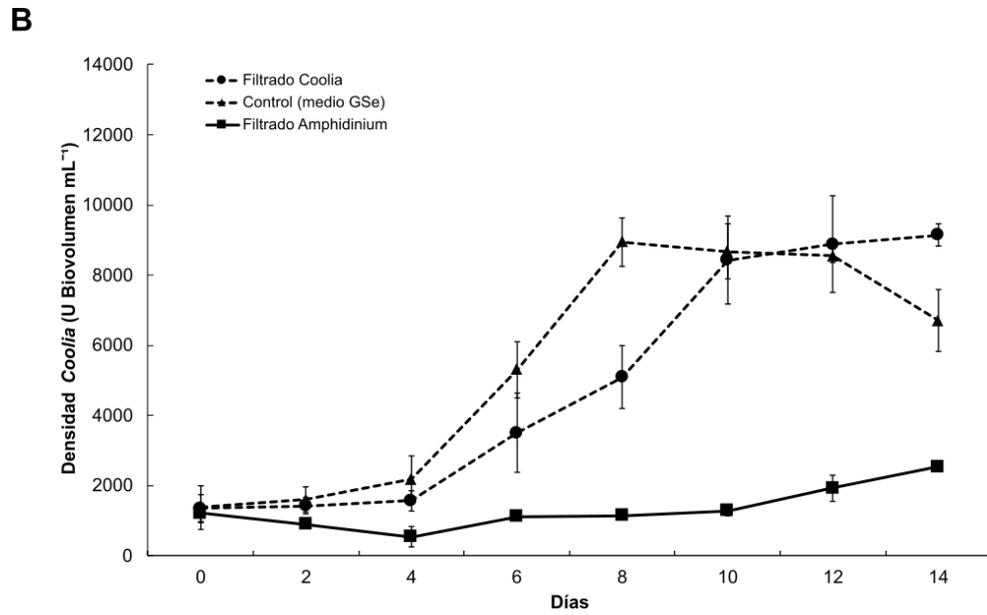


Figura 38. Cultivos con exposición a filtrados celulares de *Amphidinium theraeum* (s/i 74) y *Coolia malayensis* (s/i 75) en 300 mL, a una concentración de 50%. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar en líneas verticales ( $n = 3$ ).

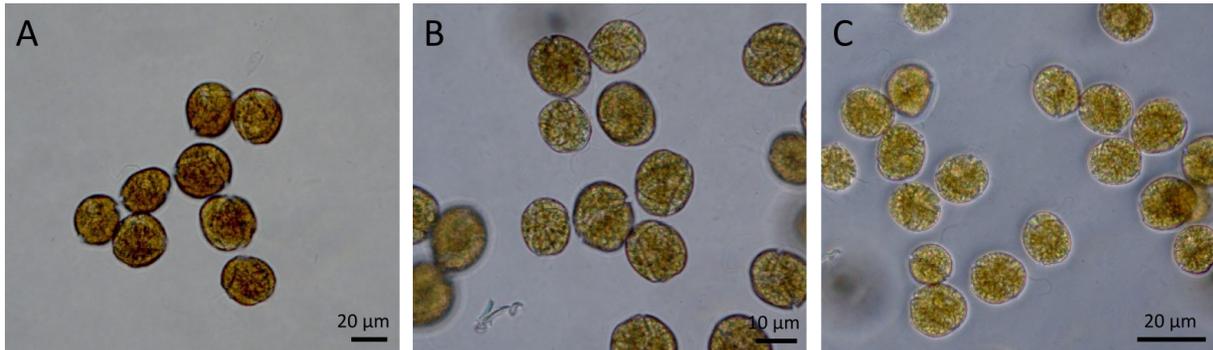


Figura 39. Morfología de *Coolia malayensis* (s/i 75) en el cultivo control en medio GSe. A-C) células vegetativas en movimiento.

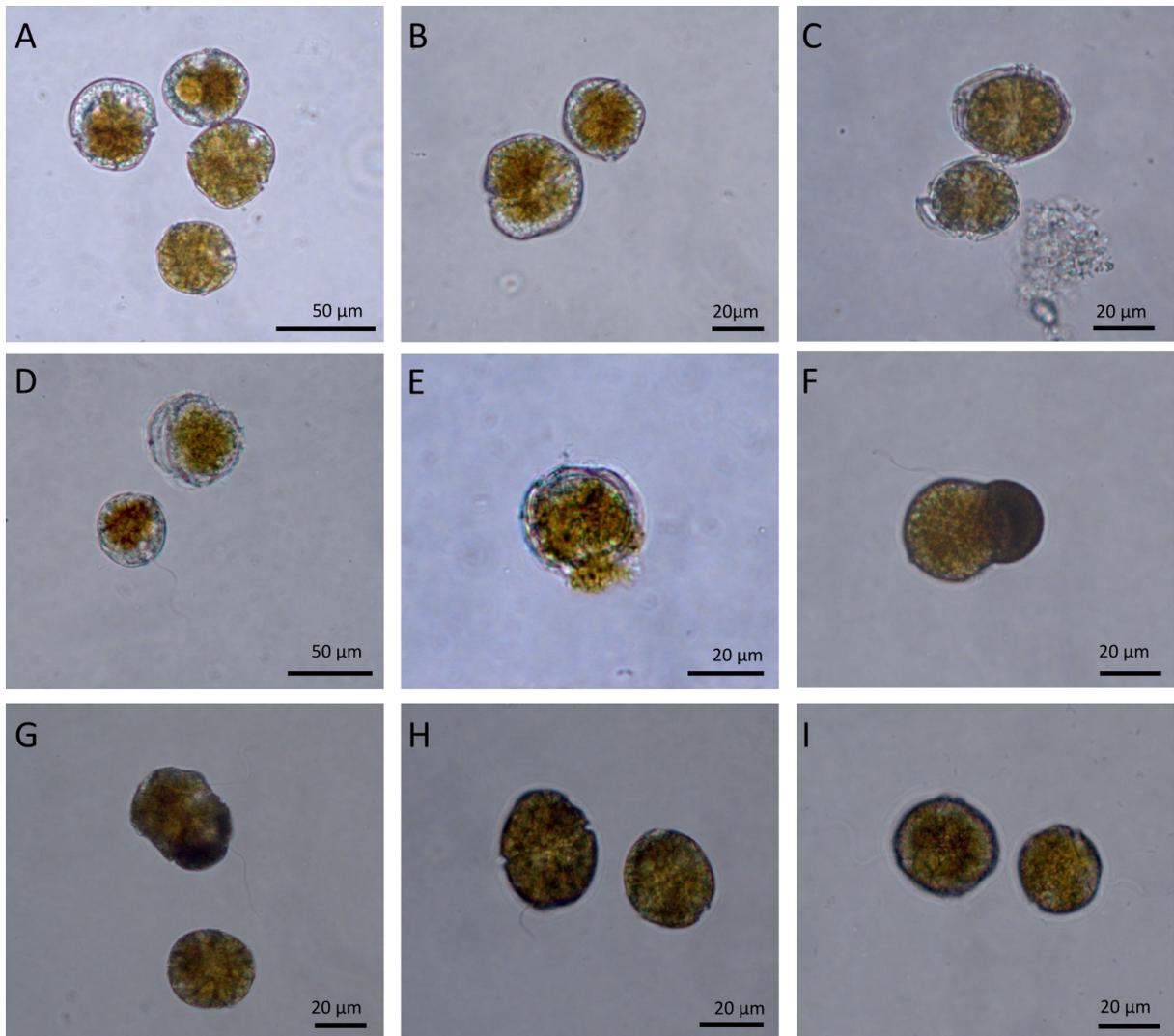


Figura 40. Morfología de *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 100% de *A. theraeum*. A-B) células de *C. malayensis* con efectos de clorosis, C) ecdisis, D-E) células con efectos de lisis celular, F) célula en con efectos en el proceso de fisión binaria, G-I) células vegetativas con mayor pigmentación y granulaciones, morfología amorfa y aumento de tamaño.

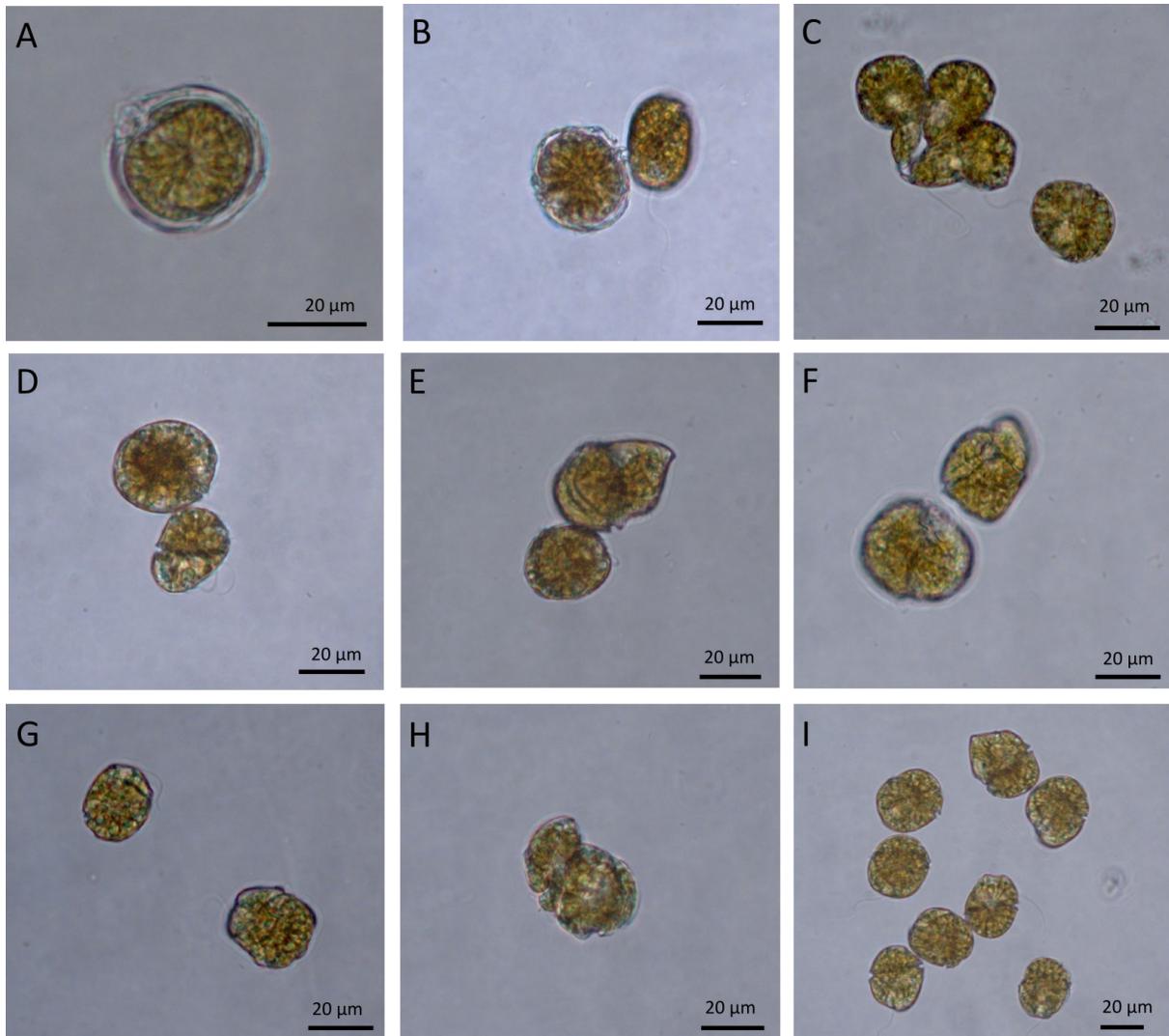


Figura 41. Morfología de *Coolia malayensis* (s/i 75) en cultivos con exposición a filtrados celulares a una concentración de 100% de *C. malayensis*. A-B) quistes temporales de *C. malayensis*, C) células con protuberancias en reproducción mediante fisión binaria, D-L) células vegetativas con protuberancias, morfología amorfa y aumento de tamaño.



## VIII. DISCUSIÓN

Los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos potencialmente toxigénicos son importantes a escala mundial debido a sus posibles impactos sanitarios, económicos y ecológicos (Berdalet *et al.*, 2017). Si bien, comprender las interacciones bióticas interespecíficas e intraespecíficas en los microhábitats bentónicos marinos es complejo (Yong *et al.*, 2018), se necesita integrar información del papel que desempeñan las especies en la estructuración de las comunidades y su dispersión, mediada por los metabolitos secundarios (Allen *et al.*, 2016; Poulin *et al.*, 2020). Por ello, es fundamental documentar la diversidad de dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos toxigénicos de un ecosistema mediante su identidad morfológica y molecular. Así como comprender su autoecología, su forma de crecimiento, la fisiología celular, composición y abundancia en sus microhábitats en donde coexistencia con otras especies. Todo lo anterior proporciona información para investigar *in situ* y/o *in vitro* los procesos y mecanismos que desarrollan las especies de manera individual o en conjunto para comprender sus interacciones químicas, ecológicas y biológicas (Pavaux *et al.*, 2020; Poulin *et al.*, 2020).

Por consiguiente, este estudio compiló información sobre los aspectos taxonómicos, morfológicos y reproductivos de las cepas s/i 73 y s/i 74 del género *Amphidinium*, y las cepas del género *Coolia* s/i 74 y s/i 76 procedentes de la Bahía de La Paz en el Golfo de California. También se realizaron las filogenias moleculares se obtuvo información sobre las curvas de crecimiento y se realizaron experimentos de interacción alelopática.

### 8.1 Identificación morfológica y determinación taxonómica

Los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos potencialmente toxigénicos tienen una amplia distribución, desde las zonas tropicales, subtropicales y ecosistemas templados; además están presentes en hábitats dulceacuícolas, salobres y marinos (GEOHAB, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014; Leaw *et al.*, 2016; Karafas *et al.*, 2017). El conocimiento sobre la diversidad de especies dentro de este grupo ha aumentado en los últimos años, con la descripción de nuevas especies y géneros (Karafas *et al.*, 2015, 2017; David *et al.*, 2020). La clasificación taxonómica constantemente cambia



dentro de este grupo, debido a su alta plasticidad fenotípica. Además, se han evidenciado complejos de especies y especies crípticas (Murray *et al.*, 2012; Leaw *et al.*, 2016). En el presente estudio las descripciones de las especies se basaron en caracteres morfológicos específicos para los géneros *Amphidinium* y *Coolia*, a partir de cultivos monoclonales.

### 8.1.1 Género *Amphidinium*

Se confirmó morfológicamente que las cepas s/i 73 y s/i 74 se reconocen como morfoespecies pertenecientes al género *Amphidinium*. La morfología del género *Amphidinium* ha sido redefinida por Murray & Patterson (2002) y Jørgensen *et al.* (2004a), en donde agruparon a los dinoflagelados bentónicos atecados o endosimbiontes, que presentan un cuerpo dorsoventralmente aplanado, con o sin la presencia de cloroplastos, y se caracterizan por tener un epicono triangular desviado hacia la izquierda. Sin embargo, al considerar solo la forma, el tamaño y la inserción flagelar como caracteres de identificación, no es posible distinguir entre las especies, debido a su alto grado de similitud entre las características morfológicas compartidas (Murray *et al.*, 2012). Por esta razón, para su identificación se utilizan diferentes técnicas de microscopía: fotónica, fluorescencia, confocal, electrónica de barrido y transmisión, que proporcionan información con un alto nivel de resolución para reconocer los caracteres específicos de las especies (Barlow & Triemer, 1988; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Tamura *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013).

La cepa s/i 73 se identificó como *Amphidinium* sp., debido a que no se obtuvo información molecular para corroborar su identidad. Sin embargo, de acuerdo con la descripción propuesta por Murray *et al.* (2004) y Moreira-González *et al.* (2019), este morfotipo presenta afinidad con *A. operculatum*, por las similitudes en la forma celular ovalada o de pera. También tiene los mismos intervalos en el tamaño (L= 29-50  $\mu\text{m}$ , A= 21-28  $\mu\text{m}$ ), forma plana del epicono (de 7 a 10  $\mu\text{m}$ ), la inserción flagelar localizada en el antápice de la célula, lejos del epicono, carece de pirenóide y de movimiento metabólico.

La cepa s/i 74 se identificó como *A. thermaeum*. Este morfotipo se caracterizó morfológicamente de acuerdo con las descripciones propuestas por Dolapsakis &



Economou-Amilli (2009) y Murray *et al.* (2012). Además, se corroboró su identidad con información molecular. Los caracteres morfológicos diagnósticos para distinguir a *A. thermaeum* son variables; desde la forma de la célula, que va de esférica a ovalada, hasta presentar los mismos intervalos en el tamaño ( $L= 10-30 \mu\text{m}$ ,  $A= 8-20\mu\text{m}$ ), la forma del epicono como una lengua hacia el lado izquierdo, antápices convexos o redondos, la presencia de un cloroplasto grande lobulado, un pirenoide y púsculas, y una característica particular es que presentar movimiento metabólico. Estas características dependen del estado y madurez de la célula (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2017). Por consiguiente, se ha reportado que esta especie se puede confundir fácilmente con *A. carterae* y *A. massartii*, las cuales se distinguen por la forma del cloroplasto reticulado de *A. carterae*, en comparación de la forma lobulada que presentan las otras dos especies, además de la posición de la inserción flagelar ( $\sim 0.6$ ) del antápice y la presencia de dos púsculas de *A. thermaeum*, así como el tipo de reproducción y movimiento (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2017; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2019).

Dolapsakis & Economou-Amilli (2009), observaron movimiento metabólico en las células de vida libre de *A. thermaeum* procedentes del Golfo de Thermaikos en Grecia. En el presente estudio, la cepa s/i 74 se caracterizó por presentar el mismo comportamiento. El movimiento metabólico se identifica por la plasticidad de las células al ser metamórficas; pueden alargarse o contraerse mientras la célula se encuentra nadando. Este comportamiento ha sido reportado para otras especies del género como *A. gibbosum*, *A. klebsii*, *A. steinii*, *A. fijjensis* y *A. theodorei* (Barlow & Triemer, 1988; Maranda & Shimizu, 1996; Murray *et al.*, 2004; Karafas *et al.*, 2017), sin embargo, aún se desconoce si la presencia de este carácter depende de las condiciones de cultivo.

Además, se infiere que este comportamiento no es un rasgo específico del género, ya que podría estar asociado a la divergencia de *Amphidinium* como un linaje joven y su posible relación con otros protistas que muestran la misma plasticidad (Larsen & Patterson, 1990; Daugbjerg *et al.*, 2000; Al-Qassab *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009). Por lo tanto, este carácter no es



considerado un rasgo distintivo de *A. thermaeum*, dado se ha reportado que la cepa CS-109 de Australia y la cepa Amth0000600 de las Islas Fiji no presentan movimiento metabólico (Murray *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2017).

#### 8.1.1.1 Ciclo de vida de *Amphidinium*

Se han descrito algunas etapas del ciclo de vida del género *Amphidinium*, dentro del cual se presenta una fase asexual y una sexual (Barlow & Triemer, 1988; Calado *et al.*, 1998; Moestrup & Calado, 2018). La fase del proceso de reproducción asexual se lleva a cabo por fisión binaria y la formación de quiste temporales hialinos (Sampayo, 1985; Barlow & Triemer, 1988; Murray *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2013). La fase del proceso sexual se realiza mediante la unión ventral de las células vegetativas, la conjugación (fusión de los epiconos y el citoplasma) y la formación de planocigotos biflagelados (Barlow & Triemer, 1988; Calado *et al.*, 1998).

De igual manera, se han observado estas etapas del ciclo de vida en géneros filogenéticamente cercanos como *Togula* y *Bindiferia* (Jørgensen *et al.*, 2004b; Borchhardt *et al.*, 2021). Sin embargo, no todas las etapas del ciclo de vida se llevan a cabo en las especies y/o están descritas. En consecuencia, la mayoría de los estudios solo mencionan si las especies presentan alguna etapa y no detallan información complementaria.

En el presente estudio, se observaron los procesos de fisión binaria y conjugación en *Amphidinium* sp. (s/i 73), así como en *A. thermaeum* (s/i 74). Además, esta última se caracterizó por producir quistes temporales hialinos (> 16 células), que posteriormente germinan y dan origen a células vegetativas flageladas móviles. Este estado de reproducción es propio de la especie, aunque Dolapsakis & Economou-Amilli (2009) reportaron quistes con dos o máximo tres células.

Fensome (1993) y Hoppenrath *et al.* (2014), agruparon al género *Amphidinium* dentro de los dinoflagelados bentónicos coccoides, los cuales se caracterizan por presentar una primera etapa de ciclo de vida inmóvil dentro de una vaina que se encuentra rodeada por una matriz gelatinosa, denominada “estado *palmeloide*”; y la segunda, presenta diferentes formas celulares en las etapas móviles. Se ha sugerido que la función ecológica en la formación de quistes de reproducción permite a las



especies de *Amphidinium* sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables que podrían dañar a las células vegetativas (Sampayo, 1985; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2019). Por otra parte, Gárate-Lizárraga y colaboradores (2019), encontraron quistes hialinos de *A. cf. carterae* dentro de pelotillas fecales de copépodos; por esta razón los autores sugirieron que la formación de quistes les permite a las especies de *Amphidinium* evitar ser digeridas por el zooplancton.

### 8.1.2 Género *Coolia*

Se confirmó morfológicamente que las cepas s/i 75 y s/i 76 se reconocen como morfoespecies pertenecientes al género *Coolia*; además, se corroboró su identidad con información molecular. Las especies del género *Coolia* presentan un alto grado de similitudes morfológicas que dificultan su identificación; por esta razón, se han establecido patrones en sus caracteres de identificación mediante el uso de microscopía electrónica de barrido y de fluorescencia (Leaw *et al.*, 2010, 2016; Jeong *et al.*, 2012; Ho & Nguyen, 2014; Wakeman *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2019).

Los caracteres principales considerados para su identificación son el tamaño celular, la longitud del poro apical (Po), la forma y tamaño de diferentes placas: la séptima precingular (7''), la primera apical (1') y la tercera placa postcingular (3'') (Leaw *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2019; David *et al.*, 2020; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020). A partir de estas características, las especies se dividen para su estudio en dos grupos principalmente: el primero se compone de *C. monotis*, *C. malayensis*, *C. plameriensis* y *C. santacroce*, y presentan una placa 7'' pequeña con forma cuadrangular (Karafas *et al.*, 2015; Leaw *et al.*, 2016; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020). El segundo grupo, integrado por *C. canariensis*, *C. guanchica* y *C. areolata*, se caracteriza por presentar especies de mayor tamaño y tener forma rectangular en la misma placa (Faust, 1992; Ten-Hage *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2008; David *et al.*, 2020). Partiendo de esta primera aproximación, las cepas s/i 75 y s/i 76 pertenecen al primer grupo, y con base en los demás caracteres, se consideran morfotipos con similitudes a la cepa CmSA01 de *C. malayensis*, especie tipo descrita para Malasia (Leaw *et al.*, 2010).

Las cepas s/i 75 y s/i 76 presentan una forma esférica con la hipoteca



ligeramente desplazada y placas tecales lisas. Además, se caracterizan por ser morfotipos de mayor tamaño con respecto a las cepas de *C. malayensis* antes reportadas de menor tamaño (Rhodes *et al.*, 2014; Karafas *et al.*, 2015; Tawong *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2016; Leaw *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2019; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Abdennadher *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Las cepas de estudio muestran similitudes con cepas aisladas de Malasia y Brasil (Leaw *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012; de Queiroz Mendes *et al.*, 2019). Ambas presentan similitudes en el patrón de las placas: Po, 3', 7'' 6c, 6(s), 5''', 2''''', designado para *C. malayensis* (Leaw *et al.*, 2010).

La morfología del poro apical (Po) presentó algunas diferencias entre ambas cepas: en la cepa s/i 75, el Po es estrecho y corto ( $L = 3$  a  $5 \mu\text{m}$ ,  $A = 1$  a  $2 \mu\text{m}$ ) en la mayoría de los casos, con respecto a s/i 76 en la que es corto, recto y/o ligeramente alargado ( $L = 3$  a  $7 \mu\text{m}$ ,  $A = 1$  a  $1.7 \mu\text{m}$ ). Estas medidas están reportadas para cepas aisladas del Mar Mediterráneo, República Dominicana, Sur de China, Malasia y Nueva Zelanda (Leaw *et al.*, 2010, 2016; Jeong *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021). Con base en las observaciones en células en cultivos, se infiere que el tamaño y forma del Po dependerá de estado y madurez de las células. Además, durante el proceso de división es la última estructura en separarse.

La placa 7'' es cuadrada en ambas cepas y mantiene similitudes en el intervalo de la relación largo-ancho ( $L/A$ ) de 0.7 a 1  $\mu\text{m}$  (Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Karafas *et al.*, 2015). La cepa s/i 75 presenta intervalos mayores en el tamaño ( $L = 4$  a  $7 \mu\text{m}$ ,  $A = 4$  a  $7 \mu\text{m}$ ) con respecto a la cepa s/i 76 ( $L = 3$  a  $4 \mu\text{m}$ ,  $A = 4$  a  $5.7 \mu\text{m}$ ), aunque comparten similitud con los tamaños de las cepas aisladas en República Dominicana, Nueva Zelanda, Corea y Malasia (Leaw *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 2014; Karafas *et al.*, 2015). La placa 1' presenta una forma hexagonal; en ambos casos es la placa más larga de la epiteca, lo cual es característico de cepas aisladas de Malasia, el sur de China, Brasil, República Dominicana y Corea (Leaw *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2015; Leaw *et al.*, 2016; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

En este estudio se logró identificar y tabular el complejo sulcal, el cual para ambas cepas fue el mismo (S.a., S.d.a., S.s.a., S.d.p., S.s.p., S.p. $\alpha$  y S.p. $\beta$ ). El



complejo sulcal es un carácter poco utilizado para la identificación de las especies, puesto que no siempre se logra observar el patrón y el arreglo de las placas sulcales, sin embargo, algunos autores consideran que podría ser un carácter distintivo en las especies de *Coolia* (Jeong *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2021).

La placa 3<sup>'''</sup> presentó una forma cuadrangular, fue la más grande y ancha de la hipoteca en las cepas s/i 75 y s/i 76 (L= 15 a 21  $\mu\text{m}$ , A= 11 a 19  $\mu\text{m}$ ; L=13 a 30  $\mu\text{m}$  A=11 a 15  $\mu\text{m}$ , respectivamente). La placa 3<sup>'''</sup> continuamente se utiliza como carácter distintivo entre las especies de *C. malayensis* y *C. monotis*. En esta última, la placa es más pequeña, aunque se ha cuestionado si podría considerarse como caracter de identificación, ya que en algunas ocasiones llega presentar el mismo tamaño que la placa 4<sup>'''</sup>, lo que no se observó en nuestro estudio (Leaw *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012; Leaw *et al.*, 2016; Karafas *et al.*, 2017; de Queiroz Mendes *et al.*, 2019).

El conjunto de todas estas características sugiere que las cepas las s/i 75 y s/i 76 son morfológicamente similares a *C. malayensis*. No obstante, describir a las especies de *Coolia* es complicado, ya que no siempre los materiales de identificación como las micrografías en microscopía electrónica de barrido muestran los caracteres de identificación, en particular, obtener un número de muestras representativo para distinguir las placas y realizar las mediciones, que es esencial para realizar comparaciones con otras especies. Además, se ha sugerido que las condiciones de cultivo producen influir en la variabilidad morfológica de las placas tecaes.

#### 8.1.2.1 Ciclo de vida de *Coolia*

Para el género *Coolia* existen pocos registros de las etapas del ciclo de vida. Faust (1992) describió los procesos de reproducción en *C. monotis*, en donde observó una fase asexual por fisión binaria y una fase sexual caracterizada por dos estadios: el primero mediante la fusión de los gametos que originan un planocigoto biflagelado, y posteriormente, a dos células hijas móviles; y el segundo, con la formación de quistes temporales, en donde se realiza la meiosis que da origen a cuatro células hijas. En contraste con este estudio, únicamente observamos el proceso de fisión binaria, y algunas etapas del proceso de reproducción sexual diferentes a las descritas para el género.



Se observaron variaciones morfológicas entre las células vegetativas, tales como células pequeñas, células granuladas y quistes de pared delgada. Se asume que podría tratarse de células vegetativas que representan otras etapas indistinguibles del ciclo de vida, como los gametos y cigotos (Accoroni *et al.*, 2014; Liow *et al.*, 2021). Todos estos morfotipos con variaciones en el tamaño se observaron en todas las condiciones de cultivo.

El proceso de reproducción asexual se caracteriza por la división vegetativa, durante la cual se comparte el núcleo dentro la misma teca mediante desmoquisis en un plano sagital, que se ha documentado en los dinoflagelados bentónicos como *Gambierdiscus* sp. (Bravo *et al.*, 2014), *G. exentricus* (Fraga *et al.*, 2011) *O. cf. ovata* (Bravo *et al.*, 2012; Accoroni *et al.*, 2014), otros pertenecientes al orden Goniaulacales, como *Lingulodinium polyedra* (Figueroa & Bravo, 2005), *Alexandrium preruvianum* (Figueroa *et al.*, 2008), *A. minutum*, *A. tamutum* (Figueroa *et al.*, 2007; Liow *et al.*, 2021) y *A. taylori* (Figueroa *et al.*, 2006). Cabe señalar que las células hijas completas se separaron a partir del poro apical: este es un rasgo característico de *C. malayensis* al final de la división, ya que, en la mayoría de los dinoflagelados, al finalizar la división presentan tecas incompletas. A partir de la identificación de este proceso se lograron observar las diferencias entre el proceso asexual y sexual en *C. malayensis*.

La caracterización de las diferencias entre las etapas asexuales y sexuales es importante, ya que los ciclos sexuales dependen de la capacidad producir planocigotos biflagelados y que los gametos puedan fusionarse y/o realizar una división vegetativa. En el presente trabajo se distinguieron las células vegetativas y las parejas de gametos en conjugación, sin embargo, al final de este proceso no se encontraron planocigotos biflagelados. En cambio, para *C. monotis* Faust (1992) observó un planocigoto flagelado derivado de la fusión nuclear, el cual se caracterizó por la pérdida de movimiento a corto plazo, reducción de tamaño, cambios morfológicos, reorganización del citoplasma y mayor pigmentación (Faust, 1992).

Bravo *et al.* (2012) mencionan que la conjugación de gametos se puede realizar mediante la cariogamia, sin la necesidad de la fusión citoplasmática. La conjugación temporal de gametos a través de la transferencia nuclear de un gameto a otro, en lugar de la plasmogamia, así como la degradación de gametos sin núcleo que se ha



documentado en *Ostreopsis* cf. *ovata* y *Prorocentrum micans* (Bhaud & Soyer-Gobillard, 1988; Bravo *et al.*, 2012; Accoroni *et al.*, 2014).

Entre las células vegetativas, destacan las incoloras con gránulos anaranjados dentro del citoplasma, que no permitieron la observación del núcleo. Diversos autores mencionan que estos pueden ser gametos con alta actividad metabólica (Figueroa & Bravo, 2005; Figueroa *et al.*, 2007, 2008; Accoroni *et al.*, 2014), además de estar asociadas a condiciones de estrés celular y de deficiencia de nutrientes como el nitrógeno (Accoroni *et al.*, 2014). De igual manera, Honsell *et al.* (2013), documentaron, mediante la pigmentación celular con el fluorocromo con rojo de Nilo, que estas granulaciones son pequeñas gotas de lípidos y cloroplastos en proceso de diferenciación. Se observaron células móviles formando triadas unidas en la parte apical antapical. Accoroni *et al.* (2014) observaron la presencia de grupos de tres a cuatro células derivadas de cultivos de quistes con doble pared de *O.* cf. *ovata*. Sugieren que posiblemente ocurrió una meiosis coordinada, que consiste en divisiones meióticas como una necesidad obligada después de la formación de los cigotos (Elbrächter, 2003; Accoroni *et al.*, 2014). Por otra parte, Bhaud & Soyer-Gobillard (1988) describió esta fase como parte del proceso de reproducción sexual en *P. micans*, indicando que, después de la meiosis cigótica, las células haploides permanecen unidas formando tétradas, y ocasionalmente se observan triadas debido a la asincronía de la segunda división meiótica.

En general, en los dinoflagelados se han descrito dos morfotipos de quistes: quistes en reposo, que se forman a partir del proceso sexual y quistes con una película delgada que se producen a partir del proceso asexual (Bravo *et al.*, 2010). Estos últimos se observaron en los cultivos de *C. malayensis* como quistes de pared delgada. Se ha reconocido que estos quistes son células inmóviles encerradas en una pared delgada de una sola capa (Bravo *et al.*, 2010) y se consideran quistes temporales, posiblemente derivados del ciclo vegetativo o cigótico (Figueroa & Bravo, 2005; Bravo *et al.*, 2012). Durante la germinación de los quistes se observó ecdisis a través de la epiteca, que originaron células desnudas inmóviles que probablemente comenzaron la división, aunque no se logró observar el proceso completo. Un comportamiento similar se ha observado en especies de *Alexandrium* y *Lingulodinium polyedra*, con quistes



derivados del proceso asexual, el cual se denomina “eleuterosquisis” (Figuroa & Bravo, 2005; Figuroa *et al.*, 2006, 2007). Además, la mayor parte del tiempo, los quistes temporales estuvieron embebidos en mucílago; probablemente esta sustancia mucilaginosa ayuda a su hundimiento, facilita su adhesión a partículas más pesadas y les permite dispersarse (Smith *et al.*, 2009; Liow *et al.*, 2021).

Una de las limitantes para caracterizar y no poder evidenciar las etapas en las que se encontraban las células dentro del ciclo de vida de *C. malayensis* fue que solo se observaron morfotipos en microscopía fotónica, mientras que la mayoría de las investigaciones utilizan fluorocromos y microscopía de fluorescencia para determinar la forma del núcleo y los cromosomas, la fusión de los gametos y la unión de las células entre las placas (Fraga *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 201; Accoroni *et al.*, 2014).

## 8.2 Identificación molecular y análisis filogenético

Mediante la reconstrucción filogenética con los análisis Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB), a partir de secuencias parciales de la región LSU de ADNr D1/D3, se obtuvo un alto nivel de resolución para la identificación de las cepas s/i 74 como *A. thermaeum*, y *C. malayensis* para las cepas s/i 75 y s/i 76 del presente estudio, excepto para la cepa s/i 73, de la cual no se logró obtener información molecular debido a problemas en la amplificación provocadas por las sustancias mucilaginosas.

*Amphidinium thermaeum* ha sido identificada molecularmente mediante la combinación de diferentes marcadores moleculares como la SSU, LSU, los ITS y la PKS. Además, la topología del filograma fue consistente con los reportados previamente para el género y su estrecha relación con las cepas JQ394809 procedente del Golfo de Thermaikos en Grecia y GQ200834 de Australia (Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Murray *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2017). A partir de este resultado, se reporta por primera vez para la Bahía de La Paz la presencia de esta especie y se infiere que *A. thermaeum* tiene una distribución cosmopolita y, debido a que es necesario corroborar las especies del género mediante análisis filogenéticos, probablemente no ha sido identificada correctamente en estudios anteriores.

Por otra parte, con base a la topología del filograma se identificaron como *C.*



*malayensis* las cepas s/i 75 y s/i 76. Además, se observa similitud con los filogramas previamente reportados, en los cuales se han utilizado marcadores moleculares como la SSU, LSU y los ITS (Leaw *et al.*, 2010; Laza-Martinez *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2012; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Ho & Nguyen, 2014; Leaw *et al.*, 2016; de Queiroz Mendes *et al.*, 2019; Moreira-González *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019; Junqueira de Azevedo Tibiriçá *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Además, las especies se separaron en ramas diferentes. La cepa s/i 75 posiblemente sea un haplotipo distinto debido a las transiciones en las bases que presenta en la secuencia (adenina-timina). De modo similar, la cepa de *C. malayensis* s/i 76 se agrupó con la cepa s/i 72 también aislada de la Bahía de La Paz, aunque presentaron mayor similitud con los especímenes MT295365 procedente de Brasil, KJ422854 de la Isla Rarotonga en Nueva Zelanda y de KP172278 en Carolina del Norte, E.U.A. Se sugiere que también es un nuevo haplotipo aislados de la zona de estudio.

Sin embargo, no se descarta el uso de otros marcadores para complementar las identificaciones, debido a que permiten discrepar entre especies parecidas morfológicamente, complejos de especies y especies crípticas, ya que existe una alta variabilidad en dentro de los géneros, además de genes funcionales para obtener información sobre su metabolismo celular.

### 8.3 Curvas de crecimiento

Las especies *A. thermaeum* y *C. malayensis* se cultivaron en medio GSe con extracto de lombricompostaje (Blackburn *et al.*, 2001; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015) a diferentes volúmenes para determinan sus curvas de crecimiento. Los cultivos fueron inoculados con una célula por pocillo en condiciones de agitación (100 rpm) y sin agitación en cajas multipozos en 240  $\mu$ L y 1 mL, así como en 300 mL en matraces Erlenmeyer con una densidad inicial de 500 cel mL<sup>-1</sup>. En esta última condición únicamente se mantuvieron en agitación.

En cada uno de los volúmenes se observaron diferencias en las tasas de crecimiento, el tiempo de generación, la densidad máxima y la duración del cultivo para alcanzar la fase exponencial y de decaimiento. Cabe señalar que las cepas del presente estudio exhibieron adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (medio de



cultivo, fotoperiodo, intensidad luminosa y temperatura), debido a que previamente habían sido aclimatadas.

En el presente estudio se obtuvieron las tasas de crecimiento ( $K$ ) más altas en volúmenes de 240  $\mu\text{L}$ , seguidas de 1 mL y las más bajas en 300 mL para ambas especies. Uno de los parámetros comúnmente utilizados para realizar comparaciones en el crecimiento celular entre cepas de la misma especie es la tasa de crecimiento, que se basa en el aumento de la biomasa por unidad de tiempo mediante la división celular. Es una medida exclusiva, ya que evidencia el crecimiento de la población y sus características fisiológicas y bioquímicas derivadas de las condiciones de cultivo (Andersen & America, 2005).

Se decidió cultivar estas especies en diferentes recipientes y en distintos volúmenes con el objetivo de observar diferencias en el patrón de crecimiento, debido a que estos dinoflagelados presentan hábitos bentónicos mediante su adhesión a un sustrato y determinar la mejor forma de cultivarlas. Se observó que las curvas de crecimiento no presentaron una fase estacionaria evidente, lo cual es típico de las curvas de crecimiento de varias especies de microalgas, particularmente de las planctónicas, por lo que una vez alcanzada la fase exponencial tardía comenzó el declive celular. Sin embargo, en ambas especies se pudo observar un patrón similar en el crecimiento.

Cabe señalar que una de las limitaciones más importantes durante los conteos en las cajas multipozos, fue que estos se realizaron contando células vivas; además, cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial, las células presentaban mayor movimiento y formaron estratos mucilaginosos que dificultaron la estimación de la densidad celular. Tales efectos se reflejaron en las desviaciones estándar a lo largo de las curvas de crecimiento.

Los cultivos convencionales de dinoflagelados se han realizado en condiciones usuales para especies con hábitos planctónicos, en los que el cultivo es fácil de homogeneizar (Hoppenrath *et al.*, 2014). La dificultad de estimar el crecimiento en dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos se debe a su modo de dispersión, el cual es heterogéneo mediante la producción de agregados celulares unidos en matrices mucilaginosas, que generalmente forman en su tipo de hábitat, por lo cual calcular las



densidades, tanto en cultivos de laboratorio como en su ambiente natural, presenta un reto. Por esta razón, se han sugerido diferentes métodos de estimación de conteos celulares, tanto en campo como en laboratorio. Los recuentos en macroalgas y pastos marinos se han estimado en peso húmedo ( $\text{cel g}^{-1}$ ); en sedimentos o agua en unidades de volumen ( $\text{cel cm}^3$  o  $\text{cel mL}^{-1}$ ); en planicies arenosas, superficies naturales o artificiales en unidades de área ( $\text{cel cm}^2$  o  $\text{cel m}^2$ ) (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Hoppenrath *et al.*, 2014; Yong *et al.*, 2018; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2019). Actualmente no existe ningún método estandarizado de recuento para dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos, puesto que, metodológicamente, los protocolos son muy diferentes entre sí, ya que difieren entre especies y tipos de hábitat. Por esta razón es difícil realizar comparaciones (Hoppenrath *et al.*, 2014).

Se consideró agregar el efecto de agitación suave (100 rpm) con la finalidad de disgregar a las especies de su mucílago. Sin embargo, se observó la inhibición del crecimiento de ambas especies a partir del cuarto día en cajas multipozos, mientras que los cultivos en volúmenes de 300 mL presentaron bajas densidades de celulares y bajas tasas de crecimiento en esta condición. Esto se explica porque la turbulencia inhibe el crecimiento de los dinoflagelados y puede provocar la muerte si se mantiene o intensifica. La turbulencia también modifica el reloj celular, el ciclo mitótico y altera las concentraciones de ácidos nucleicos (Smayda, 1997). Asimismo, estos dinoflagelados habitan en sedimentos marinos, en charcos de mareas, son epífitos sobre detritos flotantes y corales; están adheridos por mucílago y principalmente se distribuyen en lugares poco turbulentos y poco profundos (Hoppenrath *et al.*, 2014; Yong *et al.*, 2018).

### 8.3.1 Curvas de crecimiento de *Amphidinium therrmaeum*

Una de las aportaciones del presente trabajo es el registro de las curvas de crecimiento de la especie *A. therrmaeum* (s/i 74) cultivada en medio GSe en volúmenes de 240  $\mu\text{L}$ , 1 mL y 300 mL. Las curvas de crecimiento en volúmenes de 240  $\mu\text{L}$  y 1 mL tuvieron una duración relativamente corta, de 28 y 34 días de cultivo, respectivamente. Por otro lado, en 300 mL la curva duró 46 días. En cada condición de volumen las tasas de crecimiento fueron diferentes. La máxima tasa de crecimiento fue de 0.33 div



día<sup>-1</sup> en 240 µL, seguida de 0.26 div día<sup>-1</sup> en 1 mL y la menor de 0.1 div día<sup>-1</sup> en 300 mL.

Se conoce poco sobre esta especie, si bien se ha caracterizado morfológica y molecularmente, aún no se cuenta con información sobre su autoecología, fisiología o metabolismo celular. Se ha reportado que puede ser potencialmente tóxica debido a que presenta la enzima policétido sintetasa (PKS), la cual es la responsable de producir policétidos con actividad ficotóxica (Murray *et al.*, 2012). También se ha reportado que las especies de género *Amphidinium* son consideradas dinoflagelados “diana” y pueden ser potencialmente explotadas en cultivo a pequeña y gran escala por su alta adaptabilidad, resistencia a las condiciones de cultivo y a su producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológico (Lee *et al.*, 2003a, 2003b; Fuentes-Grünewald *et al.*, 2016; Moreira-González *et al.*, 2019; Saha *et al.*, 2019).

### 8.3.2 Curvas de crecimiento de *Coolia malayensis*

Las curvas de crecimiento en volúmenes de 240 µL y 1 mL tuvieron una duración relativamente corta, de 38 y 18 días de cultivo, respectivamente. La curva en 300 mL duró 69 días de cultivo. En cada volumen de cultivo las tasas de crecimiento (K) fueron diferentes. La máxima tasa de crecimiento fue de 0.43 div día<sup>-1</sup> en 240 µL, seguida de 0.24 div día<sup>-1</sup> en 1 mL y la menor fue de 0.05 div día<sup>-1</sup> en 300 mL.

Los valores de las tasas de crecimiento obtenidos son similares a las previamente reportadas para *C. malayensis* utilizando diferentes medios de cultivo, temperaturas, salinidades e iluminación (Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014; Larsson *et al.*, 2019; Moreira-González *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Se han realizado estudios en los cuales se reportan las mayores tasas de crecimiento para cepas de *C. malayensis*, destacando el trabajo de Mohammad-Noor *et al.* (2013), en el cual experimentaron con cepas aisladas de Malasia cultivadas en medio L1 en diferentes salinidades (20 a 40) y temperaturas (30 a 35 °C), con una iluminación de 90 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un ciclo 14:10 h L:O. Los autores reportaron tasas de crecimiento de 0.40 a 0.49 día<sup>-1</sup> para la temperatura de 25 °C y salinidades de 30 a 35. Sin embargo, cuando las cepas se sometían salinidades menores o mayores a 30 °C, las tasas de crecimiento disminuyeron y fluctuaron entre 0.19 y 0.20 día<sup>-1</sup>, mientras que, cuando la



temperatura y la salinidad aumentaron de manera conjunta (30 °C, 35, respectivamente), la tasa de crecimiento aumentó a 0.66 día<sup>-1</sup>.

De igual manera destacan los valores altos en las tasas de crecimiento reportados por Moreira-González *et al.* (2019), quienes obtuvieron tasas de crecimiento de entre 0.42 y 0.49 día<sup>-1</sup> en cepas aisladas de Brasil, cultivadas en medio f/2 a una temperatura de 25 °C, salinidades de 30 a 32, con una iluminación entre 100 a 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un ciclo 14:10 h L:O. Shah *et al.* (2014) experimentaron con cepas de Corea en los medios de cultivo IMK y f/2 a una temperatura de 20 °C, salinidad de 30 y una iluminación de 180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un ciclo 12:12 h L:O. Las tasas de crecimiento de las cepas fluctuaron entre 0.20 y 0.25 día<sup>-1</sup> en el medio IMK, y entre 0.19 y 0.25 día<sup>-1</sup> en el medio f/2. También se han reportado tasas de crecimiento similares en cepas de Australia en diferentes condiciones de temperatura, salinidad e irradiancia en medio de cultivo K modificado, en iluminación de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un ciclo 12:12 h L:O. Larsson *et al.* (2019) obtuvieron tasas entre 0.21 y 0.25 día<sup>-1</sup> a una temperatura de 24 °C; de entre 0.10 y 0.16 día<sup>-1</sup> a salinidades entre 32 y 36, y en condiciones de iluminación entre 100 y 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se lograron tasas de crecimiento entre 0.16 y 0.17 día<sup>-1</sup>.

Por el contrario, uno de los estudios con las tasas de crecimiento más bajas reportadas hasta ahora es el de Li *et al.* (2020). Ellos probaron diferentes temperaturas (16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 °C) sobre el crecimiento de *C. malayensis* aislada de Hong Kong, China, cultivada en medio L1 a salinidad de 30, con iluminación de 47 a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en un ciclo 12:12 h L:O. La tasa de crecimiento máxima fue de 0.10 día<sup>-1</sup> a 24 °C; en las temperaturas de 18, 20 y 22 °C obtuvieron tasas de crecimiento entre 0.07 y 0.08 día<sup>-1</sup>, y las tasas de crecimiento con valores menores fueron de 0.04 a 0.05 a 16, 26 y 28 °C.

Con base a los valores obtenidos para las tasas de crecimiento del presente estudio y los previamente reportados, se concluye que *C. malayensis* presenta una amplia tolerancia, adaptabilidad y variación interespecífica a las condiciones de cultivos y ambientales, posiblemente derivadas de su plasticidad fenotípica, lo que permite ampliar su distribución hacia otras regiones para colonizar nichos diferentes.

#### **8.4 Experimentación de interacciones alelopáticas**



Las interacciones alelopáticas de los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos han sido poco estudiadas hasta ahora (Monti & Cecchin, 2012; Accoroni *et al.*, 2015; García-Portela *et al.*, 2016; Pichierri *et al.*, 2017; Ternon *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2021). En el presente estudio se experimentó con *A. thermaeum* y *C. malayensis* para observar las interacciones alelopáticas, debido a que estos dinoflagelados ocupan el mismo nicho ecológico en la Bahía de La Paz en el Golfo de California. El diseño experimental permitió la exclusión de cualquier factor abiótico (iluminación, nutrientes, temperatura, pH, salinidad) que favoreciera el crecimiento de alguna de las especies sobre la otra. Sin embargo, se utilizaron cultivos no axénicos y, por lo tanto, es importante considerar el papel potencial de las bacterias en los efectos observados, debido a que pueden estar directa o indirectamente asociadas a la producción de toxinas y otros metabolitos en dinoflagelados (Nayak *et al.*, 1997; Mandal *et al.*, 2011; Seong & Jeong, 2011).

#### 8.4.1 Experimentos de alelopatía. Cultivos con contacto celular

Los experimentos de contacto celular de las especies *A. thermaeum* y *C. malayensis* en cajas multipozos y en los matraces de alelopatía presentaron diferencias en el patrón de crecimiento y en los porcentajes sobre los efectos de inhibición del crecimiento. No obstante, se observaron los mismos efectos en la morfología ambas especies.

En los experimentos con cultivos mixtos en cajas multipozos se observó que tanto *A. thermaeum* como *C. malayensis* redujeron su crecimiento al estar en contacto celular. A pesar de que no se observaron diferencias significativas ni cambios en las tasas de crecimiento, los efectos fueron visibles en el porcentaje de inhibición del crecimiento de ambas especies, así como algunas pocas células de *C. malayensis* con pérdida de movimiento, clorosis, ecdisis y lisis celular.

Lo más probable es que ambas especies secreten sustancias aleloquímicas que puedan afectar el crecimiento de la otra. Una explicación probable de los efectos observados sería que *A. thermaeum* y *C. malayensis* liberan sustancias aleloquímicas de forma rápida y continua en el medio, y este suministro continuo proporciona una ventaja de dominancia de una sobre la otra, como se observó con *A. thermaeum*.



Un factor importante a considerar es la densidad inicial, ya que ambas especies comenzaron con densidades celulares en proporciones de biovolumen 1:1, 1:2 y 2:1 (*A. thermaeum*: *C. malayensis*). Al inicio del experimento solo comenzaron a colonizar el espacio disponible; conforme avanzaron los días de cultivo, la dominancia celular se hizo evidente y el crecimiento de *C. malayensis* comenzó a disminuir, aunque ambas especies seguían presentando crecimiento celular y colonizando el mismo nicho.

Además, la relación densidad-efecto fue evidente, debido a que la intensidad del efecto alelopático sobre *C. malayensis* fue menor cuando esta se encontraba en mayor proporción (1:2), mientras que, cuando ambas especies se encontraban en la misma proporción se presentó un mayor efecto de inhibición para ambas (1:1).

Un patrón similar se observó en cultivos mixtos de *Coolia monotis* y *Ostreopsis* sp. "tipo Lanzarote": al estar en contacto celular, esta última presentó disminución del crecimiento, aunque no se observaron cambios morfológicos (García-Portela *et al.*, 2016). Por otra parte, en los experimentos realizados con *Heterocapsa circularisquama* y *Prorocentrum dentatum* se observó una disminución del crecimiento y lisis celular inmediata de *P. dentatum* únicamente cuando las densidades iniciales de *H. circularisquama* eran más altas (Yamasaki *et al.*, 2011). En los experimentos realizados con *Skeletonema costatum* y *Heterosigma akashiwo* se observó un efecto antagónico y efectos de inhibición débiles cuando ambas especies presentaron las mismas densidades celulares (Yamasaki *et al.*, 2007).

Por lo anterior, estos resultados sugieren que ambas especies pueden coexistir, incluso si *A. thermaeum* produce sustancias alelopáticas. Aunado a lo anterior, *C. malayensis* presenta una plasticidad fenotípica como su capacidad de adaptación y aclimatación a diferentes cambios ambientales (Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014; Larsson *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020) que le pueden proporcionar una variedad de respuestas fisiológicas al estar en contacto con sustancias aleloquímicas para poder coexistir en el ambiente. De manera similar se han observado diferentes estrategias de resistencia de *Prorocentrum donghaiense* que puede ser resistente a las sustancias aleloquímicas de *Alexandrium pacificum*, ya que puede crecer a pesar de estar inhibido en un período de tiempo corto (Huang *et al.*, 2021).

Por otra parte, para determinar el papel de las interacciones alelopáticas en el



crecimiento de *A. thermaeum* y *C. malayensis* en un florecimiento monoespecífico, se realizaron los cultivos mixtos en las proporciones de biovolumen 1:1 y 2:1 en matraces de alelopatía.

En estos matraces de alelopatía se observó que *A. thermaeum* inhibe fuertemente el crecimiento de *C. malayensis* a partir del sexto día al estar en contacto celular. Se observaron diferencias significativas, cambios en las tasas de crecimiento y altos porcentajes de inhibición del crecimiento en *C. malayensis*. Además, fueron muy evidentes los efectos alelopáticos sobre la morfología, ya que la mayoría de las células presentaron pérdida de movimiento, clorosis, ecdisis y lisis celular.

En ambas proporciones de cultivo en los matraces de alelopatía, *A. thermaeum* aumentó en densidad celular y posteriormente se observó una fase de crecimiento estacionaria hasta que dominó sobre *C. malayensis*, una vez que inhibió completamente su crecimiento. En efecto, se observó una relación dependiente de la densidad inicial de las especies y la interacción alelopática, debido a que, a mayor densidad inicial, los efectos alelopáticos sobre *C. malayensis* fueron más intensos.

Una posible ventaja competitiva de *A. thermaeum* sobre *C. malayensis*, es su relación superficie-volumen, lo que implica que la célula tiene la capacidad de presentar una mayor tasa de crecimiento, y por lo tanto aumenta más rápido su densidad celular y con ello su capacidad de producir más sustancias aleloquímicas, lo cual genera un efecto de inhibición sobre *C. malayensis*. De igual modo, es probable que las sustancias aleloquímicas liberadas al medio por parte de *C. malayensis* sean demasiado escasas o no sean lo suficientemente efectivas para afectar el crecimiento de *A. thermaeum*.

Se han demostrado efectos de lisis celular sobre protozoos y otras microalgas, que son las especies objetivo, en donde las sustancias aleloquímicas actúan sobre la membrana externa. Además, la lisis no solo depende de la concentración celular de la especie donante, también depende de la concentración de las células objetivo (Tillmann, 2003; Tillmann *et al.*, 2007).

Considerando que los efectos alelopáticos dependen de la densidad celular (Weidenhamer, 2006), las biopelículas formadas por los dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos pueden protegerlos contra sustancias alelopáticas. Además, algunas



especies se encuentran constantemente expuestas a sustancias concentradas producidas por células vecinas. De modo que la continua exposición a sustancias aleloquímicas podría causar alta presión selectiva, dando lugar a cepas más resistentes (Allen *et al.*, 2016). También se ha demostrado que el aumento en los efectos alelopáticos está estrechamente relacionado con el contacto celular entre las especies (Uchida *et al.*, 1995; Uchida *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020).

Este estudio evidencia que unos de los mecanismos de los efectos alelopáticos causados por *A. thermaeum* sobre *C. malayensis* es mediante el contacto celular, con efectos en la disminución del movimiento, aclaramiento de los cloroplastos, daño en la membrana y finalmente la lisis celular. Estos efectos también han sido observados en la diatomea *Skeletonema costatum*, los dinoflagelados *Prorocentrum micans*, *Scrippsiella trochoidea* y en la haptofita *Isochrysis galbana* al estar en contacto con *Amphidinium carterae* (Ji *et al.*, 2012). De modo similar, se observaron efectos en especies como *Karenia mikimotoi*, *Gyrodinium instriatum* y *Prorocentrum dentatum* al estar en contacto directo con *Heterocapsa circularisquama* (Uchida *et al.*, 1995, 1999; Yamasaki *et al.*, 2011).

En los ambientes bentónicos existen múltiples respuestas y mecanismos de acción derivados de las interacciones bióticas y la gran diversidad de compuestos producidos por los organismos que forman biopelículas. Estos evidencian la importancia de la alopatía a lo largo de la evolución, específicamente para los productores de sustancias aleloquímicas, asimismo, no se pueden excluir otras funciones biológicas, ecológicas y/o químicas (Allen *et al.*, 2016). Los resultados de este trabajo podrían explicar parcialmente la abundancia de estas dos especies en campo, es decir, *A. thermaeum*, al alcanzar una alta densidad pudiera limitar la densidad de otras especies como *C. malayensis*.

Di Pippo & Congestri (2017), cultivaron biopelículas en un microcosmos sobre un sustrato artificial con especies formadoras de Florecimiento Algales Nocivos bentónicos como cianobacterias filamentosas (de los géneros *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*); las diatomeas (de los géneros *Parlibellus*, *Amphora* y *Ceratoneis closterium*); y los dinoflagelados (O. cf.



*ovata*, *A. cf. carterae* y *C. monotis*). Observaron que las estrategias de las formas de vida, la competencia por los recursos, la distribución heterogénea y las interacciones alelopáticas influyeron en la estructura de la comunidad. Además, observaron la dominancia de *A. cf. carterae* que formó a agregaciones excluyendo a otros miembros de la comunidad y dominó sobre otros dinoflagelados, entre ellos a *C. monotis*.

Se ha evidenciado, en experimentos de interacción en contacto celular de *Amphidinium carterae* con bacterias no nativas como *Bacillus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Aeromonas*, que el dinoflagelado *A. carterae* no presenta diferencias en su crecimiento y aumenta su toxicidad al estar en contacto, posiblemente por procesos de alelopatía derivados de producción de hemolisinas (Nayak *et al.*, 1997; Mandal *et al.*, 2011; Seong & Jeong, 2011). En experimentos con exudados de *A. carterae* sobre *Bacillus pumillus*, se observó que las sustancias poliméricas extracelulares producidas por el dinoflagelado son beneficiosas para el desarrollo y crecimiento de las bacterias, actuando como suplemento de nutrientes, lo que sugiere que estas asociaciones podrían estar involucradas en los procesos de flujos de carbono en los bucles microbianos del ecosistema y en la formación de FANb (Mandal *et al.*, 2011).

La importancia de la alelopatía en la dinámica poblacional y la coexistencia de las especies ha sido demostrada mediante modelos matemáticos aplicados a dinoflagelados planctónicos (Wang *et al.*, 2006, 2020; Wang & Tang, 2008; Lyczkowski & Karp-Boss, 2014). Estos modelos hipotetizan varias estrategias derivadas de la producción de sustancias aleloquímicas: En principio, las sustancias aleloquímicas permiten a la especie donadora superar en densidad a la especie objetivo, sin embargo, genera efectos de reducción de su tasa de crecimiento debido al alto costo energético de producir sustancias aleloquímicas, así como para evitar su autotoxicidad. Una vez que la especie donadora ha superado a la especie objetivo, el beneficio de producir sustancias alelopáticas es bajo, aunque el costo energético es el mismo (Allen *et al.*, 2016). Derivado de lo anterior, se observó un patrón de comportamiento similar en los cultivos mixtos en matraces de alelopatía.

De igual manera, estos modelos proponen que las especies o cepas resistentes a las sustancias aleloquímicas podrán superar a las especies objetivo, debido a que



no tienen que soportar ese costo energético. Dado que la densidad de la especie donadora se reduce y la especie objetivo ya no se encuentra controlada por las sustancias aleloquímicas, esta podría superar en densidad a las especies resistentes porque no pagan el costo de producción de los compuestos químicos (Allen *et al.*, 2016). Con respecto a esta segunda inferencia, *C. malayensis* en los cultivos mixtos en cajas multipozos presentó resistencia a las sustancias aleloquímicas de *A. thermaeum* en todas las fases de crecimiento.

#### 8.4.2 Experimentos de alelopatía. Cultivos sin contacto celular

En el experimento sin contacto celular en la proporción de biovolumen 1:1 entre *A. thermaeum* y *C. malayensis* en matraces de alelopatía, no se observó actividad alelopática por parte de ninguna de las dos especies, mientras que en la proporción 2:1 se confirmó la actividad alelopática observada en los experimentos con contacto celular.

El diseño experimental en las cámaras de cultivo se adaptó para evitar el contacto celular entre ambas especies y permitir la difusión de los compuestos de una especie hacia la otra mediante la separación de las cámaras de cultivo por una membrana. El tipo de membrana y tamaño de poro se eligió con base en el tamaño celular de ambas especies. Sin embargo, en ambos experimentos se modificaron los días de cultivo y el tipo de membrana por los problemas derivados de la homogenización y la exposición de la membrana en el cultivo.

El cultivo sin contacto celular en la proporción de biovolumen 1:1 tuvo una duración de 10 días debido a que la membrana de fibra de vidrio se rompió por la exposición continua con el medio de cultivo y la homogenización. Durante el tiempo del experimento no se observaron efectos alelopáticos ni inhibición del crecimiento; no se afectaron las densidades celulares ni las tasas de crecimiento de ninguna de las dos especies. Por lo cual, estos resultados sugieren que la ausencia de efectos alelopáticos mediante la difusión de sustancias aleloquímicas a través de la membrana solo están involucradas el deterioro celular y sobre el crecimiento de sus posibles competidores. Además, estas sustancias aleloquímicas se encontraban diluidas en el medio de cultivo, por lo tanto, su efecto fue nulo o no se alcanzó a detectar.



De manera similar, Band-Schmidt *et al.* (2020) observaron que, tanto *Gymnodinium catenatum* como *G. impudicum* no presentaron efectos alelopáticos en cultivos sin contacto. De igual modo, Ternon *et al.* (2018) observaron que *Ostreopsis* cf. *ovata* produce ovotoxinas como respuesta a la competencia de *Licmophora paradoxa*, y esta diatomea posiblemente produce oxilipinas para contrarrestar el efecto. Además, ninguna de las dos especies mostró efectos alelopáticos al cultivarse sin contacto celular. Sin embargo, al analizar sus endo y exometabolomas, se encontraron diferentes compuestos químicos, por lo cual se infiere que la membrana impide la difusión de los compuestos de una especie hacia la otra, que está en función del tamaño de las moléculas. Sin embargo, Wang *et al.* (2020) evidenciaron la inhibición del crecimiento provocados por la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* sobre la rafidofita *Heterosigma akashiwo* en un sistema de alelopatía separados con una membrana de 0.7  $\mu\text{m}$ , los autores sugieren que las sustancias aleloquímicas se degradan con el tiempo, y tanto la concentración como los efectos alelopáticos pueden disminuir con el tiempo de incubación.

Por otra parte, en los cultivos sin contacto celular con proporciones de biovolumen 2:1 se observaron células de *A. therrmaeum* a partir del cuarto día de cultivo dentro de la cámara de *C. malayensis*.

Por la ruptura de la membrana de fibra de vidrio en el experimento con la proporción 1:1 se decidió cambiar la membrana una malla de nylon con luz de malla de 5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, a los cuatro días se encontraron células de *A. therrmaeum* en la zona de *C. malayensis*. Estas células tienen un tamaño de 10 a 19  $\mu\text{m}$  de largo y 7 a 14  $\mu\text{m}$  de ancho; sin embargo, presentan movimiento metabólico, el cual les permite expandirse y contraerse. Se considera, por lo tanto, que estas células utilizaron esa ventaja adaptativa para colonizar rápidamente la cámara de cultivo aledaña e inhibir el crecimiento de *C. malayensis*. Estos resultados muestran que *A. therrmaeum* presenta múltiples mecanismos y ventajas adaptativas para colonizar otros nichos. De igual modo, se confirma que los efectos alelopáticos entre estas dos especies suceden principalmente mediante contacto celular. Algunos autores han demostrado que es necesaria la detección o señalización química entre especies mediante contacto para estimular la producción de metabolitos secundarios (Stahl, 2016; Landa *et al.*, 2017).



#### 8.4.3 Experimentos de alelopatía. Exposición a medios de cultivo filtrados

En los experimentos de exposición de las células de *C. malayensis* en los filtrados celulares de las especies *A. thermaleum* y *C. malayensis* en los matraces de alelopatía, únicamente se inhibió el crecimiento en el cultivo con una concentración de 100% de los filtrados de *A. thermaleum*. Además, no se observaron diferencias en el patrón de crecimiento, pero si un aumento en densidad celular comparados con el control. No obstante, se observaron diferentes efectos en la morfología ambas especies en las concentraciones de 50 y 100%.

En los cultivos con exposición a la concentración de 50% en ambos filtrados no se observaron efectos de inhibición, por el contrario, *C. malayensis* presentó un efecto estimulante en su crecimiento con un aumento del 20% en los filtrados de *A. thermaleum* y del 16% en sus propios filtrados. Además, en los filtrados celulares de *C. malayensis* a una concentración de 100% presentó un patrón en crecimiento similar, aunque no se observó un efecto estimulante. Efectos similares se han observado en la microalga *Dunaliella tertiolecta* en exposición a filtrados de *A. carterae* en concentraciones de 70 y 100% (Paul *et al.*, 2021). De igual modo, sea observado que *Alexandrium tamarense* presentó un aumento en su crecimiento cuando se expuso a filtrados de *Prorocentrum donghaiense* (Wang *et al.*, 2006). Así como en *Karlodinium veneficum* al estar expuesta a filtrados de *P. donghaiense* (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio se observó que *C. malayensis* en ambos filtrados presentó deformaciones en su morfología, células con protuberancias y efectos sobre las células que se encontraban en reproducción por fisión binaria. Estas últimas se caracterizaron por formar triadas con múltiples meiosis para generar gametos, lo cual podría explicarse como una estrategia de *C. malayensis* para mantener a su población en condiciones adversas. Además, se debe considerar que estas deformaciones posiblemente son resultado de la deficiencia de nutrientes, ya que el cultivo tuvo una duración de 15 días en los cuales el crecimiento presentó un aumento en densidad celular, posiblemente es necesario prolongar el tiempo de cultivo para observar una inhibición y fase de decaimiento en el crecimiento de *C. malayensis*, debido a que se desconoce el tiempo de degradación de las sustancias aleloquímicas. Se sugiere que, la actividad asociada a las supuestas sustancias aleloquímicas persiste en los filtrados



libres de células, pero en algunos casos parece ser degradada después de cierto tiempo, por ello, es necesario monitorear la duración de estos efectos a lo largo del tiempo y, eventualmente podrían ser necesarias nuevas adiciones de filtrados (Fistarol *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; García-Portela *et al.*, 2016).

Por otra parte, el cultivo de *C. malayensis* expuesta a una concentración de 100% presentó una inhibición del crecimiento del 72% hasta el día cuatro y se observaron células con efectos de clorosis, ecdisis y lisis. Estos efectos también se observaron en los cultivos en contacto celular, por consiguiente, se confirman que los efectos alelopáticos de *A. thermaeum* sobre *C. malayensis* dependen de la concentración celular, del contacto entre especies y posiblemente son las mismas sustancias aleloquímicas secretadas en ambos tratamientos. Tales efectos se han observado en especies coexistente como *Bysmatrum gregarium* y *Skeletonema costatum* expuestas a filtrados de *A. carterae* en concentraciones de 70 y 100%, además se sugiere que la acción de las mareas (a través de la dilución) podría desempeñar un papel importante en la eficiencia de los procesos alelopáticos como estrategia competitiva en ambientes intermareales (Paul *et al.*, 2021). Cabe señalar, que después de la inhibición del crecimiento de *C. malayensis*, las células que presentaron crecimiento en los días siguientes, presentaron morfologías anómalas con fuertes pigmentaciones, granulaciones, deformaciones y efectos sobre las células en fisión binaria y no se recuperaron en densidad celular.

En este estudio se investigaron los efectos de las interacciones alelopáticas de los dinoflagelados epibentónicos *A. thermaeum* y *C. malayensis* en cultivos mixtos, sin contacto y expuestos a filtrados celulares. Los resultados mostraron que el mayor efecto de inhibición sobre el crecimiento de *C. malayensis* se presentó en cultivos con contacto celular y en los al 100% de *A. thermaeum*. Sin embargo, se desconoce cuáles son las sustancias alelopáticas responsables de la inhibición, así como de sus múltiples respuestas y mecanismos de acción sobre el metabolismo celular. Por lo cual, en un contexto ecológico, existe una gran diversidad de mezclas de compuestos que no siempre pueden ser caracterizados. Por este motivo, el desarrollo de técnicas como las “ómicas” permitirán un rápido progreso en la identificación de los metabolitos secundarios involucrados en las interacciones alelopáticas (Allen *et al.*, 2016;



Konarzewska *et al.*, 2020; Chaïb *et al.*, 2021; Śliwińska-Wilczewska *et al.*, 2021).

### 8.5 Mucílago

Es conocido que los géneros *Amphidinium* y *Coolia* producen grandes cantidades de mucílago (Besada *et al.*, 1982b; Faust, 1992; Maranda & Shimizu, 1996; Dolapsakis & Economou-Amilli, 2009; Lee *et al.*, 2013; Leaw *et al.*, 2016). En los cultivos, tanto en las curvas de crecimiento como en los experimentos de interacciones alelopáticas se observaron grandes matrices mucilaginosas que producían las células de ambas especies. Las matrices aumentaron su biomasa conforme los días del cultivo alcanzaban la fase exponencial; además, dentro de los agregados mucilaginosos las células se encontraban en asociación con grandes cargas bacterianas. Se ha observado, tanto en la naturaleza como en cultivos, que los dinoflagelados bentónicos se encuentran embebidos en matrices mucilaginosas que frecuentemente cubren diferentes sustratos (rocas, macroalgas, corales, pastos, etc.) (GEOHAB, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014), y también tienden a cubrir el fondo de los recipientes de cultivo (Di Pippo & Congestri, 2017; Abdennadher *et al.*, 2020). A menudo estos agregados amorfos se desprenden del fondo y flotan en la columna de agua. En cultivo forman una red filamentosa. Además, estos exudados mucilaginosos proporcionan mayor densidad a los medios de cultivo (Honsell *et al.*, 2013).

El mucílago está formado por polímeros transparentes de carbohidratos en forma de celosía higroscópica y son característicos de diferentes grupos de microalgas. En ellos realizan sus funciones tales como reproducción, defensa contra el pastoreo, aumento de la flotabilidad y autorregulación metabólica (Reynolds, 2006, 2007; Allen *et al.*, 2016). Este mucílago se produce dentro de las células por organelos eyéctiles llamados extrusomas que se encuentran cercanos al anfiesta y pueden ser de dos tipos: mucocistos y tricocistos. Los tricocistos presentan una función defensiva y/o excretora; además, expulsan fibras de contenido mucilaginoso a distancia. Los mucocistos son sacos de contenido granular, asociados con la liberación de mucus en el proceso de conversión al estado palmeloide (Saldarriaga & Taylor, 2017).

Durante los experimentos de las curvas de crecimiento, la producción de mucílago representó una limitante para realizar los conteos celulares, debido a que las



muestras no eran homogéneas, particularmente los agregados celulares en estado palmeloide de *A. therrmaeum* y las matrices en forma de fibras con células adheridas de *C. malayensis*.

La unión de los dinoflagelados por medio de mucílago al sustrato es una adaptación ecológica para sobrevivir a la turbulencia, reduciendo la probabilidad de ser dispersados por las olas o la desecación durante la marea baja, así como para colonizar sustratos (Smayda, 2002; Fraga *et al.*, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014; García-Portela *et al.*, 2016).

García-Portela *et al.* (2016) observaron que los filtrados de *Ostreopsis cf. ovata* favoreció la adhesión celular de *Prorocentrum hoffmannianum*, mientras que en *Gambierdiscus exentricus* produjeron un efecto contrario y causó lisis celular. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias para contrarrestar la adhesión y/o la colonización por otros organismos podría ser una ventaja competitiva para algunas microalgas bentónicas.

También se ha demostrado que las matrices mucilaginosas contienen compuestos como o sustancias que pueden ser tóxicas o dañinas para otros organismos, como peces, invertebrados, bacterias y algas (Mandal *et al.*, 2011; Accoroni *et al.*, 2015), lo que se considera una estrategia clave de supervivencia, así como para la formación de FANb.

Por lo tanto, parece paradójico que las interacciones alelopáticas se hayan descrito primero en especies planctónicas antes que en especies bentónicas, debido a que dentro de las biopelículas sucede una guerra química constante entre microalgas, protozoos, bacterias, hongos y animales sésiles asociados. Además, las dificultades técnicas de trabajar con estos organismos son consecuencia de los procesos de coevolución entre las especies donadoras y objetivo, que estimulan procesos alelopáticos que no siempre son visibles o que son paulatinos, y posteriormente se ven reflejados en la estructura de la comunidad. Además, las especies que coevolucionan conjuntamente en biopelículas presentan resistencia a las sustancias alelopáticas, a las que continuamente se encuentran expuestas. Por estas razones, explicar la gran variedad de los compuestos producidos, en consecuencia, tener acceso a solo una pequeña porción de los metabolitos sintetizados a



comparación de la gran gama que producen al estar en interacción (Allen *et al.*, 2016; Poulin *et al.*, 2020).

## IX. CONCLUSIÓN

La competencia entre especies bentónicas y/o epibentónicas juega un papel importante en la estructura de la comunidad y la formación de FANb. En este sentido, las interacciones alelopáticas entre dinoflagelados bentónicos y/o epibentónicos recientemente han sido exploradas. En el presente trabajo observamos diferentes mecanismos y efectos entre las especies *A. thermaeum* y *C. malayensis* en cultivos mixtos, sin contacto celular y con exposición de filtrados celulares. Se observaron efectos alelopáticos de *A. thermaeum* sobre *C. malayensis* y se confirmó que los efectos más agudos se presentaron a través del contacto celular y en exposición a filtrados en concentraciones mayores, además se sugiere que *A. thermaeum* utiliza esta estrategia para colonizar del espacio disponible, desarrollar sus funciones biológicas y fisiológicas, con la formación de biopelículas. Los efectos morfológicos evidentes fueron la disminución del movimiento, la clorosis, la ecdisis y la lisis celular. Estos resultados sugieren que *A. thermaeum* produce sustancias aleloquímicas para inhibir el crecimiento de sus potenciales competidores.

## XI. LITERATURA CITADA

- Abdennadher, M., Zouari, A. B., Medhioub, W., Penna, A., & Hamza, A. 2021. Characterization of *Coolia* spp. (Gonyaucales, Dinophyceae) from Southern Tunisia: first record of *Coolia malayensis* in the Mediterranean Sea. *Algae*, 36(3), 175-193. doi:10.4490/algae.2021.36.6.2
- Abdennadher, M., Zouari, A. B., Sahnoun, W. F., Walha, L. D., Mahfoudi, M., & Hamza, A. 2020. A long-term study on *Coolia monotis* distribution from the south-east Mediterranean Sea. *Continental Shelf Research*, 211, 104267. doi:10.1016/j.csr.2020.104267
- Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C., & Totti, C. 2015. Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis cf.*



- ovata* and macroalgae. *Harmful algae*, 49, 147-155. doi:10.1016/j.hal.2015.08.007
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C. G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., & Iacovo, E. D. 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine pollution bulletin*, 62(11), 2512-2519. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.08.003
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Colombo, F., & Totti, C. 2012. Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. *Harmful algae*, 19, 15-22. doi:10.1016/j.hal.2012.05.003
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., & Totti, C. 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful algae*, 34, 7-16. doi:10.1016/j.hal.2014.02.003
- Akakabe, M., Kumagai, K., Tsuda, M., Konishi, Y., Tominaga, A., Tsuda, M., Fukushi, E., & Kawabata, J. 2014. Amphirionin-5, a novel linear polyketide from a cultured marine dinoflagellate *Amphidinium* species with a potent cell proliferation-promoting activity. *Tetrahedron letters*, 55(24), 3491-3494. doi:10.1016/j.tetlet.2014.04.086
- Al-Qassab, S., Lee, W. J., Murray, S., Simpson, A., & Patterson, D. 2001. Flagellates from Stromatolites and surrounding sediments in Shark Bay, Western Australia. *Acta Protozoologica*, 41, 91-144.
- Aligizaki, K., & Nikolaidis, G. 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful algae*, 5(6), 717-730. doi:10.1016/j.hal.2006.02.005
- Allen, J. L., Ten-Hage, L., & Leflaive, J. 2016. Allelopathic interactions involving benthic phototrophic microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 752-762. doi:10.1111/1758-2229.12436
- Andersen, R. A., & America, P. S. o. 2005. *Algal culturing techniques* (Press, A. Ed.). Burlington, Mass: Elsevier Science.
- Aquino-Cruz, A., Band-Schmidt, C., & Zenteno-Savín, T. 2020. Superoxide production rates and hemolytic activity linked to cellular growth phases in *Chattonella*



- species (Raphidophyceae) and *Margalefidinium polykrikoides* (Dinophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 4029-4046. doi:10.1007/s10811-020-02218-w
- Aquino-Cruz, A., & Okolodkov, Y. B. 2016. Impact of increasing water temperature on growth, photosynthetic efficiency, nutrient consumption, and potential toxicity of *Amphidinium* cf. *carterae* and *Coolia monotis* (Dinoflagellata). *Revista de biología marina y oceanografía*, 51(3), 565-580. doi:10.4067/S0718-19572016000300008
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., & Ben Maiz, N. 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environmental Monitoring and Assessment*, 164(1), 423-433. doi:10.1007/s10661-009-0903-z
- Atkinson, S., & Williams, P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(40), 959-978. doi:10.1098/rsif.2009.0203
- Bagnis, R. 1994. *Natural versus anthropogenic disturbances to coral reefs: comparison in epidemiological patterns of ciguatera*. Paper presented at the Memoirs of the Queensland Museum, Brisbane.
- Bagnis, R., Bennett, J., Barsinas, M., Drollet, J., Jacquet, G., Legrand, A., Cruchet, P., & Pascal, H. 1988. *Correlation between ciguateric fish and damage to reefs in the Gambier Islands (French Polynesia)*. Paper presented at the Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium, Townsville, Australia.
- Baig, H. S., Saifullah, S. M., & Dar, A. 2006. Occurrence and toxicity of *Amphidinium carterae* Hulbert in the North Arabian Sea. *Harmful algae*, 5(2), 133-140. doi:10.1016/j.hal.2005.06.010
- Balech, E. 1956. Étude des dinoflagellés du sable de Roscoff. *Revue Algologique*, 2, 29-52.
- Band-Schmidt, C. J., Zumaya-Higuera, M. G., López-Cortés, D. J., Leyva-Valencia, I., Quijano-Scheggia, S. I., & Hernández-Guerrero, C. J. 2020. Allelopathic effects of *Margalefidinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum* in the growth of *Gymnodinium catenatum*. *Harmful algae*, 96, 101846.



doi:10.1016/j.hal.2020.101846

- Barlow, S. B., & Triemer, R. E. 1988. Alternate life history stages in *Amphidinium klebsii* (Dinophyceae, Pyrrophyta). *Phycologia*, 27(3), 413-420. doi:10.2216/i0031-8884-27-3-413.1
- Barreiro, A., & Vasconcelos, V. M. 2014. Interactions between allelopathic properties and growth kinetics in four freshwater phytoplankton species studied by model simulations. *Aquatic Ecology*, 48(2), 191-205. doi:10.1007/s10452-014-9475-2
- Bauer, I., Maranda, L., Young, K. A., Shimizu, Y., Fairchild, C., Cornell, L., MacBeth, J., & Huang, S. 1995a. Isolation and structure of Caribenolide I, a highly potent antitumor macrolide from a cultured free-swimming Caribbean dinoflagellate, *Amphidinium* sp. S1-36-5. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(4), 1084-1086. doi:10.1021/jo00109a050
- Bauer, I., Maranda, L., Young, K. A., Shimizu, Y., & Huang, S. 1995b. The isolation and structures of unusual 1, 4-polyketides from the dinoflagellate, *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 36(7), 991-994. doi:10.1016/0040-4039(94)02423-9
- Ben-Gharbia, H., Yahia, O. K.-D., Amzil, Z., Chomérat, N., Abadie, E., Masseret, E., Sibat, M., Zmerli Triki, H., Nouri, H., & Laabir, M. 2016. Toxicity and Growth Assessments of Three Thermophilic Benthic Dinoflagellates (*Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) Developing in the Southern Mediterranean Basin. *Toxins*, 8(10), 297. doi:10.3390/toxins8100297
- Ben Gharbia, H., Kéfi-Daly Yahia, O., Cecchi, P., Masseret, E., Amzil, Z., Herve, F., Rovillon, G., Nouri, H., M'rabet, C., & Couet, D. 2017. New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates. *PloS one*, 12(11), e0187963. doi:10.1371/journal.pone.0187963
- Berdalet, E., Tester, P. A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., & Zingone, A. 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30(1), 36-45. doi:10.5670/oceanog.2017.108
- Besada, E., Loeblich, L., & Loeblich Iii, A. 1982a. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science*, 32(3), 723-735.



- Besada, E. G., Loeblich, L. A., & Loeblich Iii, A. R. 1982b. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science -Miami-(B MAR SCI)*, 32(3), 723-735.
- Bhaud, Y., & Soyer-Gobillard, M.-O. 1988. Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *Journal of Cell Science* 89.
- Biecheler, B. 1952. Recherches sur les Peridiniens. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, 36, 1-149.
- Blackburn, S. I., Bolch, C. J. S., Haskard, K. A., & Hallegraeff, G. M. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40(1), 78-87. doi:10.2216/i0031-8884-40-1-78.1
- Boisnoir, A., Pavaux, A.-S., Schizas, N. V., Marro, S., Blasco, T., Lemée, R., & Pascal, P.-Y. 2020. The use of stable isotopes to measure the ingestion rate of potentially toxic benthic dinoflagellates by harpacticoid copepods. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 524, 151285. doi:10.1016/j.jembe.2019.151285
- Borchhardt, N., Chomérat, N., Bilién, G., Zentz, F., Rhodes, L., Murray, S. A., & Hoppenrath, M. 2021. Morphology and molecular phylogeny of *Bindiferia* gen. nov. (Dinophyceae), a new marine, sand-dwelling dinoflagellate genus formerly classified within *Amphidinium*. *Phycologia*, 1-13. doi:10.1080/00318884.2021.1978040
- Botana, L. M. 2014. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*: CRC Press.
- Bravo, I., Figueroa, R. I., & Fraga, S. 2014. Cellular and nuclear morphological variability within a single species of the toxigenic dinoflagellate genus *Gambierdiscus*: relationship to life-cycle processes. *Harmful algae*, 40, 1-8. doi:10.1016/j.hal.2014.09.009
- Bravo, I., Isabel Figueroa, R., Garcés, E., Fraga, S., & Massanet, A. 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea*



- Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(3), 166-174.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.09.003>
- Bravo, I., Vila, M., Casabianca, S., Rodriguez, F., Rial, P., Riobó, P., & Penna, A. 2012. Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Harmful algae*, 18, 24-34. doi:10.1016/j.hal.2012.04.001
- Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C. J., Durán-Riveroll, L. M., Hernández-Sandoval, F. E., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. J., Cembella, A., & Krock, B. 2015. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Mexican Pacific as revealed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(3), 381-394. doi:10.1080/19440049.2014.1000978
- Cagide, E., Louzao, M. C., Espiña, B., Ares, I. R., Vieytes, M. R., Sasaki, M., Fuwa, H., Tsukano, C., Konno, Y., & Yotsu-Yamashita, M. 2011. Comparative cytotoxicity of gambierol versus other marine neurotoxins. *Chemical research in toxicology*, 24(6), 835-842. doi:10.1021/tx200038j
- Calado, A. J., Craveiro, S. C., & Moestrup, Ø. 1998. Taxonomy and ultrastructure of a freshwater, heterotrophic Amphidinium (Dinophyceae) that feeds on unicellular protists. *Journal of phycology*, 34(3), 536-554. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340536.x
- Carnicer, O., Guallar, C., Andree, K. B., Diogène, J., & Fernández-Tejedor, M. 2015. *Ostreopsis* cf. *ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors. *Environmental Research*, 143, 89-99. doi:10.1016/j.envres.2015.08.023
- Cembella, A. D. 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, 42(4), 420-447. doi:10.2216/i0031-8884-42-4-420.1
- Chaïb, S., Pistevos, J. C., Bertrand, C., & Bonnard, I. 2021. Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. *Algal Research*, 54, 102213. doi:10.1016/j.algal.2021.102213
- Chen, Y., Weng, Y., Zhou, M., Meng, Y., Liu, J., Yang, L., & Zuo, Z. 2019. Linalool-and  $\alpha$ -terpineol-induced programmed cell death in *Chlamydomonas reinhardtii*.



- Ecotoxicology and environmental safety*, 167(15), 435-440.  
doi:10.1016/j.ecoenv.2018.10.062
- Chinain, M., Faust, M. A., & Pauillac, S. 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus* sp. nov., *G. australes* sp. nov., and *G. polynesiensis* sp. nov. *Journal of phycology*, 35(6), 1282-1296. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3561282.x
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., & Pistocchi, R. 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(18), 2735-2744. doi:10.1002/rcm.4696
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., & Melchiorre, N. 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American society for mass spectrometry*, 19(1), 111-120. doi:10.1016/j.jasms.2007.11.001
- Conrad, W., & Kufferath, H. 1954. Recherches sur les eaux saumâtres des environs de Lilloo. II. Partie descriptive. Algues et protistes. - Considérations écologiques. *Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique - Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen*(127), 5-345.
- Cousseau, A., Siano, R., Probert, I., Bach, S., & Mehiri, M. 2020. Marine dinoflagellates as a source of new bioactive structures. In Rahman, A. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 65, pp. 125-171): Elsevier.
- Cruz-Rivera, E., & Villareal, T. A. 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful algae*, 5(5), 497-525. doi:10.1016/j.hal.2005.09.003
- Dakshini, K. 1994. Algal allelopathy. *The Botanical Review*, 60(2), 182-196. doi:10.1007/BF02856576
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772. doi:10.1038/nmeth.2109



- Daugbjerg, N., Hansen, G., Larsen, J., & Moestrup, Ø. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia*, 39(4), 302-317. doi:10.2216/i0031-8884-39-4-302.1
- David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., & Orive, E. 2020. *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *European journal of phycology*, 55(1), 76-88. doi:10.1080/09670262.2019.1651400
- Davies, J. 2013. Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of antibiotics*, 66(7), 361-364. doi:10.1038/ja.2013.61
- De Beer, D., Stoodley, P., & Lewandowski, Z. 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Research*, 30(11), 2761-2765. doi:10.1016/S0043-1354(96)00141-8
- de Queiroz Mendes, M. C., de Castro Nunes, J. M., Fraga, S., Rodríguez, F., FrancoJosé, M., Riobó, P., Branco, S., & Menezes, M. 2019. Morphology, molecular phylogeny and toxinology of *Coolia* and *Prorocentrum* strains isolated from the tropical South Western Atlantic Ocean. *Botanica Marina*, 62(2), 125-140. doi:10.1515/bot-2018-0053
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O. A., Mieszkina, S., Millet, L. J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B. P., Olsson, S., van Elsas, J. D., & Wick, L. Y. 2018. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
- Di Pippo, F., & Congestri, R. 2017. Culturing toxic benthic blooms: the fate of natural biofilms in a microcosm system. *Microorganisms*, 5(3), 46. doi:10.3390/microorganisms5030046
- Dodge, J. D., & Hart-Jones, B. 1982. *Marine dinoflagellates of the British Isles*. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Dolapsakis, N. P., & Economou-Amilli, A. 2009. A new marine species of *Amphidinium* (Dinophyceae) from Thermaikos Gulf, Greece. *Volume 48 Issue 2, 2009(2)*, 153-



170.

- Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., & Okolodkov, Y. B. 2019. A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the Coasts of Latin America. *Frontiers in Marine Science*, 6(148). doi:10.3389/fmars.2019.00148
- Durrett, R., & Levin, S. 1997. Allelopathy in spatially distributed populations. *Journal of theoretical biology*, 185(2), 165-171. doi:10.1006/jtbi.1996.0292
- Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., & Satake, M. 2005. The structures of five new antifúngica and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand. *Harmful algae*, 4(2), 383-389. doi:10.1016/j.hal.2004.07.004
- Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. 2021. raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(2), 373-377. doi:10.1111/2041-210X.13512
- Elbrächter, M. 2003. Dinophyte reproduction: progress and conflicts. *Journal of phycology*, 39(4), 629-632. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.39041.x
- Escalera, L., Benvenuto, G., Scalco, E., Zingone, A., & Montesor, M. 2014. Ultrastructural features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Protist*, 165(3), 260-274. doi:10.1016/j.protis.2014.03.001
- Faust, M. A. 1992. Observation on the morphology and sexual reproduction of *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Journal of phycology*, 28(1), 94-104. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00094.x
- Faust, M. A. 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellate (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of phycology*, 31(6), 996-1003. doi:10.1111/j.0022-3646.1995.00996.x
- Fensome, R. A. 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology, special publication*, 7, 1-351.
- Fernández-Herrera, L. J., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D. J., Hernández-Guerrero, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., & Núñez-Vázquez, E. 2016. Allelopathic effect of *Chattonella marina* var. *marina* (Raphidophyceae) on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Harmful algae*, 51, 1-9. doi:10.1016/j.hal.2015.10.009



- Fernández-Herrera, L. J., Band-Schmidt, C. J., Zenteno-Savín, T., Leyva-Valencia, I., Hernández-Guerrero, C. J., & Muñoz-Ochoa, M. 2021. Cell death and metabolic stress in *Gymnodinium catenatum* induced by allelopathy. *Toxins*, 13(7), 506. doi:10.3390/toxins13070506
- Figueroa, R. I., & Bravo, I. 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *Journal of phycology*, 41(2), 370-379. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04150.x
- Figueroa, R. I., Bravo, I., & Garcés, E. 2006. The multiple routes of sexuality in *Alexandrium taylori* (Dinophyceae) in culture. *Journal of phycology*, 42(5), 1028-1039. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00262.x
- Figueroa, R. I., Bravo, I., & Garcés, E. 2008. The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. *Harmful algae*, 7(5), 653-663. doi:10.1016/j.hal.2008.02.005
- Figueroa, R. I., Garcés, E., & Bravo, I. 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, Dinophyceae) in culture<sup>1</sup>. *Journal of phycology*, 43(5), 1039-1053. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00393.x
- Fistarol, G. O., Legrand, C., & Granéli, E. 2003. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Marine ecology progress series*, 255, 115-125. doi:10.3354/meps255115
- Fistarol, G. O., Legrand, C., Rengefors, K., & Granéli, E. 2004. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environmental Microbiology*, 6(8), 791-798. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00609.x
- Flewelling, L. J., Naar, J. P., Abbott, J. P., Baden, D. G., Barros, N. B., Bossart, G. D., Bottein, M. D., Hammond, D. G., Haubold, E. M., & Heil, C. A. 2005. Red tides and marine mammal mortalities. *Nature*, 435(7043), 755-756. doi:10.1038/nature435755a
- Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., & Zapata, M. 2008. *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of phycology*, 44(4), 1060-1070. doi:10.1111/j.1529-



8817.2008.00555.x

- Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., & Marañón, E. 2012. Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 171-179. doi:10.7872/crya.v33.iss2.2011.171
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., & Zapata, M. 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful algae*, 11, 10-22. doi:10.1016/j.hal.2011.06.013
- Freile-Pelegri, Y., & Robledo, D. 2013. Bioactive phenolic compounds from algae *Bioactive Compounds from Marine Foods* (pp. 113-129).
- Fuentes-Grünwald, C., Bayliss, C., Fonlut, F., & Chapuli, E. 2016. Long-term dinoflagellate culture performance in a commercial photobioreactor: *Amphidinium carterae* case. *Bioresource technology*, 218, 533-540. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.128
- Gantar, M., Berry, J. P., Thomas, S., Wang, M., Perez, R., & Rein, K. S. 2008. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 55-64. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00439.x
- Gárate-Lizárraga, I. 2012. Proliferation of *Amphidinium carterae* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) in Bahía de La Paz, Gulf of California. *CICIMAR Oceanides*, 27(2), 37-49. doi:10.37543/oceanides.v27i2.115
- Gárate-Lizárraga, I., González-Armas, R., Verdugo-Díaz, G., Okolodkov, Y. B., Pérez-Cruz, B., & Díaz-Ortiz, J. A. 2019. Seasonality of the dinoflagellate *Amphidinium* cf. *carterae* (Dinophyceae: Amphidinales) in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Marine pollution bulletin*, 146, 532-541. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.06.073
- Gárate-Lizárraga, I., Okolodkov, Y. B., & Cortés-Altamirano, R. 2016b. Microalgas formadoras de florecimientos algales en el Golfo de California. In García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A., & Núñez-Vázquez, E. J. (Eds.), *Florecimientos Algales Nocivos en Mexico* (pp. 130-145). Ensenada, México: CICESE.
- Gárate-Lizárraga, I., Verdugo-Díaz, G., & Okolodkov, Y. B. 2016a. Florecimientos



- algales nocivos en la costa occidental de Baja California Sur. In García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A., & Núñez-Vázquez, E. J. (Eds.), *Florecimientos Algales Nocivos en México* (pp. 44-59). Ensenada, México: CICESE.
- García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J. M., Bañuelos, R. M., & Rodríguez, F. 2016. Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*. *Harmful algae*, 60, 57-69. doi:10.1016/j.hal.2016.10.007
- García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J. M., & Rodríguez, F. 2014. *Allelopathic effects in dinoflagellates a case study of the benthic genus Ostreopsis and two non-toxic species from the genera Prorocentrum and Coolia*. Paper presented at the 7th World Congress on Allelopathy Vigo, España.
- Gayoso, A. M., Dover, S., Morton, S., Busman, M., Moeller, P., Fulco, V. K., & Maranda, L. 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima*(Dinophyceae) in Patagonian gulfs(Argentina). *Journal of Shellfish Research*, 21(2), 461-463.
- GEOHAB, G. E. a. O. o. H. A. B. 2012. *GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems* (Berdalet, E., Tester, P., & Zingone, A. Eds.): Paris and Newark.
- Glibert, P. M., Berdalet, E., Burford, M. A., Pitcher, G. C., & Zhou, M. 2018. *Global ecology and oceanography of harmful algal blooms* (Vol. 232): Springer.
- Gómez-Lizárraga, L. E., Durán-Riveroll, L. M., & Pérez-López, H. I. 2019. Scanning electron microscopy preparation method for *Coolia* sp., a delicate dinoflagellate. *Microscopy and Microanalysis*, 25(S2), 1180-1181. doi:10.1017/S1431927619006639
- Gómez, F. 2012. A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity*, 10(3), 267-275. doi:10.1080/14772000.2012.721021
- Gómez, F., Qiu, D., Otero-Morales, E., Lopes, R. M., & Lin, S. 2016. Circumtropical distribution of the epiphytic dinoflagellate *Coolia malayensis* (Dinophyceae):



- Morphology and molecular phylogeny from Puerto Rico and Brazil. *Phycological Research*, 64(3), 194-199. doi:10.1111/pre.12134
- Granéli, E., & Hansen, P. J. 2006. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In Granéli, E. & Turner, J. (Eds.), *Ecology of harmful algae* (Vol. 189, pp. 189-201). Berlin Heidelberg: Springer.
- Granéli, E., Vidyarthna, N. K., Funari, E., Cumaranatunga, P., & Scenati, R. 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful algae*, 10(2), 165-172. doi:10.1016/j.hal.2010.09.002
- Granéli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful algae*, 8(1), 94-102. doi:10.1016/j.hal.2008.08.011
- Gross, E. M. 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical reviews in plant sciences*, 22(3-4), 313-339. doi:10.1080/713610859
- Gross, E. M., Legrand, C., Rengefors, K., & Tillmann, U. 2012. Allelochemical interactions among aquatic primary producers. In Brönmark, C. & Hansson, L. A. (Eds.), *Chemical ecology in aquatic systems* (pp. 196-209): Oxford University Press.
- Gu, J., Yan, M., Leung, P. T. Y., Tian, L., Lam, V. T. T., Cheng, S. H., & Lam, P. K. S. 2021. Toxicity effects of hydrophilic algal lysates from *Coolia tropicalis* on marine medaka larvae (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, 234, 105787. doi:10.1016/j.aquatox.2021.105787
- Guillard, R. 1973. Division Rates In Stein, R. J. (Ed.), *Handbook of Phycological methods* (pp. 289-311). London: Chambridge Universty Press.
- Hachani, M. A., Dhib, A., Fathalli, A., Ziadi, B., Turki, S., & Aleya, L. 2018. Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis. *Harmful algae*, 77, 29-42. doi:10.1016/j.hal.2018.06.006
- Hakanen, P., Suikkanen, S., & Kremp, A. 2014. Allelopathic activity of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: Intra-population variability and response of co-occurring dinoflagellates. *Harmful algae*, 39, 287-294. doi:https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.005
- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global



- increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99. doi:10.2216/i0031-8884-32-2-79.1
- Hallegraeff, G. M. 2003. Harmful algal blooms: A global overview. In Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., & Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on harmful marine microalgae* (2 ed., Vol. 33, pp. 25-49). Paris: UNESCO.
- Hieda, M., Sorada, A., Kinoshita, M., & Matsumori, N. 2021. Amphidinol 3 preferentially binds to cholesterol in disordered domains and disrupts membrane phase separation. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100941. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100941
- Hillebrand, H., Dürselen, C., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae *Journal of phycology*, 35(2), 403-424. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x
- Ho, T. V., & Nguyen, L. N. 2014. Morphology and distribution of the three epiphytic dinoflagellate species *Coolia monotis*, *C. tropicalis*, and *C. canariensis* (Ostreopsidaceae, Gonyaulacales, Dinophyceae) from Vietnamese coastal waters. *Ocean Science Journal*, 49(3), 211-221. doi:10.1007/s12601-014-0021-x
- Holmes, M. J., Lewis, R. J., Jones, A., & Hoy, A. W. W. 1995. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (dinophyceae). *Natural Toxins*, 3(5), 355-362. doi:10.1002/nt.2620030506
- Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., & Tubaro, A. 2013. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PloS one*, 8(2), e57291. doi:10.1371/journal.pone.0057291
- Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., & Horiguchi, T. 2014. *Marine benthic dinoflagellates-unveiling their worldwide biodiversity* (Vol. 54). Germany: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Hosoi-Tanabe, S., Otake, I., & Sako, Y. 2006. Phylogenetic analysis of noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, and *C. verruculosa* (Raphidophyceae) based on the rRNA gene family. *Fisheries Science*, 72(6), 1200-1208. doi:10.1111/j.1444-2906.2006.01277.x



- Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., & Murata, M. 2004. Membrane-permeabilizing activities of amphidinol 3, polyene-polyhydroxy antifúngica from a marine dinoflagellate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(1), 91-100. doi:10.1016/j.bbamem.2004.09.002
- Huang, H., Gan, C., Huang, J., Zou, C., Li, H., Liu, J., & Yang, W. 2021. Variability of *Prorocentrum donghaiense* response to allelopathic action from *Alexandrium pacificum* in laboratory culture. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(4), 1305–1315. doi:10.1007/s00343-020-0226-z
- Ianora, A., Bentley, M. G., Caldwell, G. S., Casotti, R., Cembella, A. D., Engström-Öst, J., Halsband, C., Sonnenschein, E., Legrand, C., Llewellyn, C. A., Paldavičienė, A., Pilkaityte, R., Pohnert, G., Razinkovas, A., Romano, G., Tillmann, U., & Vaiciute, D. 2011. The Relevance of Marine Chemical Ecology to Plankton and Ecosystem Function: An Emerging Field. *Marine Drugs*, 9(9), 1625-1648.
- Ianora, A., Boersma, M., Casotti, R., Fontana, A., Harder, J., Hoffmann, F., Pavia, H., Potin, P., Poulet, S., & Toth, G. 2006. New trends in marine chemical ecology. *Estuaries and coasts*, 29(4), 531-551. doi:10.1007/BF02784281
- Ianora, A., Miralto, A., & Romano, G. 2012. Antipredatory Defensive Role of Planktonic Marine Natural Products. In Fattorusso, E., Gerwick, W. H., & Tagliatela-Scafati, O. (Eds.), *Handbook of Marine Natural Products* (pp. 711-748). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Igarashi, T., Aritake, S., & Yasumoto, T. 1998. Biological activities of prymnesin-2 isolated from a red tide alga *Prymnesium parvum*. *Natural Toxins*, 6(1), 35-41. doi:10.1002/(SICI)1522-7189(199802)6:1<35::AID-NT7>3.0.CO;2-7
- Inuzuka, T., Yamada, K., & Uemura, D. 2014. Amdigenols E and G, long carbon-chain polyol compounds, isolated from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 55(46), 6319-6323. doi:10.1016/j.tetlet.2014.09.094
- Inuzuka, T., Yamamoto, Y., Yamada, K., & Uemura, D. 2012. Amdigenol A, a long carbon-backbone polyol compound, produced by the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 53(2), 239-242. doi:10.1016/j.tetlet.2011.11.033
- Ismael, A. A.-H., Halim, Y., & Khalil, A.-G. 1999. Optimum growth conditions for



- Amphidinium carterae* Hulburt from eutrophic waters in Alexandria (Egypt) and its toxicity to the brine shrimp *Artemia salina*. *Grana*, 38(2-3), 179-185. doi:10.1080/00173139908559226
- Jeong, H. J., Yih, W., Kang, N. S., Lee, S. Y., Yoon, E. Y., Yoo, Y. D., Kim, H. S., & Kim, J. H. 2012. First report of the epiphytic benthic dinoflagellates *Coolia canariensis* and *Coolia malayensis* in the waters off Jeju Island, Korea: morphology and rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(2), 114-133. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00610.x
- Ji, X.-q., Han, X.-t., Yang, B.-j., & Yu, Z. 2012. Analysis on allelochemicals in the cell-free filtrates of *Amphidinium carterae*. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica*, 32(6), 1745-1754. doi:10.5846/stxb201102170180
- Jiménez-López, C., Pereira, A., Lourenço-Lopes, C., García-Oliveira, P., Cassani, L., Fraga-Corral, M., Prieto, M., & Simal-Gandara, J. 2021. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chemistry*, 341, 128262. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128262
- John, U., Tillmann, U., Hülskötter, J., Alpermann, T. J., Wohlrab, S., & Van de Waal, D. B. 2015. Intraspecific facilitation by allelochemical mediated grazing protection within a toxigenic dinoflagellate population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798), 20141268. doi:10.1098/rspb.2014.1268
- Jonsson, P. R., Pavia, H., & Toth, G. 2009. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11177-11182. doi:10.1073/pnas.0900964106
- Jørgensen, M. F., Murray, S., & Daugbjerg, N. 2004a. *Amphidinium* revisited. I. Redefinition of *Amphidinium* (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses. *Journal of phycology*, 40(2), 351-365. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03131.x
- Jørgensen, M. F., Murray, S., & Daugbjerg, N. 2004b. A new genus of athecate interstitial dinoflagellates, *Togula* gen. nov., previously encompassed within *Amphidinium* sensu lato: Inferred from light and electron microscopy and



- phylogenetic analyses of partial large subunit ribosomal DNA sequences. *Phycological Research*, 52(3), 284-299. doi:10.1111/j.1440-183.2004.00352.x
- Junqueira de Azevedo Tibiriçá, C. E., Sibat, M., Fernandes, L. F., Bilien, G., Chomérat, N., Hess, P., & Mafra Jr, L. L. 2020. Diversity and toxicity of the genus *Coolia* Meunier in Brazil, and detection of 44-methyl gambierone in *Coolia tropicalis*. *Toxins*, 12(5), 327.
- Karafas, S., Teng, S. T., Leaw, C. P., & Alves-de-Souza, C. 2017. An evaluation of the genus *Amphidinium* (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species. *Harmful algae*, 68, 128-151.
- Karafas, S., York, R., & Tomas, C. 2015. Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Harmful algae*, 46, 18-33. doi:10.1016/j.hal.2015.05.002
- Kearns, K. D., & Hunter, M. D. 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial ecology*, 42(1), 80-86. doi:10.1007/s002480000086
- Kellmann, R., Stüken, A., Orr, R. J. S., Svendsen, H. M., & Jakobsen, K. S. 2010. Biosynthesis and molecular genetics of polyketides in marine dinoflagellates. *Marine Drugs*, 8(4), 1011-1048. doi:10.3390/md8041011
- Kobayashi, J., Ishibashi, M., Walchli, M. R., Nakamura, H., Hirata, Y., Sasaki, T., & Ohizumi, Y. 1988. Amphidinolide C: the first twenty-five membered macrocyclic lactone with potent antineoplastic activity from the cultured dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Journal of the American Chemical Society*, 110(2), 490-494. doi:10.1021/ja00210a029
- Kobayashi, J. i. 2008. Amphidinolides and its related macrolides from marine dinoflagellates. *The Journal of antibiotics*, 61(5), 271-284. doi:[doi.org/10.1038/ja.2008.39](https://doi.org/10.1038/ja.2008.39)
- Kobayashi, J. i., Ishibashi, M., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Yamasu, T., Sasaki, T., & Hirata, Y. 1986. Amphidinolide-A, a novel antineoplastic macrolide from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 27(47), 5755-5758.



doi:10.1016/S0040-4039(00)85318-6

- Kobayashi, J. i., & Kubota, T. 2007. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium*. *Journal of natural products*, 70(3), 451-460. doi:10.1021/np0605844
- Kobayashi, J. i., & Tsuda, M. 2004. Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Natural product reports*, 21(1), 77-93. doi:10.1039/B310427N
- Kobayashi, J. i., Yamaguchi, N., & Ishibashi, M. 1994. Amphidin A, a novel amphidinolide-related metabolite from the cultured marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 35(38), 7049-7050. doi:10.1016/0040-4039(94)88222-3
- Konarzewska, Z., Śliwińska-Wilczewska, S., Felpeto, A. B., Vasconcelos, V., & Latała, A. 2020. Assessment of the allelochemical activity and biochemical profile of different phenotypes of picocyanobacteria from the genus *Synechococcus*. *Marine Drugs*, 18(4), 179. doi:10.3390/md18040179
- Kubota, T., Iwai, T., Ishiyama, H., Sakai, K., Gono, T., & Kobayashi, J. i. 2015. Amphidin G, a putative biosynthetic precursor of amphidin A from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron letters*, 56(8), 990-993. doi:10.1016/j.tetlet.2015.01.058
- Kumagai, K., Minamida, M., Akakabe, M., Tsuda, M., Konishi, Y., Tominaga, A., Tsuda, M., Fukushi, E., & Kawabata, J. 2015. Amphirionin-2, a novel linear polyketide with potent cytotoxic activity from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(3), 635-638. doi:10.1016/j.bmcl.2014.12.003
- Kuzat, N., Baricevic, A., Tankovic, M. S., Pfannkuchen, D. M., Ivancic, I., & Pfannkuchen, M. 2021. A study on *Ostreopsis* cf. *ovata* along the eastern Adriatic coast. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101808. doi:10.1016/j.rsma.2021.101808
- Landa, M., Burns, A. S., Roth, S. J., & Moran, M. A. 2017. Bacterial transcriptome remodeling during sequential co-culture with a marine dinoflagellate and diatom. *The ISME journal*, 11(12), 2677-2690. doi:10.1038/ismej.2017.117



- Larsen, A., Bryant, S., & Båmstedt, U. 1998. Growth rate and toxicity of *Prymnesium parvum* and *Prymnesium patelliferum* (Haptophyta) in response to changes in salinity, light and temperature. *Sarsia*, 83(5), 409-418. doi:10.1080/00364827.1998.10413700
- Larsen, J. 1985. Algal studies of the Danish Wadden Sea. II. A taxonomic study of psammobious dinoflagellates. *Opera botanica*, 79, 14-37.
- Larsen, J., & Patterson, D. J. 1990. Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. *Journal of Natural History*, 24(4), 801-937. doi:10.1080/00222939000770571
- Larsson, M. E., Smith, K. F., & Doblin, M. A. 2019. First description of the environmental niche of the epibenthic dinoflagellate species *Coolia palmyrensis*, *C. malayensis*, and *C. tropicalis* (Dinophyceae) from Eastern Australia. *Journal of phycology*, 55(3), 565-577. doi:10.1111/jpy.12833
- Lauritano, C., De Luca, D., Ferrarini, A., Avanzato, C., Minio, A., Esposito, F., & Ianora, A. 2017. De novo transcriptome of the cosmopolitan dinoflagellate *Amphidinium carterae* to identify enzymes with biotechnological potential. *Scientific reports*, 7, 11701. doi:10.1038/s41598-017-12092-1
- Laza-Martínez, A., David, H., Riobó, P., Miguel, I., & Orive, E. 2016. Characterization of a Strain of *Fukuyoa paulensis* (Dinophyceae) from the Western Mediterranean Sea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(4), 481-497. doi:10.1111/jeu.12292
- Laza-Martinez, A., Orive, E., & Miguel, I. 2011. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European journal of phycology*, 46(1), 45-65. doi:10.1080/09670262.2010.550387
- Leaw, C.-P., Lim, P.-T., Cheng, K.-W., Ng, B.-K., & Usup, G. 2010. Morphology and molecular characterization of new species of thecate benthic dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of phycology*, 46(1), 162-171. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00778.x
- Leaw, C. P., Tan, T. H., Lim, H. C., Teng, S. T., Yong, H. L., Smith, K. F., Rhodes, L., Wolf, M., Holland, W. C., & Vandersea, M. W. 2016. New scenario for speciation



- in the benthic dinoflagellate genus *Coolia* (Dinophyceae). *Harmful algae*, 55, 137-149. doi:10.1016/j.hal.2016.02.010
- Lee, E. S., Hwang, J., Hyung, J.-H., & Park, J. 2021. Detection of the benthic dinoflagellates, *Ostreopsis* cf. *ovata* and *Amphidinium massartii* (Dinophyceae), using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(8), 885. doi:10.3390/jmse9080885
- Lee, J. J., Olea, R., Cevalco, M., Pochon, X., Correia, M., Shpigel, M., & Pawlowski, J. 2003a. A marine dinoflagellate, *Amphidinium eilatiensis* n. sp., from the benthos of a mariculture sedimentation pond in Eilat, Israel. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(6), 439-448. doi:10.1111/j.1550-7408.2003.tb00270.x
- Lee, J. J., Shpigel, M., Freeman, S., Zmora, O., McLeod, S., Bowen, S., Pearson, M., & Szostek, A. 2003b. Physiological ecology and possible control strategy of a toxic marine dinoflagellate, *Amphidinium* sp., from the benthos of a mariculture pond. *Aquaculture*, 217(1), 351-371. doi:10.1016/S0044-8486(02)00373-3
- Lee, K. H., Jeong, H. J., Park, K., Kang, N. S., Yoo, Y. D., Lee, M. J., Lee, J.-w., Lee, S., Kim, T., & Kim, H. S. 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic dinoflagellate *Amphidinium massartii*, isolated from the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Algae*, 28(3), 213-231. doi:10.4490/algae.2013.28.3.213
- Leflaive, J. p., & Ten-Hage, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, 52(2), 199-214. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Graneli, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406-419. doi:10.2216/i0031-8884-42-4-406.1
- Leung, P. T., Yan, M., Lam, V. T., Yiu, S. K., Chen, C.-Y., Murray, J. S., Harwood, D. T., Rhodes, L. L., Lam, P. K., & Wai, T.-C. 2018. Phylogeny, morphology and toxicity of benthic dinoflagellates of the genus *Fukuyoa* (Goniodomataceae, Dinophyceae) from a subtropical reef ecosystem in the South China Sea. *Harmful algae*, 74, 78-97. doi:10.1016/j.hal.2018.03.003



- Leung, P. T., Yan, M., Yiu, S. K., Lam, V. T., Ip, J. C., Au, M. W., Chen, C.-Y., Wai, T.-C., & Lam, P. K. 2017. Molecular phylogeny and toxicity of harmful benthic dinoflagellates *Coolia* (Ostreopsidaceae, Dinophyceae) in a sub-tropical marine ecosystem: the first record from Hong Kong. *Marine pollution bulletin*, 124(2), 878-889. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.01.017
- Lewis, N. I., Wolny, J. L., Achenbach, J. C., Ellis, L., Pitula, J. S., Rafuse, C., Rosales, D. S., & McCarron, P. 2018. Identification, growth and toxicity assessment of *Coolia* Meunier (Dinophyceae) from Nova Scotia, Canada. *Harmful algae*, 75, 45-56. doi:10.1016/j.hal.2018.04.001
- Lewis, R., Holmes, M., & Sellin, M. 1994. Invertebrates implicated in the transfer of gambiertoxins to the benthic carnivore *Pomadasyss maculatus*. *Memoirs-Queensland Museum*, 34(3), 561-564.
- Lewis, R. J. 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon*, 39(1), 97-106. doi:10.1016/s0041-0101(00)00161-6
- Lewis, W. M. 1986. Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae. *The American Naturalist*, 127(2), 184-194.
- Leyva-Valencia, I., Hernández-Castro, J. E., Band-Schmidt, C. J., Turner, A. D., O'Neill, A., Núñez-Vázquez, E. J., López-Cortés, D. J., Bustillos-Guzmán, J. J., & Hernández-Sandoval, F. E. 2021. Lipophilic toxins in wild bivalves from the Southern Gulf of California, Mexico. *Marine Drugs*, 19(2), 99. doi:10.3390/md19020099
- Li, X., Yan, M., Gu, J., Lam, V. T., Wai, T.-C., Baker, D. M., Thompson, P. D., Yiu, S. K., Lam, P. K., & Leung, P. T. 2020. The effect of temperature on physiology, toxicity and toxin content of the benthic dinoflagellate *Coolia malayensis* from a seasonal tropical región. *Water Research*, 185, 116264. doi:10.1016/j.watres.2020.116264
- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., & Jiang, D.-A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933-8952. doi:10.3390/molecules15128933
- Liow, G. R., Lau, W. L. S., Law, I. K., Gu, H., Leaw, C. P., & Lim, P. T. 2021. Sexual processes and life cycle transitions of the tropical Pacific *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Phycological Research*, 69(3), 188-199. doi:10.1111/pre.12460



- Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., Chinain, M., Holmes, M. J., & Tester, P. A. 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, 56(5), 711-730. doi:10.1016/j.toxicon.2010.05.017
- Liu, B.-Y., Zhou, P.-J., Tian, J.-R., & Jiang, S.-Y. 2007. Effect of pyrogallol on the growth and pigment content of cyanobacteria-blooming toxic and nontoxic *Microcystis aeruginosa*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(6), 499-502.
- Longo, S., Sibat, M., Viallon, J., Darius, H. T., Hess, P., & Chinain, M. 2019. Intraspecific variability in the toxin production and toxin profiles of In Vitro cultures of *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) from French Polynesia. *Toxins*, 11(12), 735. doi:10.3390/toxins11120735
- López-Rodríguez, M., Cerón-García, M., López-Rosales, L., González-López, C., Molina-Miras, A., Ramírez-González, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. 2019. Assessment of multi-step processes for an integral use of the biomass of the marine microalga *Amphidinium carterae*. *Bioresource technology*, 282, 370-377. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.041
- López-Rodríguez, M., Cerón-García, M. C., López-Rosales, L., Navarro-López, E., Sánchez-Mirón, A., Molina-Miras, A., Abreu, A. C., Fernández, I., & García-Camacho, F. 2020. Improved extraction of bioactive compounds from biomass of the marine dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae*. *Bioresource technology*, 313, 123518. doi:10.1016/j.biortech.2020.123518
- Lu, Z., Sha, J., Tian, Y., Zhang, X., Liu, B., & Wu, Z. 2017. Polyphenolic allelochemical pyrogallic acid induces caspase-3 (like)-dependent programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Algal Research*, 21, 148-155. doi:10.1016/j.algal.2016.11.007
- Lu, Z., Zhang, Y., Gao, Y., Liu, B., Sun, X., He, F., Zhou, Q., & Wu, Z. 2016. Effects of pyrogallic acid on *Microcystis aeruginosa*: oxidative stress related toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 413-419. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.06.039
- Lyczkowski, E. R., & Karp-Boss, L. 2014. Allelopathic effects of *Alexandrium fundyense*



- (Dinophyceae) on *Thalassiosira cf. gravida* (Bacillariophyceae): a matter of size. *Journal of phycology*, 50(2), 376-387. doi:10.1111/jpy.12172
- Ma, Z., Fang, T., Thring, R. W., Li, Y., Yu, H., Zhou, Q., & Zhao, M. 2015. Toxic and non-toxic strains of *Microcystis aeruginosa* induce temperature dependent allelopathy toward growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Harmful algae*, 48, 21-29. doi:10.1016/j.hal.2015.07.002
- Macías, F. A., Galindo, J. L., García-Díaz, M. D., & Galindo, J. C. 2008. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 155-178. doi:10.1007/s11101-007-9065-1
- MacKenzie, L., Sims, I., Beuzenberg, V., & Gillespie, P. 2002. Mass accumulation of mucilage caused by dinoflagellate polysaccharide exudates in Tasman Bay, New Zealand. *Harmful algae*, 1(1), 69-83. doi:10.1016/S1568-9883(02)00006-9
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R., Potter, S. C., & Finn, R. D. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636-W641. doi:10.1093/nar/gkz268
- Mandal, S. K., Singh, R. P., & Patel, V. 2011. Isolation and characterization of exopolysaccharide secreted by a toxic dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and its probable role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial ecology*, 62(3), 518-527. doi:10.1007/s00248-011-9852-5
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., & Ruggieri, N. 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine pollution bulletin*, 56(6), 1209-1214. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.028
- Maranda, L., & Shimizu, Y. 1996. *Amphidinium operculatum* var. nov. *gibbosum* (Dinophyceae), a free-swimming marine species producing cytotoxic metabolites. *Journal of phycology*, 32(5), 873-879. doi:10.1111/j.0022-3646.1996.00873.x
- Mateos, R., Pérez-Correa, J. R., & Domínguez, H. 2020. Bioactive properties of marine phenolics. *Marine Drugs*, 18(10), 501. doi:10.3390/md18100501



- Mejía-Camacho, A. L., Durán-Riveroll, L. M., & Cembella, A. D. 2021. Toxicity bioassay and cytotoxic effects of the benthic marine dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Journal of Xenobiotics*, 11(2), 33-45. doi:10.3390/jox11020003
- Meng, Y., Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C., & Wright, J. L. C. 2010. Structure and biosynthesis of Amphidinol 17, a hemolytic compound from *Amphidinium carterae*. *Journal of natural products*, 73(3), 409-415. doi:10.1021/np900616q
- Meunier, A. 1919. Mikroplankton de la mer Flamande. III. Les Péridiniens. *Memoirs du Museum Royale d'Histoire Naturelle Bruxelles*, 8, 3-116.
- Minamida, M., Kumagai, K., Ulanova, D., Akakabe, M., Konishi, Y., Tominaga, A., Tanaka, H., Tsuda, M., Fukushi, E., Kawabata, J., Masuda, A., & Tsuda, M. 2014. Amphirionin-4 with potent proliferation-promoting activity on bone marrow stromal cells from a marine dinoflagellate *Amphidinium* Species. *Organic Letters*, 16(18), 4858-4861. doi:10.1021/ol5023504
- Moestrup, Ø., & Calado, A. J. 2018. *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 6- Freshwater Flora of Central Europe, Vol. 6: Dinophyceae* (Vol. 6): Springer-Verlag.
- Mohammad-Noor, N., Moestrup, Ø., Lundholm, N., Fraga, S., Adam, A., Holmes, M. J., & Saleh, E. 2013. Autecology and phylogeny of *Coolia tropicalis* and *Coolia malayensis* (Dinophyceae), with emphasis on taxonomy of *C. tropicalis* based on light microscopy, scanning electron microscopy and LSU rDNA. *Journal of phycology*, 49(3), 536-545. doi:10.1111/jpy.12062
- Molina-Miras, A., López-Rosales, L., Sánchez-Mirón, A., López-Rodríguez, M., Cerón-García, M., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. 2020. Influence of culture medium recycling on the growth of a marine dinoflagellate microalga and bioactives production in a raceway photobioreactor. *Algal Research*, 47, 101820. doi:10.1016/j.algal.2020.101820
- Molisch, H. 1937. *Der einfluss einer pflanze auf die andere, allelopathie von Hans Molisch. Mit 15 abbildungen im text*. Jena: Verlag von Gustav Fischer.
- Mollo, E., Garson, M., Polese, G., Amodeo, P., & Ghiselin, M. 2017. Taste and smell in aquatic and terrestrial environments. *Natural product reports*, 34(5), 496-513. doi:10.1039/C7NP00008A



- Momigliano, P., Sparrow, L., Blair, D., & Heimann, K. 2013. The diversity of *Coolia* spp. (Dinophyceae Ostreopsidaceae) in the central Great Barrier Reef region. *PLoS one*, 8(10), e79278. doi:10.1371/journal.pone.0079278
- Monti, M., & Cecchin, E. 2012. Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 113-119, 117.
- Moreira-González, A. R., Fernandes, L. F., Uchida, H., Uesugi, A., Suzuki, T., Chomérat, N., Bilien, G., Pereira, T. A., & Mafrá, L. L. 2019. Morphology, growth, toxin production, and toxicity of cultured marine benthic dinoflagellates from Brazil and Cuba. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3699-3719. doi:10.1007/s10811-019-01855-0
- Morquecho-Escamilla, L., Reyes-Salinas, A., & Okolodkov, Y. 2016. *Illustrated taxonomic guide of the Marine Dinoflagellate Collection (CODIMAR)/ Guía taxonómica ilustrada de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR)*. La Paz, Baja California Sur, México.
- Morquecho-Escamilla, L., Reyes-Salinas, A., Okolodkov, Y. B., Gárate-Lizárraga, I., Mazariegos-Villarreal, A., & Galicia-García, C. 2017, 23-27 de octubre. *Aislamiento y caracterización taxonómica de dinoflagelados epífitos en Bahía de la Paz e Isla San José, Golfo de California*. Paper presented at the Resúmenes del 4º Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos A.C. y la 2ª Reunión de la Asociación Latinoamericana para el Estudio de Algas Nocivas, Cancún, Quintana Roo, México.
- Murata, M., Matsuoka, S., Matsumori, N., Paul, G. K., & Tachibana, K. 1999. Absolute configuration of Amphidinol 3, the first complete structure determination from Amphidinol homologues: application of a new configuration analysis based on carbon-hydrogen spin-coupling constants. *Journal of the American Chemical Society*, 121(4), 870-871. doi:10.1021/ja983655x
- Murray, J. S., Finch, S. C., Puddick, J., Rhodes, L. L., Harwood, D. T., van Ginkel, R., & Prinsep, M. R. 2021. Acute toxicity of gambierone and quantitative analysis of gambierones produced by cohabitating benthic dinoflagellates. *Toxins*, 13(5),



333. doi:10.3390/toxins13050333

- Murray, J. S., Nishimura, T., Finch, S. C., Rhodes, L. L., Puddick, J., Harwood, D. T., Larsson, M. E., Doblin, M. A., Leung, P., Yan, M., Rise, F., Wilkins, A. L., & Prinsep, M. R. 2020. The role of 44-methylgambierone in ciguatera fish poisoning: acute toxicity, production by marine microalgae and its potential as a biomarker for *Gambierdiscus* spp. *Harmful algae*, 97, 101853. doi:10.1016/j.hal.2020.101853
- Murray, S., Flø Jørgensen, M., Daugbjerg, N., & Rhodes, L. 2004. *Amphidinium* revisited. II. Resolving species boundaries in the *Amphidinium operculatum* species complex (Dinophyceae), including the descriptions of *Amphidinium trulla* sp. nov. and *Amphidinium gibbosum* comb. nov. *Journal of phycology*, 40(2), 366-382. doi:10.1046/j.1529-8817.2004.03132.x
- Murray, S., Flø Jørgensen, M., Ho, S. Y. W., Patterson, D. J., & Jermiin, L. S. 2005. Improving the analysis of dinoflagellate phylogeny based on rDNA. *Protist*, 156(3), 269-286. doi:10.1016/j.protis.2005.05.003
- Murray, S., & Patterson, D. 2002. The benthic dinoflagellate genus *Amphidinium* in south-eastern Australian waters, including three new species. *European journal of phycology*, 37(2), 279-298. doi:10.1017/S0967026202003591
- Murray, S. A., Garby, T., Hoppenrath, M., & Neilan, B. A. 2012. Genetic diversity, morphological uniformity and polyketide production in dinoflagellates (*Amphidinium*, Dinoflagellata). *PloS one*, 7(6), e38253. doi:10.1371/journal.pone.0038253
- Murray, S. A., Kohli, G. S., Farrell, H., Spiers, Z. B., Place, A. R., Dorantes-Aranda, J. J., & Ruszczyk, J. 2015. A fish kill associated with a bloom of *Amphidinium carterae* in a coastal lagoon in Sydney, Australia. *Harmful algae*, 49, 19-28. doi:10.1016/j.hal.2015.08.003
- Nagai, H., Torigoe, K., Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., & Hirota, H. 1992. Gambieric acids: unprecedented potent antifungic substances isolated from cultures of a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society*, 114(3), 1102-1103. doi:10.1021/ja00029a057
- Nakajima, I., Oshima, Y., & Yasumoto, T. 1981. Toxicity of Benthic Dinoflagellates in



- Okinawa. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 47(8), 1029-1033.  
doi:10.2331/suisan.47.1029
- Nascimento, S. M., da Silva, R. A. F., Oliveira, F., Fraga, S., & Salgueiro, F. 2019. Morphology and molecular phylogeny of *Coolia tropicalis*, *Coolia malayensis* and a new lineage of the *Coolia canariensis* species complex (Dinophyceae) isolated from Brazil. *European journal of phycology*, 54(3), 484-496. doi:10.1080/09670262.2019.1599449
- Nascimento, S. M., Mendes, M. C. Q., Menezes, M., Rodríguez, F., Alves-de-Souza, C., Branco, S., Riobó, P., Franco, J., Nunes, J. M. C., & Huk, M. 2017. Morphology and phylogeny of *Prorocentrum caipirignum* sp. nov. (Dinophyceae), a new tropical toxic benthic dinoflagellate. *Harmful algae*, 70, 73-89. doi:10.1016/j.hal.2017.11.001
- Nascimento, S. M., Purdie, D. A., & Morris, S. 2005. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicon*, 45(5), 633-649. doi:10.1016/j.toxicon.2004.12.023
- Nascimento, S. M., Salgueiro, F., Menezes, M., de Andréa Oliveira, F., Magalhães, V. C. P., De Paula, J. C., & Morris, S. 2016. *Prorocentrum lima* from the South Atlantic: morphological, molecular and toxicological characterization. *Harmful algae*, 57, 39-48. doi:10.1016/j.hal.2016.05.006
- Nayak, B. B., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. 1997. Influence of bacteria on growth and hemolysin production by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Marine Biology*, 130(1), 35-39. doi:10.1007/s002270050222
- Oguchi, K., Fukushi, E., & Tsuda, M. 2008. Iriomoteolide-4a, a new 16-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* species. *Planta Med*, 74(09), PB45.
- Okolodkov, Y. B., & Gárate-Lizárraga, I. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta botánica mexicana*(74), 1-154.
- Orr, R. J. S., Murray, S. A., Stüken, A., Rhodes, L., & Jakobsen, K. S. 2012. When naked became armored: an eight-gene phylogeny reveals monophyletic origin of theca in dinoflagellates. *PloS one*, 7(11), e50004. doi:10.1371/journal.pone.0050004
- Pagliara, P., & Caroppo, C. 2012. Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia*



- cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon*, 60(6), 1203-1214. doi:10.1016/j.toxicon.2012.08.005
- Parsons, M. L., Aligizaki, K., Bottein, M.-Y. D., Fraga, S., Morton, S. L., Penna, A., & Rhodes, L. 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful algae*, 14, 107-129. doi:10.1016/j.hal.2011.10.017
- Parsons, M. L., & Preskitt, L. B. 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the Island of Hawai 'i. *Harmful algae*, 6(5), 658-669. doi:10.1016/j.hal.2007.01.001
- Paul, C., Matusz, M. A., & Pohnert, G. 2013. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. *Metabolomics*, 9(2), 349-359. doi:10.1007/s11306-012-0453-1
- Paul, G. K., Matsumori, N., Konoki, K., Murata, M., & Tachibana, K. 1997. Chemical structures of amphidinols 5 and 6 isolated from marine dinoflagellate *Amphidinium klebsii* and their cholesterol-dependent membrane disruption. *Journal of Marine Biotechnology*, 5(2-3), 0124-0128.
- Paul, G. K., Matsumori, N., Murata, M., & Tachibana, K. 1995. Isolation and chemical structure of amphidinol 2, a potent hemolytic compound from marine dinoflagellate *Amphidinium klebsii*. *Tetrahedron letters*, 36(35), 6279-6282. doi:10.1016/0040-4039(95)01259-K
- Paul, P., Patil, J. S., & Anil, A. C. 2021. Phytoplankton communities in marine intertidal rock-pools: effect of location, geometric shapes and allelopathy. *Journal of Earth System Science*, 130(3), 128. doi:10.1007/s12040-021-01591-5
- Pavaux, A.-S., Berdalet, E., & Lemée, R. 2020. Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions. *Frontiers in Marine Science*, 7(498). doi:10.3389/fmars.2020.00498
- Pawlik, J. R., Amsler, C. D., Ritson-Williams, R., McClintock, J. B., Baker, B. J., & Paul, V. J. 2013. Marine chemical ecology: a science born of scuba. In Lang, M. A., Marinelli, R. L., Roberts, S. J., & Taylor, P. R. (Eds.), *Research and Discoveries:*



- The Revolution of Science through Scuba* (pp. 53-69): Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Peltekis, A. 2020. *The diatom plastid : energetic center and target of allelopathic interactions/Le plaste des diatomées : centre énergétique et cible des interactions allélopathiques*. Sorbonne Université. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03329733> (2020SORUS174)
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M. G., Andreoni, F., Riobó, P., & Vernesi, C. 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of phycology*, 41(1), 212-225. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04011.x
- Pérez-López, H., Durán-Riveroll, L., Gómez-Lizárraga, L. E., & Mendoza-Garfias, M. B. 2020. Simple method for preparing delicate dinoflagellate of the genus *Amphidinium* for Scanning Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 26(S2), 1366-1369. doi:10.1017/S1431927620017857
- Petersen, L.-E., Kellermann, M. Y., & Schupp, P. J. 2020. Secondary metabolites of marine microbes: from natural products chemistry to chemical ecology. In Jungblut, S., Liebich, V., & Bode-Dalby, M. (Eds.), *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future: Proceedings of the 2018 conference for YOUnG MArine RESEARCHer in Oldenburg, Germany* (pp. 159-180). Cham: Springer International Publishing.
- Pezzolesi, L., Guidi, F., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., Fattorusso, E., & Pistocchi, R. 2011, 4-9 September 2011. *Influence of temperature on allelopathic interaction between *Ostreopsis cf. ovata* and *Coolia monotis**. Paper presented at the European journal of phycology, Rhodes, Greece.
- Pezzolesi, L., Guidi, F., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., & Pistocchi, R. 2012, 9 - 10 November 2012. *Growth interaction between *Ostreopsis cf. ovata* and the benthic dinoflagellates *Protoceratium lima* and *Coolia monotis**. Paper presented at the Riunione Annuale Gruppo Algologia, Ischia.
- Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Marić Pfannkuchen, D., Iveša, L., Kružić, P., Ciminiello,



- P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., & Forino, M. 2012. Toxin-producing *Ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. *Environmental science & technology*, 46(10), 5574-5582. doi:10.1021/es300189h
- Pichierri, S., Accoroni, S., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Romagnoli, T., Pistocchi, R., & Totti, C. 2017. Allelopathic effects of diatom filtrates on the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Marine environmental research*, 131, 116-122. doi:10.1016/j.marenvres.2017.09.016
- Poulin, R. X., Baumeister, T. U., Fenizia, S., Pohnert, G., & Vallet, M. 2020. Aquatic chemical ecology—A focus on algae. In Liu, H.-W. B. & Begley, T. P. (Eds.), *Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering* (Third Edition ed., Vol. 3, pp. 244-267): Elsevier.
- Poulin, R. X., Poulson-Ellestad, K. L., Roy, J. S., & Kubanek, J. 2018. Variable allelopathy among phytoplankton reflected in red tide metabolome. *Harmful algae*, 71, 50-56. doi:10.1016/j.hal.2017.12.002
- Poulson-Ellestad, K. L., Jones, C. M., Roy, J., Viant, M. R., Fernández, F. M., Kubanek, J., & Nunn, B. L. 2014. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), 9009-9014. doi:10.1073/pnas.1402130111
- Ramos-Santiago, A. E. 2021. *Taxonomía integrativa y crecimiento de Coolia Meunier (Dinophyceae) en extractos de Dictyota dichotoma (Hudson) J.V. Lamouroux (Phaeophyceae) de la Bahía de La Paz, B.C.S., México*. (Licenciatura Tesis de licenciatura), Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. 2006. *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*: Springer Science & Business Media.
- Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A., & González, L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical reviews in plant sciences*, 18(5), 577-608. doi:10.1080/07352689991309405
- Reynolds, C. S. 2006. *The Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.



- Reynolds, C. S. 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia*, 578(1), 37-45. doi:10.1007/s10750-006-0431-6
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., & Garthwaite, I. 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34(2), 371-383. doi:10.1080/00288330.2000.9516939
- Rhodes, L., Smith, K., Papiol, G. G., Adamson, J., Harwood, T., & Munday, R. 2014. Epiphytic dinoflagellates in sub-tropical New Zealand, in particular the genus *Coolia* Meunier. *Harmful algae*, 34, 36-41. doi:10.1016/j.hal.2014.02.004
- Rhodes, L., & Smith, K. F. 2019. A checklist of the benthic and epiphytic marine dinoflagellates of New Zealand, including Rangitāhua/Kermadec Islands. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 53(2), 258-277. doi:10.1080/00288330.2018.1492425
- Rhodes, L. L., Smith, K. F., MacKenzie, L., & Moisan, C. 2020. Checklist of the planktonic marine dinoflagellates of New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 54(1), 86-101. doi:10.1080/00288330.2019.1626746
- Rhodes, L. L., & Thomas, A. E. 1997. *Coolia monotis* (Dinophyceae): a toxic epiphytic microalgal species found in New Zealand (Note). 31(1). doi:10.1080/00288330.1997.9516751
- Rice, E. L. 1985. Allelopathy — An Overview. In Cooper-Driver, G. A., Swain, T., & Conn, E. E. (Eds.), *Chemically mediated interactions between plants and other organisms* (pp. 81-105). Boston, MA: Springer US.
- Rice, E. L. 1987. Allelopathy: an overview. In Waller, G. R. (Ed.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry* (Vol. 330, pp. 8-22).
- Rizvi, S. J. H., Haque, H., Singh, V. K., & Rizvi, V. 1992. A discipline called allelopathy. In Rizvi, S. J. H. & Rizvi, V. (Eds.), *Allelopathy: Basic and applied aspects* (pp. 1-10). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Rongo, T., & van Woesik, R. 2013. The effects of natural disturbances, reef state, and herbivorous fish densities on ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook



- Islands. *Toxicon*, *64*, 87-95. doi:10.1016/j.toxicon.2012.12.018
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539-542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Round, F. E. 1984. *The ecology of algae* (Press, C. U. Ed.). Cambridge: CUP Archive.
- Saha, M., Berdalet, E., Carotenuto, Y., Fink, P., Harder, T., John, U., Not, F., Pohnert, G., Potin, P., Selander, E., Vyverman, W., Wichard, T., Zupo, V., & Steinke, M. 2019. Using chemical language to shape future marine health. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *17*(9), 530-537. doi:10.1002/fee.2113
- Saldarriaga, J. F., & Taylor, F. J. R. 2017. Dinoflagellata. In Archibald, J. M., Simpson, A. G. B., Slamovits, C. H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D. J., & Corliss, J. O. (Eds.), *Handbook of the Protists* (pp. 625-678). Cham: Springer International Publishing.
- Sampayo, M. d. M. 1985. Encystment and excystment of a Portuguese isolate of *Amphidinium carterae* in culture. *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, New York, NY, 125-130.
- Sarkar, S. K. 2018. *Marine Algal Bloom: Characteristics, Causes and Climate Change Impacts*. Singapore: Springer Nature
- Satake, M., Cornelio, K., Hanashima, S., Malabed, R., Murata, M., Matsumori, N., Zhang, H., Hayashi, F., Mori, S., Kim, J. S., Kim, C.-H., & Lee, J.-S. 2017. Structures of the largest Amphidinol homologues from the dinoflagellate *Amphidinium carterae* and structure–activity relationships. *Journal of natural products*, *80*(11), 2883-2888. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00345
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Fujita, T., & Naoki, H. 1991. Amphidinol, a polyhydroxy-polyene antifúngica agent with an unprecedented structure, from a marine dinoflagellate, *Amphidinium klebsii*. *Journal of the American Chemical Society*, *113*, 9859-9861.
- Schagerl, M., Unterrieder, I., & Angeler, D. G. 2002. Allelopathy among Cyanoprokaryota and other algae originating from Lake Neusiedlersee (Austria). *International Review of Hydrobiology*, *87*(4), 365-374. doi:10.1002/1522-



2632(200207)87:4<365::AID-IROH365>3.0.CO;2-B

- Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae (Peridineae). Monographischer Behandlung. In Kolkwitz, R. (Ed.), *Rabenhorst's Kryptogamen Flora Von Deutschland, Osterreich und der Schweiz: Dinoflagellatae* (Vol. 10, pp. 617). Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
- Schmidt, L. E., & Hansen, P. J. 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Marine ecology progress series*, 216, 67-81. doi:10.3354/meps216067
- Schmidt, R., Ulanova, D., Wick, L. Y., Bode, H. B., & Garbeva, P. 2019. Microbe-driven chemical ecology: past, present and future. *The ISME journal*, 13(11), 2656-2663. doi:10.1038/s41396-019-0469-x
- Scholin, C. A., Herzog, M., Sogin, M., & Anderson, D. M. 1994. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of phycology*, 30(6), 999-1011. doi:10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x
- Seong, K. A., & Jeong, H. J. 2011. Interactions between the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus* and red-tide dinoflagellates. *Ocean Science Journal*, 46(2), 105-115. doi:10.1007/s12601-011-0010-2
- Sepúlveda Villarraga, M. 2017. *Dinoflagelados potencialmente tóxicos asociados a macroalgas en la Bahía de La Paz, BCS*. (Maestría Tesis de Maestría), Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur, México.
- Shah, M. M. R., Samarakoon, K. W., Ko, J., Lakmal, H. C., Lee, J., An, S., & Jeon, Y. 2014. Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African Journal of Biotechnology*, 13(6), 792-805. doi:10.5897/AJB2013.13250
- Shao, J.-H., Wu, X.-Q., & Li, R.-H. 2009. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to nonanoic acid stress. *Environmental Toxicology*, 24(6), 610-617. doi:10.1002/tox.20462
- Shears, N. T., & Ross, P. M. 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate



- reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful algae*, 8(6), 916-925. doi:10.1016/j.hal.2009.05.003
- Shears, N. T., & Ross, P. M. 2010. Toxic cascades: multiple anthropogenic stressors have complex and unanticipated interactive effects on temperate reefs. *Ecology Letters*, 13(9), 1149-1159. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01512.x
- Shilo, M. 1967. Formation and mode of action of algal toxins. *Bacteriological Reviews*, 31(3), 180-193. doi:10.1128/br.31.3.180-193.1967
- Skinner, M. P., Lewis, R. J., & Morton, S. 2013. Ecology of the ciguatera causing dinoflagellates from the Northern Great Barrier Reef: Changes in community distribution and coastal eutrophication. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 210-219. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.003
- Śliwińska-Wilczewska, S., Wiśniewska, K., Konarzewska, Z., Cieszyńska, A., Felpeto, A. B., Lewandowska, A. U., & Latała, A. 2021. The current state of knowledge on taxonomy, modulating factors, ecological roles, and mode of action of phytoplankton allelochemicals. *Science of the Total Environment*, 773, 145681. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145681
- Smayda, T. J. 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42(5), 1137-1153. doi:10.4319/lo.1997.42.5\_part\_2.1137
- Smayda, T. J. 2002. Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks”. *Harmful algae*, 1(1), 95-112. doi:10.1016/S1568-9883(02)00010-0
- Smith, B. C., Persson, A., & Wikfors, G. H. 2009. A particle separator used to concentrate Dinoflagellate cysts from sediment. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7(7), 521-526. doi:10.4319/lom.2009.7.521
- Stahl, A. 2016. Proteomics analysis of the response of the marine bacterium *Marinobacter adhaerens* HP15 to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Aquatic microbial ecology*, 78. doi:10.3354/ame01804
- Steiger, S., Schmitt, T., & Schaefer, H. M. 2011. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1708), 970-979. doi:10.1098/rspb.2010.2285



- Sugg, L. M., & VanDolah, F. M. 1999. No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguatera-associated dinoflagellates. *Journal of phycology*, 35(1), 93-103. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3510093.x
- Suikkanen, S., Fistarol, G. O., & Granéli, E. 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumdigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 308(1), 85-101. doi:10.1016/j.jembe.2004.02.012
- Suikkanen, S., Hakanen, P., Spilling, K., & Kremp, A. 2011. Allelopathic effects of Baltic Sea spring bloom dinoflagellates on co-occurring phytoplankton. *Marine ecology progress series*, 439, 45-55.
- Sun, J., & Liu, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346. doi:10.1093/plankt/fbg096
- Takahashi, Y., Kubota, T., & Kobayashi, J. i. 2007a. Amphidinolactone A, a new 13-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *ChemInform*, 38(39). doi:10.1002/chin.200739187
- Takahashi, Y., Kubota, T., & Kobayashi, J. i. 2007b. Amphidinolactone B, a new 26-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *The Journal of antibiotics*, 60(6), 376-379. doi:10.1038/ja.2007.51
- Tamura, M., Takano, Y., & Horiguchi, T. 2009. Discovery of a novel type of body scale in the marine dinoflagellate, *Amphidinium cupulatisquama* sp. nov. (Dinophyceae). *Phycological Research*, 57(4), 304-312. doi:10.1111/j.1440-1835.2009.00550.x
- Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., & Adachi, M. 2015. Characterization of *Gambierdiscus* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates from Thailand based on morphology and phylogeny. *Phycological Research*, 63(2), 125-133. doi:10.1111/pre.12074
- Taylor, F. 1987. *Ecology of dinoflagellates* (Vol. 21). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J., & Couté, A. 2000. *Coolia areolata* sp. nov.(Dinophyceae), a new sand-dwelling dinoflagellate from the southwestern



- Indian Ocean. *Phycologia*, 39(5), 377-383. doi:10.2216/i0031-8884-39-5-377.1
- Ternon, E., Pavaux, A.-S., Marro, S., Thomas, O. P., & Lemée, R. 2018. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and a co-occurring diatom. *Harmful algae*, 75, 35-44. doi:10.1016/j.hal.2018.04.003
- Tester, P. A., Litaker, R. W., & Berdalet, E. 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful algae*, 91, 101655. doi:10.1016/j.hal.2019.101655
- Thronsen, J. 1979. Special methods-micromanipulators. In Stein, R. J. (Ed.), *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements* (pp. 139-144). London: Cambridge.
- Tillmann, U. 2003. Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate *Prymnesium parvum*. *Aquatic microbial ecology*, 32, 73-84. doi:10.3354/ame032073
- Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., & Cembella, A. 2008. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful algae*, 7(1), 52-64. doi:10.1016/j.hal.2007.05.009
- Tillmann, U., & John, U. 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: an allochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Marine ecology progress series*, 230, 47-58. doi:10.3354/meps230047
- Tillmann, U., John, U., & Cembella, A. 2007. On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 29(6), 527-543. doi:10.1093/plankt/fbm034
- Tindall, D. R., & Morton, S. L. 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In D. A. Anderson, Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms* (Vol. G 41, pp. 293–314). Berlin: Springer-Verlag.
- Tsuda, M., Oguchi, K., Iwamoto, R., Okamoto, Y., Fukushi, E., Kawabata, J., Ozawa, T., & Masuda, A. 2007a. Iriomoteolides-1b and -1c, 20-membered macrolides from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *Journal of natural products*, 70(10), 1661-1663. doi:10.1021/np0702537



- Tsuda, M., Oguchi, K., Iwamoto, R., Okamoto, Y., Kobayashi, J. i., Fukushi, E., Kawabata, J., Ozawa, T., Masuda, A., Kitaya, Y., & Omasa, K. 2007b. Iriomoteolide-1a, a potent cytotoxic 20-membered macrolide from a benthic dinoflagellate *Amphidinium* species. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(12), 4469-4474. doi:10.1021/jo070414b
- Turquet, J., Quad', J.-P., Ten-Hage, L., Dahalani, Y., & Wendling, B. 2001. *Example of a Gambierdiscus toxicus flare-up following the 1998 coral bleaching event in Mayotte Island (Comoros, south-west Indian Ocean)*. Paper presented at the Harmful Algal Blooms 2000, Paris, France.
- Uchida, T., Toda, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, M., Kotani, Y., & Honjo, T. 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 241, 285-299.
- Uchida, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, Y., & Honjo, T. 1995. The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa* sp. kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER*, 118, 301-303. doi:10.3354/meps118301
- Varela, A. T., Neves, R. A. F., Nascimento, S. M., Oliveira, P. J., Pardal, M. A., Rodrigues, E. T., & Moreno, A. J. 2020. Mitochondrial impairment and cytotoxicity effects induced by the marine epibenthic dinoflagellate *Coolia malayensis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 77, 103379. doi:10.1016/j.etap.2020.103379
- Venuleo, M., Raven, J. A., & Giordano, M. 2017. Intraspecific chemical communication in microalgae. *New Phytologist*, 215(2), 516-530. doi:10.1111/nph.14524
- Vila, M., Garcés, E., & Masó, M. 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic microbial ecology*, 26(1), 51-60. doi:10.3354/ame026051
- Volk, R.-B., & Furkert, F. H. 2006. Antialgal, antibacterial and antifúngica activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*, 161(2), 180-186. doi:10.1016/j.micres.2005.08.005
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., & Weinberger, F. 2012. The second



- skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Frontiers in Microbiology*, 3(292). doi:10.3389/fmicb.2012.00292
- Wakeman, K. C., Yamaguchi, A., Roy, M. C., & Jenke-Kodama, H. 2015. Morphology, phylogeny and novel chemical compounds from *Coolia malayensis* (Dinophyceae) from Okinawa, Japan. *Harmful algae*, 44, 8-19. doi:10.1016/j.hal.2015.02.009
- Wang, R., Xue, Q., Wang, J., & Tan, L. 2020. Competitive interactions between two allelopathic algal species: *Heterosigma akashiwo* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biology Research*, 16(1), 32-43. doi:10.1080/17451000.2019.1702213
- Wang, Y., & Tang, X. 2008. Interactions between *Prorocentrum donghaiense* Lu and *Scrippsiella trochoidea* (Saha *et al.*) Loeblich III under laboratory culture. *Harmful algae*, 7(1), 65-75. doi:10.1016/j.hal.2007.05.005
- Wang, Y., Yu, Z., Song, X., & Zhang, S. 2006. Interactions between the bloom-forming dinoflagellates *Prorocentrum donghaiense* and *Alexandrium tamarense* in laboratory cultures. *Journal of Sea Research*, 56(1), 17-26. doi:10.1016/j.seares.2006.04.002
- Watanabe, R., Uchida, H., Suzuki, T., Matsushima, R., Nagae, M., Toyohara, Y., Satake, M., Oshima, Y., Inoue, A., & Yasumoto, T. 2013. Gambieroxide, a novel epoxy polyether compound from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* GTP2 strain. *Tetrahedron*, 69(48), 10299-10303. doi:10.1016/j.tet.2013.10.022
- Weidenhamer, J. D. 2006. Distinguishing allelopathy from resource competition: the role of density. In Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. (Eds.), *Allelopathy: A physiological process with ecological implications* (pp. 85-103). The Netherlands: Springer.
- Willis, R. 1985. The historical bases of the concept of allelopathy. *Journal of the History of Biology*, 18(1), 71-102. doi:10.1007/BF00127958
- Xu, J., & Kiørboe, T. 2018. Toxic dinoflagellates produce true grazer deterrents. *Ecology*, 99(10), 2240-2249. doi:10.1002/ecy.2479
- Xu, W., Tan, L., Guo, X., & Wang, J. 2020. Isolation of anti-algal substances from *Cylindrotheca closterium* and their inhibition activity on bloom-forming



- Prorocentrum donghaiense*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110180. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110180
- Yamasaki, Y., Nagasoe, S., Matsubara, T., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., & Honjo, T. 2007. Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Marine ecology progress series*, 339, 83-92. doi:10.3354/meps339083
- Yamasaki, Y., Zou, Y., Go, J., Shikata, T., Matsuyama, Y., Nagai, K., Shimasaki, Y., Yamaguchi, K., 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(1), 76-83. doi:10.1016/j.seares.2010.07.006
- Yan, M., Leung, P. T., Gu, J., Lam, V. T., Murray, J. S., Harwood, D. T., Wai, T.-C., & Lam, P. K. 2020. Hemolysis associated toxicities of benthic dinoflagellates from Hong Kong waters. *Marine pollution bulletin*, 155, 111114. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111114
- Yang, H., Hu, Z., Xu, N., & Tang, Y. Z. 2019. A comparative study on the allelopathy and toxicity of four strains of *Karlodinium veneficum* with different culturing histories. *Journal of Plankton Research*, 41(1), 17-29. doi:10.1093/plankt/fby047
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., & Adachi, R. 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 43(8), 1021-1026. doi:10.2331/suisan.43.1021
- Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., & Murata, M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin*, 172(1), 128-131. doi:10.2307/1541612
- Yong, H. L., Mustapa, N. I., Lee, L. K., Lim, Z. F., Tan, T. H., Usup, G., Gu, H., Litaker, R. W., Tester, P. A., & Lim, P. T. 2018. Habitat complexity affects benthic harmful dinoflagellate assemblages in the fringing reef of Rawa Island, Malaysia. *Harmful algae*, 78, 56-68. doi:10.1016/j.hal.2018.07.009
- Yunes, J. S. 2019. Cyanobacterial toxins. In Mishra, A. K., Tiwari, D. N., & Rai, A. N. (Eds.), *Cyanobacteria From Basic Science to Applications* (pp. 443-458): Elsevier.
- Zhang, H., Bhattacharya, D., & Lin, S. 2007. A three-gene dinoflagellate phylogeny



- suggests monophyly of Prorocentrales and a basal position for *Amphidinium* and *Heterocapsa*. *Journal of Molecular Evolution*, 65(4), 463-474. doi:10.1007/s00239-007-9038-4
- Zhang, H., Lü, S., Cen, J., Li, Y., Li, Q., & Wu, Z. 2021. Morphology and molecular phylogeny of three species of *Coolia* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(3), 1020-1032. doi:10.1007/s00343-020-9326-z
- Zhang, Y., Wang, J., Tan, L., Cao, J., & Li, H. 2015. Effect of allelopathy on the competition and succession of *Skeletonema costatum* and *Prorocentrum donghaiense*. *Marine Biology Research*, 11(10), 1093-1099. doi:10.1080/17451000.2015.1062519
- Zhu, J., Liu, B., Wang, J., Gao, Y., & Wu, Z. 2010. Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. *Aquatic Toxicology*, 98(2), 196-203. doi:10.1016/j.aquatox.2010.02.011
- Zhu, X., Dao, G., Tao, Y., Zhan, X., & Hu, H. 2021. A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. *Journal of Hazardous Materials*, 401(5), 123403. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123403



Anexo 1. Secuencias de la región LSU de *Amphidinium* utilizadas para el análisis filogenético.

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>
	Amca1506-4	KY070351		CS-259	JQ394808
	Amca1412-1	KY070349	<i>Amphidinium cf. massartii</i>	CCMP 2813	KY697982
	Amca0812-1	KY070355		Amma1506-1	KY070348
	Amca1506-2	KY070350	<i>Amphidinium mootonorum</i>	K-0656	AY455676
	Amca1506-3	KY070352		CAWD 56	AY460592
	Amca0406-1	KY070360	<i>Amphidinium operculatum</i>	K-0663	AY455674
	Amca0406-2	KY070362		CAWD 55	AY460591
<i>Amphidinium carterae</i>	Amca0406-3	KY070359		CAWD 42	AY460590
	CCMP1748	AY460586	<i>Amphidinium paucianulatum</i>	Ampa0508-3	KY070346
	JL 3	AF260380	<i>Amphidinium pseudomassartii</i>	AKLSP01	AY460588
	CS-212	JQ394805	<i>Amphidinium steinii</i>	CS-741	AY455673
	CS-21	JQ394807	<i>Amphidinium theodori</i>	Amth0702-1,	EU046332
	CCMP 2100	KY697981		CMSTAC023	KY697986
<i>Amphidinium cupulatisquana</i>	TM-96	AB477346		Amth1303-1	
	Amfi0508-1,			UoABM-Atherm1	GQ200834
<i>Amphidinium fijiensis</i>	CMSTAC021	EU046330	<i>Amphidinium thermaeum</i>	CS-109	JQ394809
	Amfi0508-2,			Amth1412-2	KY070364
	CMSTAC020	EU046329		Amth0304-1	KY070365
	SI-36–50	AY460587		K-0657	AY455671
<i>Amphidinium gibbosum</i>	CCMP 120	AY455672	<i>Amphidinium trulla</i>	Amto1412-1	KY974334
	Amgi0406-2	KY070357		Amto1412-2	KY697984
	Amgi0406-3	KY070358	<i>Amphidinium tomasii</i>	Amto0812-2	KY697985
<i>Amphidinium herdmanii</i>	MFJ5	AY460595		CAWD 222	KM259619
<i>Amphidinium incoloratum</i>	NA	AY455677		K-0668	DQ114467
<i>Amphidinium magnum</i>	Amma0206-3	KY070347	<i>Karlodinium armiger</i>		



<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>
<i>Amphidinium massartii</i>	Amma0607-1, CMSTAC025	EU046333	<i>Heterocapsa steinii</i>	SSB03H	LC541732
	TM16	AB818952	<i>Heterocapsa minima</i>	CAWD302	LC541733
	Amma1208-1	KY070356			
	CCMP1342	EU165302			
	CCMP27274	EU165278			

Anexo 2. Secuencias de la región LSU de *Coolia* utilizadas para el análisis filogenético.

Las cepas resaltadas en negrita corresponden a las cepas mexicanas identificadas en otros estudios. SN= sin número de acceso.

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>
<i>Coolia monotis</i>	Com.10	KJ781412	<i>Coolia malayensis</i>	CmPL01	AF244942
	Dn23EHU	HQ414219		CmPD20	KR605305
	Dn24EHU	HQ414218		CmLd01	KR605307
	Dn25EHU	HQ414220		CmLd02	KR605308
	Com.10	KJ781412		CmLd04	KR605310
	Dn26EHU	HQ414217		CmLd06	KR605312
	Dn66EHU	KF896842		CmLd11	KR605313
	UoA-Cmon1	EU477760		K-0972	JX896690
	VGO831	AM902744		CAWD98	KJ422853
	RIKZ-4	AM902749		CAWD154	KJ422855
	Com.5	KJ781414		CAWD175	KJ422856
	Dn159EHU	KF896846		L31	KR605318
	VGO782	AM902746		NLD9	KJ422857
	Dn55EHU	KF896851		NLD12	KJ422858
	Dn29EHU	HQ414221		CAWD151	KJ422854
<i>Coolia canariensis</i>	Dn166EHU	KF896837	TE18C	AB908153	
	Dn137EHU	KF896838	Cm0607-1	KP172278	



<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>
	CCJJ1	FR846193		FIU39	EU165293
	VGO786	AM902737		CmPD17	KR605304
	VGO787	AM902738		CmTT01	KR605314
	CMPV-1	JQ638943		LM066	MT295353
<i>Coolia guanchica</i>	TNW	KU514007		LM058	MT295360
	CCMP1744 (Clone1)	AM902741		LM140	MT295365
<i>Coolia tropicalis</i>	K-1156	JX896691		LM085	MT295363
	VGO923	AM902740		LM136	MT295359
	NQAIF90	HQ897276		CAWD77	KJ422852
	Cp1208-1	KP172270	<i>Coolia malayensis</i>	CAWD77	KJ422852
<i>Coolia palmyrensis</i>	LM112	MT295364		<b>S/i 72</b>	SN
	LM076	MT295362		<b>CMBAPAZ1</b>	SN
	LM075	MT295361		VGO614	FM994897
	Cs1303-1	KP172271	<i>Ostreopsis ovata</i>	VGO881	FM994895
<i>Coolia santacroce</i>	LM123	MT295357			
	LM122	MT295356			