



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



**INTERACCIONES BIÓTICAS ENTRE LOS  
DINOFLAGELADOS *Cochlodinium*  
*polykrikoides* Y *Gymnodinium impudicum* Y  
SU EFECTO SOBRE *Gymnodinium catenatum*  
(DINOPHYCEAE) EN CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**MIRIAM GUADALUPE ZUMAYA HIGUERA**

**LA PAZ, B.C.S, JUNIO DEL 2017**



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

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 12:00 horas del día 07 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"INTERACCIONES BIÓTICAS ENTRE LOS DINOFLAGELADOS *Cochlodinium polykrikoides* Y *Gymnodinium impudicum* Y SU EFECTO SOBRE *Gymnodinium catenatum* (DINOPHYCEAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO"

Presentada por el alumno:

ZUMAYA

HIGUERA

MIRIAM GUADALUPE

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro: 

B	1	5	0	2	5	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT  
Directora de Tesis

DR. DAVID JAVIER LÓPEZ CORTÉS  
2º. Director de Tesis

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

DR. IGNACIO LEVVA VALENCIA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





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

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 13 del mes de Junio del año 2017

El (la) que suscribe ING. PESQ. MIRIAM GUADALUPE ZUMAYA HIGUERA Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B150252 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

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

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

y cede los derechos del trabajo titulado:

"INTERACCIONES BIÓTICA ENTRE LOS DINOFLAGELADOS *Cochlodinium polyrikoides* Y

*Gymnodinium impudicum* Y SU EFECTO SOBRE *Gymnodinium catenatum* (DINOPHYCEAE)

EN CONDICIONES DE LABORATORIO

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

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: migua\_al@hotmail.com - cjband@yahoo.com - dlopez04@cibnor.mx

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

ING. PESQ. MIRIAM GUADALUPE ZUMAYA HIGUERA

*Nombre y firma del alumno*

## DEDICATORIA

A mi abuelo (QEPD), por estar en los momentos importantes de mi vida, porque me enseñó que nada es imposible si uno se lo propone, que si no sabes algo tienes imaginación para inventar nuevas cosas, nuevas historias como él siempre lo hacía, te dedico mi trabajo porque solo te fuiste antes de verlo concluido, porque tu presencia se siente siempre, eres el silencio de tu hogar que tanto años compartimos, por todas tus historias que jamás olvidare.

A mi padre, por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser el ejemplo para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Esta tesis es el resultado de lo que has enseñado en la vida, ya que siempre has sido una persona honesta, entregada a tu trabajo, y un gran líder, pero más que todo eso, una gran persona que siempre ha podido salir adelante y ser triunfador.

A mi madre, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por estar siempre conmigo en todo momento. Gracias por la paciencia que has tenido para enseñarme, por el amor que das, por tus cuidados en el tiempo que hemos vivido juntas, por los regaños que merecía y que no entendía.

A todos aquellos que no creyeron en mí, a aquellos que esperaban mi fracaso en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que nunca esperaban que lograra terminar la carrera, a todos aquellos que apostaban a que me rendiría a medio camino, a todos los que supusieron que no lo lograría, a todos ellos les dedico esta tesis.

Es por ello que hoy les dedico este trabajo de tesis. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas siguientes líneas y párrafos que a continuación serán escritas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Gracias al centro interdisciplinario de ciencias marinas-Instituto Politécnico Nacional y a las becas del CONACYT 703507 BEIFI. A los proyectos CONACYT 248468, 178227 y FORDECyT 260040, y a los proyectos institucionales SIP 20151381, 2016118 y 20171082 del Instituto Politécnico Nacional por financiar el trabajo de tesis.

Gracias a la **RedFAN** por el apoyo económico para participar en diferentes cursos, talleres, congresos y en la estancia de investigación en Manzanillo, Colima.

Gracias a todo mi comité de tesis que me apoyo en este camino, me orientaron y me guiaron hasta alcanzar la meta. Muchas gracias Dra. Bárbara González, Dra. Claudia Hernández Guerrero, Dr. Ignacio Leyva, Dr. David López y por brindarme su apoyo y su sabiduría.

Dra. Sonia Quijano por aceptarme y apoyarme en la estancia de investigación en Manzanillo, Colima. Dr. Antonio Almazán por la identificación de una de las especies con la cual se trabajó en este proyecto.

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis; a la **Dra. Christine J. Band Schmidt** por toda su paciencia en estos dos años, por su ayuda y apoyo cuando me tocaba exponer y prestarme sus aceites mágicos, cuando pensaba que moriría en las exposiciones, por su frase: “**no morirás**”. MUCHAS GRACIAS Dra. Por todo fue un placer para mí que me diera la oportunidad de trabajar con usted.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a las chicas FAN (**Dulce y Ernestina**) por todo su apoyo en estos dos años, por las historias, favores, por cuidar de mí y

mis cultivos de las personas envidiosas y por tanto chisme en el laboratorio. Mis compañeras del equipo FAN-CICIMAR. Armando y Ana Christina. Gracias a mi compañero de devastación y sufrimiento **Antonino** mi mejor amigo devastado por aguantarme todos los días de estrés, preocuparte por mi salud, alimentarme a fuerzas cada que el estrés no me dejaba y por todas nuestras aventuras. Y a todos las personar que durante este camino fui conociendo; Rafael, Juan Carlos, Jessica.

Gracias a **Israel Antonio Meza Cordero** por mostrarme que siempre hay que verle el lado positivo a las cosas, por apoyarme incondicionalmente desde el momento que nos conocimos, por siempre sacar mis mejores sonrisas y carcajadas, muchas gracias.

Muchas gracias a mis padres **Julián Zumaya** y **Guadalupe Higuera** por su apoyo en cada momento y que siempre están ahí en cada momento difícil de toda mi vida y lo más importante por aguantarme con mi mal genio antes y después de los días de exposiciones, exámenes y seminarios. A mi hermanito **Julián Zumaya** por alégrame en mis días más pesados.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos y a mí por mi esfuerzo, lagrimas, sudor y desveladas, MUCHAS GRACIAS.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
GLOSARIO .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XII
RESUMEN .....	XX
ABSTRACT .....	XXI
1. INTRODUCCIÓN .....	- 1 -
2. ANTECEDENTES .....	- 3 -
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	- 11 -
4. JUSTIFICACIÓN .....	- 12 -
5. HIPOTESIS .....	- 13 -
6. OBJETIVO GENERAL .....	- 13 -
6.1. Objetivos particulares .....	- 13 -
7. METODOS .....	- 13 -
7.1. Identificación molecular .....	- 13 -
7.1.1. Obtención de biomasa celular .....	- 13 -
7.1.2. Extracción de ADN .....	- 14 -
7.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	- 14 -
7.1.4. Gel de agarosa y electroforesis .....	- 15 -
7.2. Aislamiento, cepas y condiciones de cultivo .....	- 15 -
7.3. Escalamiento y curvas de crecimiento .....	- 17 -
7.4. Cultivos bi-algales (mixtos) de <i>G. catenatum</i> con <i>C. polykrikoides</i> y de <i>G. catenatum</i> con <i>G. impudicum</i> .....	- 18 -
7.4.1. Cultivos con contacto celular .....	- 18 -

7.4.2.	Cultivos sin contacto celular .....	- 18 -
7.4.3.	Filtrados celulares .....	- 19 -
7.5.	Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> ante la presencia de <i>C. polykrikoides</i> y <i>G. impudicum</i> .....	- 19 -
7.6.	Pruebas estadísticas .....	- 19 -
8.	RESULTADOS.....	- 20 -
8.1.	Identificación molecular .....	- 20 -
8.1.1.	Extracción de ADN .....	- 20 -
8.1.2.	Secuenciación y análisis de alineamiento .....	- 20 -
8.2.	Curvas de crecimiento .....	- 23 -
8.3.	Cultivos bi-algales de <i>C. polykrikoides</i> y <i>G. catenatum</i> .....	- 27 -
8.3.1.	Cultivos con contacto celular .....	- 27 -
8.3.1.1.	Proporción 1:1 .....	- 27 -
8.3.1.2.	Proporción 2:1 .....	- 28 -
8.3.1.3.	Proporción 1:2 .....	- 28 -
8.3.1.1.1.	Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 30 -
8.3.1.4.	Cambios morfológicos en <i>G. catenatum</i> .....	- 32 -
8.3.2.	Cultivos sin contacto.....	- 32 -
8.3.2.1.	Proporción 1:1 .....	- 32 -
8.3.2.2.	Proporción 2:1 .....	- 33 -
8.3.2.3.	Proporción 1:2 .....	- 33 -
8.3.2.3.1.	Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 35 -
8.3.2.4.	Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 37 -
8.3.3.	Exposición a filtrado celulares de <i>C. polykrikoides</i> .....	- 38 -
8.3.3.1.	Proporción 1:1 .....	- 38 -



8.3.3.1.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 39 -
8.3.3.2. Proporción 2:1 .....	- 42 -
8.3.3.2.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 43 -
8.3.3.3. Proporción 1:2 .....	- 46 -
8.3.3.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 47 -
8.3.3.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 49 -
8.3.4. <i>Gymnodinium impudicum</i> (GIBACO-1) y <i>G. catenatum</i> .....	- 50 -
8.3.4.1. Cultivos con contacto celular .....	- 50 -
8.3.4.1.1. Proporción 1:1 .....	- 50 -
8.3.4.1.2. Proporción 2:1 .....	- 50 -
8.3.4.1.3. Proporción 1:2 .....	- 50 -
8.3.4.1.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 52 -
8.3.4.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 54 -
8.3.5. Cultivo sin contacto .....	- 55 -
8.3.5.1. Proporción 1:1 .....	- 55 -
8.3.5.2. Proporción 2:1 .....	- 55 -
8.3.5.3. Proporción 1:2 .....	- 55 -
8.3.5.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 57 -
8.3.6. Exposición a filtrados celulares de <i>G. impudicum</i> (GIBACO-1)-	59
-	
8.3.6.1. Proporción 1:1 .....	- 59 -
8.3.6.1.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 61 -
8.3.6.2. Proporción 2:1 .....	- 64 -
8.3.6.2.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 64 -
8.3.6.3. Proporción 1:2 .....	- 67 -

8.3.6.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 69 -
8.3.6.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 71 -
8.3.7. Cultivos bi-algales de <i>G. impudicum</i> (GIBACO-13) y <i>G. catenatum</i> .....	- 72 -
8.3.7.1. Cultivos con contacto celular .....	- 72 -
8.3.7.1.1. Proporción 1:1 .....	- 72 -
8.3.7.1.2. Proporción 2:1 .....	- 72 -
8.3.7.1.3. Proporción 1:2 .....	- 72 -
8.3.7.1.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 75 -
8.3.7.1.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 77 -
8.3.8. Cultivos sin contacto.....	- 77 -
8.3.8.1. Proporción 1:1 .....	- 77 -
8.3.8.2. Proporción 2:1 .....	- 78 -
8.3.8.3. Proporción 1:2 .....	- 78 -
8.3.8.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 80 -
8.3.8.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 82 -
8.3.9. Exposición a filtrados celulares de <i>G. impudicum</i> .....	- 83 -
8.3.9.1. Proporción 1:1 .....	- 83 -
8.3.9.2. Proporción 2:1 .....	- 83 -
8.3.9.3. Proporción 1:2 .....	- 83 -
8.3.9.3.1. Longitud de cadenas de <i>G. catenatum</i> .....	- 85 -
8.3.9.4. Cambios morfológicos de <i>G. catenatum</i> .....	- 87 -
9. DISCUSIÓN.....	- 88 -
9.1. Identificación molecular de las cepas de <i>Cochlodinium polykrikoides</i> y <i>Gymnodinium impudicum</i> .....	- 88 -

9.2. Tasas de crecimiento de cultivos monoespecíficos de los dinoflagelados <i>C. polykrikoides</i> , <i>G. impudicum</i> y <i>G. catenatum</i> .....	- 90 -
9.3. Efecto de <i>C. polykrikoides</i> y <i>G. impudicum</i> en el crecimiento y morfología de <i>G. catenatum</i> .....	- 91 -
10. CONCLUSIONES .....	- 98 -
11. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	- 99 -
12. BIBLIOGRAFÍA.....	- 100 -

## GLOSARIO

**Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA):** por sus siglas en inglés (Poly Unsaturated Fatty Acids) son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos, entre los más importantes están los de cadenas larga (serie  $\omega$  -6 y serie  $\omega$  -3) algunos son esenciales para el metabolismo de ciertas moléculas importantes, por ejemplo el colesterol total.

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

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

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

**Competencia:** Es cuando la presencia simultánea de dos especies limita la cantidad de recursos disponibles para los individuos de ambas especies; uno de ellos puede terminar dominado al otro, al final ambas especies resultan afectados durante la interacción.

**Dinoflagelado:** Propios del fílum *Dinoflagellata* son organismos del fitoplancton principalmente del ambiente marino de carácter cosmopolita, son protistas, y en su mayoría planctónicos, su locomoción en el agua es por la acción de dos flagelos desiguales que les proporciona un movimiento natatorio rotacional. Se caracterizan por ser fotosintéticos y de vida libre, otros son autotróficos y/o simbióticos con protozoos y animales marinos, algunos son depredadores, parásitos, heterotróficos y mixotróficos.

**Electroforesis:** Consiste en la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa.

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

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

**Gel de agarosa:** Se utiliza para separar fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño. Forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual obligamos a pasar los fragmentos de ADN, atrayéndolos a través de una corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ).

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

**Interacciones bióticas:** Forma en la que las especies se relacionan entre dos o más organismos imponiendo presiones selectivas mutuas.

**Lisis celular:** Rompimiento de la membrana celular; provocado por daños estructurales que se desencadenan por estrés fisiológico como por ejemplo: por diferencias isotónicas en el citoplasma.

**Membrana celular:** también denominada membrana plasmática (plasmalema). Estructura laminada formada por fosfolípidos, glicolípidos y proteínas que rodea, limita, da forma y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de la célula.

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

**Nucleótidos:** Biomoléculas portadoras de la información genética; son biopolímeros de elevado peso molecular, formados por otras subunidades estructurales o monómeros.

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

**Reacción en cadena de la polimerasa:** (PCR) por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*. Reacción que se encarga de copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines.

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

**Toxina:** Sustancia venenosa producida por células vivas u organismos, como animales, plantas, bacterias y otros organismos.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Especies de dinoflagelados. a) *G. catenatum*. b) *C. polykrikoides*, c) *G. impudicum*. ..... - 17 -
- Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa-TBE al 1% de ADN total de dinoflagelados. A) *C. polykrikoides*. B) *G. impudicum*. ..... - 20 -
- Figura 3. Árbol filogenético a partir de las secuencias nucleotídicas parciales del gen 28S ADNr, utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia. Se observan cinco grupos principales, representados por las siguientes especies: *Alexandrium tamarense*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium impudicum*, *Cochlodinium fulvescens* y *Gymnodinium catenatum*. ..... - 23 -
- Figura 4. Curva de crecimiento de *C. polykrikoides* en medio GSe, a 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 24 -
- Figura 5. Curva de crecimiento de *G. impudicum* (GIBACO-1) en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar..... - 25 -
- Figura 6. Curva de crecimiento de *G. impudicum* (cepa GIBACO-13) en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 26 -
- Figura 7. Curva de crecimiento de *G. catenatum* en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 27 -
- Figura 8. Cultivos con contacto celular entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1, B) Proporción 2:1 y C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo de *G. catenatum*, línea continua gris: testigo de *C. polykrikoides*, línea punteada negra: *G. catenatum* con contacto celular y línea punteada gris: *C. polykrikoides* con contacto celular. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo. .... - 29 -

Figura 9. Porcentaje de cadenas en *G. catenatum* en contacto celular con *C. polykrikoides*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: cultivo de *G. catenatum* con *C. polykrikoides*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 31 -

Figura 10. Morfología de *G. catenatum* expuesta a células de *C. polykrikoides*. (a y b) células de *G. catenatum* en el tratamiento testigo sin cambios morfológicos; c) célula individual redonda sin flagelos, d) desprendimiento de la membrana celular (48 h) (e y f) lisis celular (72 h)..... - 32 -

Figura 11. Densidades celulares sin contacto entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja: tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *C. polykrikoides*. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 34 -

Figura 12. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *C. polykrikoides*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *C. polykrikoides*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células..... - 36 -

Figura 13. Morfología *G. catenatum* en cultivos sin contacto con *C. polykrikoides* en las tres proporciones (1:1, 2:1 y 1:2). (a) forma típica de la célula individual sin cambios observados en las primeras 24 h. b) cadena de dos células redondeadas mostrando desprendimiento de membrana. c) deformación de la célula, cíngulo y sulcus. d) núcleo prominente, célula redonda. .... - 37 -

Figura 14. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y sus testigos..... - 39 -



Figura 15. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A´) Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B´) Con 20mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 1:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 41 -

Figura 16. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 2:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y sus testigos..... - 43 -

Figura 17. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A´) Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B´) Con 20 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. C´) Con 50 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 2:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 45 -

Figura 18. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar..... - 46 -

Figura 19. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A´) Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B´) Con 20mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. C´) Con 50 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 48 -

Figura 20. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. (a y b) Controles de las células de *G. catenatum* sin cambios morfológicos. c) células en cadenas y célula individual redondeada, sin flagelos mostrando núcleo evidente. d) desprendimiento de la membrana plasmática en 48 h. e) lisis celular..... - 49 -

Figura 21. Cultivos con contacto de *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo *G. catenatum*. Línea continua gris: testigo *G. impudicum* (GIBACO-1). Línea punteada negra: *G. catenatum* en cultivo con contacto celular. Línea punteada gris: *G. impudicum* (GIBACO-1) en cultivo con contacto celular. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 51 -

Figura 22. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *G. impudicum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: cultivo de *G. catenatum* con contacto celular con *G. impudicum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células..... - 53 -

Figura 23. Morfología de *G. catenatum* al estar en contacto con *G. impudicum* (a y c) *G. catenatum* sin cambios morfológicos. c) célula redondeada, sin flagelos. d) muerte celular. e) desprendimiento de la membrana plasmática. f) lisis celular..... - 54 -

Figura 24. Densidades celulares en cultivos de interacción entre *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum* sin contacto celular. A) proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja: tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *C. cf. fulvescens*. Las líneas verticales representan la desviación estándar..... - 56 -

Figura 25. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *G. impudicum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *G. impudicum*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 58 -

Figura 26. Morfología de *G. catenatum* en cultivos sin contacto celular con *G. impudicum*. a) *G. catenatum* sin cambios morfológicos; b) célula con deformación en el cíngulo y sulcus; c) célula redonda, sin flagelos; d) desprendimiento de la membrana plasmática y lisis celular. .... - 59 -

Figura 27. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar.... - 61 -

Figura 28. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A´) Con 10 mL de cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). B´) Con 20mL de cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). C´) Con 50 mL filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). En proporción 1:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum* (GIBACO-1). B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 63 -

Figura 29. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (GIBACO-1) (20 y 50 mL) en la proporción 2:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo. .... - 64 -

Figura 30. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A´) Con 20 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum*. B´) Con 50 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum* en una proporción 2:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 66 -

Figura 31. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe.

Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo. - 68 -

Figura 32. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. A) Con 20 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum*. B) Con 50 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum* en una proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 70 -

Figura 33. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *G. impudicum*. a) *G. catenatum* sin cambios morfológicos. b) células redondeada, sin flagelos; c) célula redondeada con deformación en el cíngulo y sulcus. d) lisis celular. e) cadena de *G. catenatum* de cuatro células sin flagelos y desprendimiento de la membrana plasmática. .... - 71 -

Figura 34. Cultivos con contacto de *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum*. A) proporción 1:1. B) proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo *G. catenatum*. Línea continua gris: testigo *G. impudicum*. Línea punteada negra: *G. catenatum* en cultivo con contacto celular. Línea punteada gris: *G. impudicum* en cultivo con contacto celular. líneas verticales: desviación estándar. .... - 74 -

Figura 35. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* expuesto a *G. impudicum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: Cultivo de *G. catenatum* con contacto celular con *G. impudicum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 76 -

Figura 36. Morfología de *G. catenatum* expuesta a células de *G. impudicum*. a) Control de *G. catenatum* sin cambios morfológicos. b) célula semiesférica con desprendimiento de la membrana plasmática y núcleo prominente. c) lisis células y muerte celular. d) apoptosis. .... - 77 -

Figura 37. Densidades celulares en cultivos de interacción entre *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum* sin contacto celular A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja:

tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *G. impudicum*. Líneas verticales: desviación estándar. .... - 79 -

Figura 38. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *G. impudicum*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *G. impudicum*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 81 -

Figura 39. Morfología de *G. catenatum* sin contacto con *G. impudicum* en las tres proporciones (1:1, 2:1 y 1:2). a) forma típica de una cadena de tres células de *G. catenatum* sin cambios morfológico. b y c) célula esférica no se observa el flagelos mostrando desarreglos en el cíngulo y sulcus. d) cadena de seis células mostrando desprendimiento de la membrana plasmática. .... - 82 -

Figura 40. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (50 mL) en la A) proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar..... - 84 -

Figura 41. Longitud de cadenas (%) de *G. catenatum*. De cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-13) (50 mL). A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum* (GIBACO-13). B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células. .... - 86 -

Figura 42. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *G. impudicum*. a) cadena de cuatro células de *G. catenatum* sin cambios. b) célula esférica. c) lisis celular. d) cadena de dos células redondeadas mostrando núcleo evidente, desarreglos en el cíngulo, sulcus y pérdida del flagelo. e) cadena de seis células mostrando núcleo evidente, deformación de la cadena, desarreglos en el cíngulo, sulcus y lisis celular..... - 87 -

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Claves de acceso a las secuencias de <i>G. impudicum</i> y <i>C. polykrikoides</i> de la región 28s obtenidas de la base de datos NCBI. ....	- 15 -
Tabla 2. Origen de las cepas de dinoflagelados utilizadas en este estudio ....	- 16 -
Tabla 3. Secuencias de nucleótidos registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information) utilizadas en la construcción del árbol filogénico de la región 28S del ADNr. ....	- 21 -

## RESUMEN

Los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) son fenómenos naturales causados por especies de fitoplancton, estos pueden causar daños en la salud humana y en la vida marina. Uno de los aspectos de interés del estudio de estos eventos es el impacto ecológico y las interacciones bióticas entre estos organismos durante los FAN, las cuales son dinámicas y complejas ya que se dan en escalas cortas de espacio y tiempo. Se realizó la identificación molecular de una cepa de *Cochlodinium polykrikoides* y dos cepas de *Gymnodinium impudicum* mediante la amplificación de la región 28S de la LSU del ADNr. Posteriormente se estudiaron las interacciones bióticas como la competencia y alelopatía que promueven la dominancia de algunas especies de fitoplancton cuando coexisten en el ambiente natural. En condiciones de laboratorio se evaluó la competencia y el efecto alelopático de *Cochlodinium polykrikoides* (CPEPAZ-11) y dos cepas de *Gymnodinium impudicum* (GIBACO-1 y GIBACO-13) sobre *Gymnodinium catenatum* (G7). Para ello se realizaron cultivos mixtos con diferentes proporciones del número de células (1:1, 2:1 y 1:2). También se experimentó con células sin contacto celular, separados por una membrana de 10  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente los cultivos donde crecieron *C. polykrikoides* y *G. impudicum* se filtraron con membranas de 5  $\mu\text{m}$  y el sobrenadante se agregó al cultivo de *G. catenatum* para evaluar los efectos de metabolitos extracelulares. En todos los casos se tomaron muestras de *G. catenatum* para observaciones al microscopio y conteos celulares. La alelopatía o competencia entre estas especies en algunos tratamientos inhibió el crecimiento de *G. catenatum* en un 50% y en ocasiones causó una mortalidad del 100% en 48 h. Los filtrados celulares de *C. polykrikoides* también disminuyeron el crecimiento de *G. catenatum*, provocaron cambios morfológicos y en algunos tratamientos hubo mortalidad del 100% en 24 h. En todos los casos los cambios morfológicos fueron: desprendimiento de la membrana, deformación de la célula, núcleo prominente, pérdida de flagelos y lisis celular. Estos resultados sugieren que en el ambiente natural *C. polykrikoides* y *G. impudicum* pueden inhibir el crecimiento de *G. catenatum*.

Palabras clave: *Cochlodinium polykrikoides*, dinoflagelados, interacción biótica, florecimientos algales nocivos, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium impudicum*.

## ABSTRACT

Harmful Algal Blooms (HABs) are natural phenomena caused by phytoplankton species, which can cause damage to human health and marine life. One of the interests in studying these events is the ecological impact and the biotic interactions that occur between these organisms during HABs, which are dynamic and complex and occur in short scales of space and time. Molecular identification of a *Cochlodinium polykrikoides* strain, and two strains of *Gymnodinium impudicum* was done by the amplification of the 28S region of the ADNr LSU. Subsequently we studied biological interactions such as competition and allelopathy that promote the dominance of these phytoplankton species that coexist in the natural environment. The competition and allelopathic effect of *Cochlodinium polykrikoides* (CPEPAZ-11) and two strains of *Gymnodinium impudicum* (GIBACO-1 and GIBACO-13) were tested on *Gymnodinium catenatum* (G7) under laboratory conditions. For this, mixed cultures with different cell number ratios (1:1, 2:1, and 1:2) were performed. Tests were also performed with cells without cell contact, separated by a 10 µm membrane. Additionally cultures of *C. polykrikoides* and *G. impudicum* were filtered with 5 µm membranes and the supernatant was added to *G. catenatum* cultures to evaluate the effects of extracellular metabolites. In all cases samples of *G. catenatum* were taken for microscopic observations and cell counts. The allelopathy or competition between these species in some treatments inhibited the growth of *G. catenatum* by 50% and sometimes caused a 100% mortality in 48 h. Cell filtrates of *C. polykrikoides* also decreased the growth of *G. catenatum* causing morphological changes and in some treatments a 100% mortality in 24 h. In all cases the morphological changes were: membrane detachment, cell deformation, prominent nucleus, loss of flagella and cell lysis. These results suggest that in the natural environment *C. polykrikoides* and *G. impudicum* can inhibit the growth of *G. catenatum*.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los florecimientos algales nocivos (FAN) son eventos naturales causados por diversas especies de fitoplancton: dinoflagelados, diatomeas, silicoflagelados, rafidofíceas y cianobacterias (Legrand *et al.*, 2003; Granéli & Hansen, 2006; Tillmann *et al.*, 2008b; Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2011); así como especies macroscópicas (Lotze *et al.*, 1999) que en condiciones ambientales favorables para su desarrollo se multiplican y se concentran en determinadas localidades, donde pueden causar alteraciones a la vida marina, repercutiendo en algunos casos en la salud humana y la economía del área afectada (Sunda *et al.*, 2006).

Estas proliferaciones generalmente provocan cambios en la coloración del agua de mar dependiendo de la especie que prolifere, la cual por ser generalmente fotosintética posee diversos pigmentos que proporcionan su color cuando la abundancia del organismo es elevada. Esta coloración ocurre en forma de “parches” o “manchas” en la superficie y suele tener pocos centímetros o metros de espesor esto depende del organismo que prolifere, aunque se pueden extender horizontalmente por cientos de kilómetros (Ochoa *et al.*, 2003; Escalera *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008).

Los FAN comúnmente se conocen como "Mareas Rojas", es en la década de los 90 cuando se acuña el término de FAN, que es la traducción al término en inglés Harmful Algae Bloom (HAB) término empleado para dominar el programa internacional de la COI, aprobado por el Panel Intergubernamental sobre Floraciones de Algas Nocivas (IPHAB) en junio de 1992 (Citado por Sar *et al.*, 2002). En las últimas décadas los FAN se han incrementado a nivel mundial en número, intensidad y distribución geográfica (Heisler *et al.*, 2008). Se ha sugerido que el término más apropiado para describir el crecimiento masivo y distribución de una población de organismos fitoplanctónicos marinos, es el de “Proliferación Fitoplanctónica” o “Proliferación de Fitoplancton” (Ochoa *et al.*, 2003). El término FAN, no es un término científico, sino un término operativo que es hoy día

ampliamente aceptado por la comunidad de científicos y por los gestores sanitarios y medioambientales (Sar *et al.*, 2002).

Los FAN ocurren en todo el mundo y son causados por diferentes factores, algunos escasamente conocidos, lo cual hace difícil predecir su ocurrencia o mitigar sus efectos. Los expertos consideran que temperaturas altas, en combinación con poco viento y baja precipitación son la causa inicial de algunos florecimientos. También se ha propuesto que algunos FAN pueden ser causados por el sobre-enriquecimiento de las aguas costeras por escurrimientos ricos en fertilizantes provenientes de zonas agrícolas, aguas de deshecho industrial y/o aguas tratadas de las ciudades, lo que ocasiona cambios en los cocientes de los compuestos nitrogenados y fosforados. Además los florecimientos se pueden formar al reducirse las poblaciones naturales de animales que consumen el plancton debido a productos tóxicos tales como los insecticidas y herbicidas. Los acontecimientos meteorológicos extremos tales como los huracanes, sequías e inundaciones también pueden indirectamente promover la formación de los FAN (Rey, 2008).

Se ha sugerido que los factores que interactúan en el control de los FAN son muy heterogéneos y que existe una estrecha interacción entre los ciclos de vida de las especies involucradas, con el ambiente físico (temperatura y salinidad), químico (nutrientes) y biológico (competencia, alelopatía, depredación y/o pastoreo (Fierrier *et al.*, 2002).

Estos factores tienen efectos determinantes en la duración y recurrencia de los florecimientos (Garcés *et al.*, 2001). La interacción es más complicada en especies que poseen ciclos de vida complejos por sus diferencias morfológicas y fisiológicas. También se ha reconocido que diferentes estadios del ciclo de vida de los dinoflagelados juegan un papel importante en el inicio, duración y término de los FAN (Montresor, 2001).

Uno de los aspectos de interés, en el estudio de especies formadoras de FAN, está enfocado al impacto ecológico que pueden tener en la composición de la comunidad planctónica (Sellner *et al.*, 2003). Se sabe que las interacciones

bióticas que se desarrollan entre especies fitoplanctónicas durante los FAN son dinámicas y complejas, ya que se dan en escalas cortas de espacio y tiempo (Franks, 1997; Donaghay & Osborn, 1997; Zingone & Wyatt, 2005; Labry *et al.*, 2008; Prince *et al.*, 2008), las evidencias de las interacciones interespecíficas demuestra que tienen un papel importante en la estructura de la red alimenticia y en el desarrollo de los FAN (Verity & Smetacek, 1996; Smetacek, 2001; Tillmann, 2004). El verdadero enigma con respecto a la dinámica de los florecimientos algales está relacionada con factores que determinan que especie florecerá y persistirá en un FAN, lo que ocasiona que a menudo estén dominados por una sola especie (Tillmann *et al.*, 2008). Para explicar la aparición y persistencia de un FAN monoespecífico, las estrategias experimentales actuales se centran en las características fisiológicas y ecológicas de cada una de las especies formadoras de FAN (Smayda & Reynolds, 2001, 2003).

Es muy escasa la información sobre las interacciones bióticas entre especies formadoras de FAN en las costas mexicanas, es por ello que nuestro interés fue determinar el efecto de *C. polykrikoides* y *G. impudicum* sobre el crecimiento de *G. catenatum*, ya que las tres especies pueden coexistir en el ambiente.

## **2. ANTECEDENTES**

Baja California Sur es un estado en el noroeste de México que cuenta con aproximadamente 2,705 km de litoral en su parte oriental y occidental, los cuales reciben la influencia de diferentes corrientes marinas, que enriquecen la gran diversidad de microalgas planctónicas. La primera descripción de una marea roja se encuentra en la Biblia; en el Éxodo 7:20 a 7:21 que dice: “Y toda el agua que estaba en el Nilo se convirtió en sangre. Y los peces que estaban en el Nilo murieron, y el Nilo se tornó contaminado, tal que los egipcios no podían beber el agua del Nilo” (Suárez-Isla & Guzmán-Méndez, 2012). El grupo de los dinoflagelados ha sido uno de los más estudiados en esta región, logrando documentarse la presencia de un mayor número de especies. La frecuencia de los

florecimientos algales en la última década ha aumentado particularmente en las aguas de la porción sur de la península de Baja California incluyendo la Bahía de La Paz (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2006a, 2008).

Entre los dinoflagelados tecados recientemente registrados en la Bahía de La Paz se encuentran: *Amphidoma caudata*, *Centrodinium pulchrum*, *Ceratium dens*, *C. petersi*, *C. schroterii*, *Ceratocorys gourretii*, *Citharistes regius*, *Corythodinium constrictum*, *C. diploconus*, *Dinophysis explusa*, *D. miles*, *D. odiosa*, *Heterodinium murrayi*, *Histioneis biremis*, *H. costata*, *H. pieltain* y *Metaphalacroma skiogsbergii*. De los dinoflagelados desnudos se ha encontrado a: *Amphidinium acutissimus*, *A. sphenoides*, *Asterodinium gracile*, *Brachidinium capatitum*, *Cochlodinium fulvescens*, *C. polykrikoides*, *C. helix*, *Gyrodinium dominans*, *G. falcatum*, *G. fissoides*, *G. fusiforme*, *G. spirale*, *G. submarinum*, *Erythrospidinium agile*, *Katodinium glaucum*, *Polykrikos schwartzii*, *P. hartmannii*, *P. kofoidii*, *Spatulodinium peseudeonoclituca*, *Torodinium robustum*, *Warnowia polyphemus*, *W. purpura* y *W. violescens* (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2010).

En esta bahía, los FAN más comunes son causados por el ciliado *Myrionecta rubra* (Lohmann) Jankowski (Ochoa *et al.*, 1997; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2004). Sin embargo, también se han presentado florecimientos de diversas especies de dinoflagelados como *Prorocentrum rhathymun*, *Noctiluca scintillans*, *Gonyaulax polygramma*, *Scrippsiella trochoidea* (Gárate-Lizárraga & Martínez-López, 1997; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2006a) y *Cochlodinium polykrikoides* (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2000, 2004; Núñez-Vázquez *et al.*, 2003). La mayoría de estos eventos han tenido consecuencias inocuas, no obstante, en los últimos años existen varios reportes del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, tanto en la Bahía de La Paz como en otras regiones del Pacífico mexicano (Barraza-Guardado *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008; Hernández-Sandoval *et al.*, 2009; Band-Schmidt *et al.*, 2010).

*Gymnodinium catenatum*, fue recolectado y descrito por primera vez en el Golfo de California en 1939 (Graham, 1943), este dinoflagelado es la única

especie marina desnuda productora de toxinas paralizantes (Hallegraeff, 1993), estas toxinas pueden acumularse en moluscos bivalvos, caracoles, crustáceos y pulpos (Saldate-Castañeda *et al.*, 1991; Núñez-Vázquez *et al.*, 2008), así como en peces planctónicos filtradores (Reis-Costa *et al.*, 2010). *G. catenatum* ha sido asociado con muertes masivas de fauna marina e intoxicaciones y decesos de humanos por consumo de mariscos en el Golfo de California (Mee *et al.*, 1986), en las costas de Oaxaca (Saldate-Castañeda *et al.*, 1991) y Baja California (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2016). En la Bahía de La Paz se han registrado concentraciones de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos por debajo de los límites permisibles de 80 µg STXeq 100 g<sup>-1</sup> especificados por la NOM-129-SSA-1995 (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009). Esta especie puede ser depredada por otras especies de dinoflagelados. Se ha documentado que la rafidofícea *Chattonella marina* var. *marina* tiene un efecto alelopático sobre *G. catenatum* (Fernández-Herrera *et al.*, 2016) y que el dinoflagelado mixotrófico *Takayama helix* de la familia Kareniaceae es un eficiente depredador de *G. catenatum* y que sus toxinas no lo dañan (Jeong *et al.*, 2016).

Otro dinoflagelado desnudo que forma FAN en regiones tropicales, subtropicales y templadas es *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004; Azanza *et al.*, 2008; Kudela & Gobler, 2012; Gobler *et al.*, 2012). Este dinoflagelado a pesar de poseer una gran velocidad de natación es presa de varios dinoflagelados, *T. helix* es capaz de atraparla y alimentarse de ella, *Polykrikos hartmannii* inmoviliza a *C. polykrikoides* utilizando un mecanismo complejo de nematocistos-taeniocistos para posteriormente anclarse y engullir las células y el dinoflagelado mixotrófico *Alexandrium pohangense* también es un eficiente depredador de esta especie (Lee *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2016). En la Bahía de La Paz, se reportó su presencia en varias ocasiones, en el año 2000 con una concentración de 360 a 7,050 cél mL<sup>-1</sup> (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004) y en el 2006 se encontró con una concentración menor, de 58.2 y 65.0 cél mL<sup>-1</sup> (Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008). Nuevamente en el 2012 ocurrió un florecimiento de esta especie con una densidad inicial de ~6,23 x 10<sup>2</sup> cél mL<sup>-1</sup> y en el 2015 se reportó un FAN donde la máxima abundancia de *C.*

*polykrikoides* osciló entre  $\sim 7,05$  y  $8,6 \times 10^3$  cél mL<sup>-1</sup>, disminuyendo la abundancia al finalizar el florecimiento a inicios de noviembre, a  $\sim 5$  cél mL<sup>-1</sup> (López-Cortés *et al.*, 2014). También se han reportado florecimientos de esta especie en la Bahía de Manzanillo con una abundancia de 3,258 cél mL<sup>-1</sup> (Morales-Blake *et al.*, 2001).

*Cochlodinium polykrikoides* se considera como una especie nociva que es citotóxica (Kim *et al.*, 1999b, 2002), neurotóxica y causa hemolisis. La nocividad de esta especie se ha asociado a cadenas largas de ácidos grasos poliinsaturados libres (18:5 n3, 22:6 n3) (Kim *et al.*, 2001; Dorantes-Aranda *et al.*, 2009, 2010), así como a sustancias reactivas de oxígeno (ROS) (Kim *et al.*, 1999b). Los compuestos responsables de su nocividad no han sido completamente confirmados, sin embargo, ésta varía entre cepas y se desconocen sus posibles efectos en el humano (Kudela & Gobler, 2012).

*Cochlodinium fulvescens* recientemente se describió como nueva especie (Iwataki *et al.*, 2007), es un dinoflagelado formador de FAN que se ha reportado en Japón, Sumatra e Indonesia (Curtiss *et al.*, 2008; Iwataki *et al.*, 2008; Kudela & Gobler, 2012; Munir *et al.*, 2012). En México se ha reportado en el sur del Golfo de California (Morquecho-Escamilla & Alonso-Rodríguez, 2008; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a), registrándose por primera vez en Bahía de La Paz, B. C. S. durante un florecimiento en junio 2008 (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a), con densidades máximas de 4 a  $66 \times 10^3$  cél L<sup>-1</sup>. En diciembre del 2012, en enero a abril de 2013 se reportó una mayor abundancia, alcanzando densidades de 27,8 a  $45,8 \times 10^3$  cél L<sup>-1</sup> (Gárate-Lizárraga, 2014). En la Bahía de Mazatlán también existen reportes de esta especie con abundancias de 380 a  $490 \times 10^3$  cél L<sup>-1</sup> (Morquecho-Escamilla & Alonso-Rodríguez, 2008).

*Gymnodinium impudicum* es un dinoflagelado desnudo que se encuentra en el Golfo de California, es considerado como una especie nociva debido a que sus FAN se han asociado a una disminución del oxígeno disuelto y del pH en el ambiente donde proliferan (Sar *et al.*, 2002). Los FAN de *G. impudicum* han sido asociados con la muerte de peces, ya que segrega sustancias mucilaginosas que tornan viscosa el agua de mar y afectan al sistema de filtración/branquial de los

organismos, también puede ocasionar acumulación de espuma en la playa, además, por su elevada biomasa compiten por los nutrientes y disminuyen la penetración de luz, afectando negativamente a los productores primarios bentónicos (Sar *et al.*, 2002). Al morir las células liberan niveles importantes de amonio y abaten el oxígeno en el fondo marino (Sar *et al.*, 2002). En México se han documentado pérdidas asociadas a esta especie en la industria del camarón en Sinaloa (Alonso-Rodríguez & Páez-Osuna, 2003); en peces confinados en jaulas y peces silvestres en B. C. y B. C. S. (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004, 2007; Guluarte-Castro & Bañuelos, 2007; López-Cortés *et al.*, 2005).

Se ha reportado que *Gymnodinium catenatum* puede co-existir en el ambiente con organismos de otros grupos planctónicos, como es el ciliado *Mesodinium rubrum*, los dinoflagelados *C. polykrikoides* y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, la diatomea *Pseudo-nitzschia* sp., y las rafidofíceas *Chattonella marina* y *C. ovata* (Barraza-Guardado *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a, 2009b, 2011; López-Cortés *et al.*, 2011). La coexistencia de *G. catenatum* y *C. polykrikoides* en el ambiente natural fue documentado en la Bahía de Acapulco de 2005 hasta el 2008 en donde se reporta el primer FAN donde la concentración de *C. polykrikoides* fue de 1,264 a 8,228 x10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup> y de 141 a 1,604 x 10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup> de *G. catenatum*. De enero a febrero del 2006 las concentraciones oscilaron entre 980 y 1,600 x 10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup> para *C. polykrikoides* y *G. catenatum* osciló en un intervalo de 4,2 a 10,0 x 10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup>, un año después en diciembre del 2007 *C. polykrikoides* alcanzó una concentración de 532 x 10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup> mientras *G. catenatum* llegó a 1,942 x10<sup>3</sup> cél L<sup>-1</sup> (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, se ha pensado que los cambios temporales y espaciales de la biomasa y la composición de especies en el plancton marino están regulados principalmente por la disponibilidad de los nutrientes y por factores abióticos. Sin embargo, hay una creciente evidencia de que las interacciones interespecíficas en el plancton desempeñan un papel importante en la sucesión poblacional, la

estructura de la red alimentaria y el desarrollo de los FAN (Verity & Smetacek, 1996).

La competencia entre especies fitoplanctónicas puede implicar interacciones indirectas o directas; las indirectas se dan por las diferencias en sus tasas de crecimiento, características del ciclo de vida, densidades celulares, competencia por luz y nutrientes (Prince *et al.*, 2008). Las directas son la depredación selectiva, parasitismo y la liberación de productos químicos tales como péptidos extracelulares, quelantes hidroxamatos, aldehídos poliinsaturados y toxinas que pueden inhibir el crecimiento, la movilidad o causar daño celular en otras especies; a la liberación de metabolitos que afectan el crecimiento de otras especies se conoce como alelopatía (Lampert & Sommer, 1997; Fistarol *et al.*, 2004; Granéli, 2008; Labry *et al.*, 2008).

El concepto de alelopatía fue propuesto por Molisch en 1937 (citado por Rizvi *et al.*, 1992), para describir el efecto negativo en las interacciones entre las especies de plantas incluyendo microorganismos. “La alelopatía es el efecto directo o indirecto, perjudicial o beneficioso de las plantas, protista (microalgas, ciliados), bacterias y virus, que se produce a través de otros compuestos químicos liberados en el ambiente” (Rice, 1984). La liberación de estos aleloquímicos podría explicar los patrones de dominancia y cambios en la estructura de la comunidad que aparentemente no pueden ser explicados por factores ambientales (Strom, 2008).

El efecto alelopático fue observado por primera vez en especies de fitoplancton en 1917 por Harder (citado por Wolfe & Rice, 1979), quienes reportan la auto-inhibición en agua dulce de la cianobacterias *Nostoc punctiforme* en condiciones de laboratorio. La alelopatía es una estrategia competitiva importante en los dinoflagelados de crecimiento lento (Maestrini & Bonin, 1981; Smayda, 1997) y se refiere a cuando los organismos interaccionan entre sí, y una especie libera sustancias químicas que afectan el crecimiento, supervivencia y/o el comportamiento de la otra especie (Whittaker & Feeny, 1971).



Smayda (1997) afirma que la interacción aleloquímica es una estrategia que facilita la formación de FAN y es un factor importante en la competencia del fitoplancton por los recursos e influye en la sucesión de especies (Maestrini & Bonin, 1981; Rengefors & Legrand, 2001; Legrand *et al.*, 2003; Fistarol *et al.*, 2004; Kubanek *et al.*, 2005; Granéli & Hansen, 2006; Yamasaki *et al.*, 2009; Hattenrath-Lehmann & Gobler, 2011).

Varias especies del fitoplancton producen aleloquímicos, que afectan el crecimiento y función de otros microorganismos (Cembella, 2003; Legrand *et al.*, 2003), confiriéndoles una ventaja competitiva al provocar mortalidad o al reducir el crecimiento de otras especies fitoplanctónicas (Kubanek *et al.*, 2005; Tillmann *et al.*, 2008). Algunas especies provocan lisis celular en pocos minutos a sus competidores (Granéli & Hansen, 2006). Los aleloquímicos también pueden actuar como un mecanismo de defensa contra el pastoreo (Tillmann & John, 2002; Tillmann, 2004; Oberhaus *et al.*, 2008).

La actividad alelopática puede incrementar bajo estrés biótico o abiótico (Lovett *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 1995; Reigosa *et al.*, 1999). Por lo tanto, las interacciones alelopáticas entre organismos acuáticos autótrofos son más probables si los organismos provienen de regiones geográficas diferentes (Gross, 2003). Considerando que algunos aleloquímicos son inducidos o producidos por el estrés y otros factores ambientales, se espera una susceptibilidad cambiante de los organismos diana ante las especies alelopáticas activas dentro de un hábitat (Gross, 2003). Entonces la alelopatía puede provocar una disminución en la abundancia celular, cambios morfológicos e inducir a la formación de quistes temporales (Fernández-Herrera *et al.*, 2016).

Por su complejidad, aún es complicado deducir los mecanismos de acción de la alelopatía en el ambiente marino, además de que la diversidad de formas y estructuras de las especies de fitoplancton es mayor, comparado con las plantas terrestres (Cembella, 2003). Adicionalmente, la alelopatía en el océano es complicada no sólo porque se desarrolla en una escala de tiempo corto, sino que además la dilución de los aleloquímicos en el ambiente marino hace que estos

estén presentes en concentraciones nanomolares ( $10^{-9}$ ) o menores (Legrand *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que estos metabolitos pueden tener efectos biológicos sobre diversos organismos marinos, actuando como compuestos ictiotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, hepatotóxicos y con actividad hemolítica (Shilo, 1981; Igarashi *et al.*, 1996).

Los efectos alelopáticos de un alga sobre otras especies de algas se pueden documentar utilizando experimentos mixtos de crecimiento (Granéli & Turner, 2001). Uno de los métodos más utilizados para el estudio de las interacciones bióticas en condiciones de laboratorio, es el cultivo de dos especies en conjunto en condiciones controladas, generalmente con un medio de cultivo enriquecido para asegurar un óptimo crecimiento de ambas especies. Los cultivos mixtos de fitoplancton tóxico permiten la producción continua de aleloquímicos, y por lo tanto la oportunidad de estudiar los efectos tóxicos, simulando las concentraciones celulares de un FAN en el ambiente natural (Granéli & Turner, 2001). El efecto de estos metabolitos se puede evidenciar empleando filtrados de los exudados celulares liberados al medio de cultivo.

Ambas técnicas permiten detectar cambios en el crecimiento y la inhibición de las especies que coexisten y en ocasiones ha permitido elucidar el aleloquímico en cuestión (Windust *et al.*, 1996; Arzul *et al.*, 1999; Van Donk *et al.*, 1999). En aguas del Golfo de California algunas especies productoras de toxinas y otros metabolitos tóxicos proliferan simultáneamente, sin embargo, se desconoce qué factores bióticos determinan su dominancia. Es muy escasa la información sobre las posibles interacciones bióticas entre *C. polykrikoides*, *G. impudicum* y *G. catenatum*, por ende se desconoce si entre ellas existe competencia o alelopatía. Por lo anterior es necesario comprender los mecanismos o estrategias potenciales que ayuden a explicar los roles ecológicos que pueden resultar de estas interacciones ya que la competencia y alelopatía pueden ser claves en la dominancia de las especies y por lo tanto en el desarrollo y decaimiento de los FAN.

Con el propósito de poder comprender los mecanismos o estrategias potenciales que ayuden a explicar los roles ecológicos entre estas especies de dinoflagelados; que puede resultar de estas interacciones, ya que estas interacciones pueden ser claves en la dominancia de las especies y por ende en el desarrollo y decaimiento de los FAN. Este trabajo se buscó determinar las interacciones bióticas existentes entre los dinoflagelados *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum* y sus efectos en el dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *G. catenatum*, en condiciones de laboratorio.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los florecimientos algales nocivos (FAN) son eventos naturales que en las últimas décadas se han incrementado a nivel mundial en número, intensidad y distribución geográfica (Hallegraeff, 1993; Anderson, 1994; Zingone & Oksfeldt, 2000; Smayda, 2002; Heisler *et al.*, 2008). Las costas mexicanas no son la excepción, particularmente en el Pacífico donde ha habido un mayor registro de estos fenómenos (Mee *et al.*, 1986; Cortés-Altamirano, 1987; Cortés-Altamirano & Alonso-Rodríguez, 1997; Cortés-Altamirano *et al.*, 1999; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001, 2008). En la Bahía de La Paz, se ha registrado a *Gymnodinium catenatum* en diversas ocasiones (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004, 2008) y su presencia se ha asociado a toxinas paralizantes en moluscos bivalvos (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009). Se han realizado varios estudios sobre el efecto de diversos factores abióticos sobre el crecimiento y la toxicidad de *G. catenatum*: temperatura, salinidad, proporción N:P (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2014; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012), probándose que bajo condiciones de laboratorio esta especie tolera un amplio rango de condiciones ambientales. Este dinoflagelado puede coexistir en el ambiente con otros organismos planctónicos, como son los ciliados *Myrionecta rubra*, los dinoflagelados *Cochlodinium polykrikoides*, *Noctiluca scintillans*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* sp., y las rafidofíceas *Chattonella marina* y *Chattonella ovata* (Barraza-Guardado *et al.*, 2004, Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a, 2009b,

2011; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2013; López-Cortés *et al.*, 2015), sin embargo existe muy poca información sobre el efecto de las interacciones bióticas sobre esta especie. Es por ello que en este trabajo se investigaron las interacciones bióticas entre *C. polykrikoides*, *G. impudicum* y *G. catenatum*, tres especies que pueden co-existir en la Bahía de La Paz. El comprender los mecanismos o estrategias potenciales que determinen la dominancia de especies formadores de FAN nos permite inferir los roles ecológicos que pueden resultar de estas interacciones ya que la competencia y alelopatía pueden ser efectos claves que promueven la dominancia en las especies.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Los florecimientos algales nocivos (FAN) o mareas rojas son eventos comunes en la Bahía de La Paz (Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008). La mayoría de estos eventos han tenido consecuencias inocuas, sin embargo, en los últimos años se han reportado especies tóxicas y nocivas *Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium catenatum*, *Chattonella* spp., entre otras (Gárate-Lizárraga *et al* 2016). Los FAN pueden afectar la economía de la zona, así como a la salud pública. Estos eventos pueden causar mortalidades masivas de peces, aves, mamíferos, tanto de vida silvestre como en cautiverio, así como intoxicaciones en el hombre por el consumo de moluscos bivalvos con toxinas.

Uno de los aspectos de interés, en el estudio de los FAN, son las interacciones bióticas que se desarrollan entre especies fitoplanctónicas para comprender el papel que desempeñan en la regulación de los FAN (Franks, 1997; Donaghay & Osborn, 1997; Zingone & Wyatt, 2005; Labry *et al.*, 2008; Prince *et al.*, 2008). Es necesario conocer las diferentes interacciones bióticas que existen entre *G. catenatum* y otras especies planctónicas para comprender los diversos factores que intervienen en la regulación de los FAN de esta especie.

## **5. HIPOTESIS**

Las interacciones bióticas como la competencia y alelopatía, entre otras, promueven la dominancia de algunas especies de fitoplancton cuando coexisten en el ambiente natural. Bajo condiciones de laboratorio, se espera evaluar un efecto alelopático de *C. polykrikoides* y *G. impudicum*; ya sea mediante una disminución de la densidad celular o cambios en la morfología de *G. catenatum*.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar las interacciones bióticas existentes entre los dinoflagelados *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum* con el dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum* bajo condiciones de laboratorio.

### **6.1. Objetivos particulares**

Realizar la identificación molecular de las cepas de *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum*.

Determinar la tasa de crecimiento en cultivos monoespecíficos de las cepas de dinoflagelados.

Evaluar los cambios en el crecimiento y la morfología de *G. catenatum* en presencia de células y filtrados de *C. polykrikoides* y *G. impudicum*.

## **7. METODOS**

### **7.1. Identificación molecular**

#### **7.1.1. Obtención de biomasa celular**

Las cepas de *C. polykrikoides*, *G. impudicum* y *G. catenatum* se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial y fueron concentradas con una centrifuga

marca LW Scientific E8 a 3,500 rpm por 15 min en tubos de plástico de polipropileno (PP) de 15 mL, obteniendo una pastilla celular la cual se mantuvo a una temperatura de -18°C hasta la extracción de ADN.

### **7.1.2. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de las diferentes cepas de *Cochlodinium* sp. y *Gymnodinium* sp. A cada pastilla celular se le añadió 200 µL CTAB buffer en tubos eppendorf de 1.5 mL manteniéndolos a 60°C, agitándolo con un vortex cada 10 min durante una hora. A cada tubo se le agregó 800 µL de CTAB buffer y se incubó a 60°C por 1 hora. Posteriormente se agregó 800 µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo agregándole 400 µm de isopropanol frío y 40 µm de acetato de amonio. Nuevamente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 20 min, se decantó el sobrenadante, se adicionó 500 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. Después de centrifugar decantó el sobrenadante líquido sin alterar el pellet y se le añadió 50 µL de TE. Posteriormente se agregaron 0.5 µL de ARNasa. Se incubo a temperatura ambiente, se verifico la integridad del ADN y la eliminación del ARN degradado en un gel de agarosa al 105% en una electroforesis con buffer TBE 1X y se almacenaron en el congelador a una temperatura de -18°C (Baker *et al.*, 2008; Doyle & Doyle, 1990).

### **7.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se preparó una mezcla de Buffer Gotaq (Baker *et al.*, 2008; Doyle & Doyle, 1990) con diferentes reactivos la cual se elaboró con los primer F ACCCGCTGAATTTAAGCATA, primer R TGGTCCGTGTTTCAAGAGACT (Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006); (nucleótidos); taq (polimerasa); agua libre de nucleasas (libre de contaminantes) y el templado (ADN conocido) para llevar a cabo la reacción en

cadena de la polimerasa de la región 28S de la LSU del ADNr. La muestra se amplificó en un termociclador (TECHNE) Prime bajo los siguientes ciclos: 94 min/ 4 seg, 94 min/35 seg, 51 min/ 1:10 seg, 72 min/ 1:10 seg y 72 min/ 10:00 seg. Los resultados se compararon con secuencias obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabla 1).

Tabla 1. Claves de acceso a las secuencias de *G. impudicum* y *C. polykrikoides* de la región 28s obtenidas de la base de datos NCBI.

<b>Especie</b>	<b>Clave</b>	<b>Clave (NCBI)</b>	<b>Zona geográfica</b>
<i>G. impudicum</i>	GIBACO-13	DQ286734.1	Hong Kong
		KJ508393.1	Francia
		DQ785884.2	Corea
		DQ779993.1	Corea
		DQ779992.1	Corea
<i>C. polykrikoides</i>	CPEPAZ-11	JQ616826.1	B. C. S.
		JX967271.1	China
		AB295050.1	Japón
		EF506625.1	Estados Unidos
		AB295048.1	Japón
		AB295049.1	Japón
		EF506627.1	México

#### **7.1.4. Gel de agarosa y electroforesis**

Para analizar los fragmentos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La agarosa se disolvió en 75 mL de 1X TBE y se dejó enfriar. Se agregaron 4 µL de la muestra amplificada y 1 µL de GelRed. La electroforesis se realizó a 70V durante 40 min, utilizando una fuente de poder (BIORAD PowerPac Basic). El gel fue digitalizado en un fotodocumentador (BIORAD PowerPac Basic).

#### **7.2. Aislamiento, cepas y condiciones de cultivo**

Se utilizaron las cepas de *Cochlodinium polykrikoides* (CPEPAZ-11), *G. impudicum* (GIBACO-1 y GIBACO-13) y una cepa de *G. catenatum* (G7) aisladas

por el método de micropipeta (Stein, 1973). *Cochlodinium polykrikoides* fue aislada de la Ensenada de La Paz, las dos cepas de *G. impudicum* de Bahía de Concepción, B. C. S. y la cepa de *G. catenatum* de la Bahía de Manzanillo, Colima (Tabla 2 y Fig. 1).

Todas las cepas se mantuvieron por triplicado en medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001), modificado con la adición de extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015) en tubos de vidrio de 50 mL de capacidad con 20 mL de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron: salinidad de 34 ups, temperatura 24°C ± 1°C, con iluminación continua de luz blanca fría de 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un ciclo de luz: oscuridad 12h: 12h. El desdoblamiento de los cultivos se realizó cada 15 días.

Tabla 2. Origen de las cepas de dinoflagelados utilizadas en este estudio.

<b>Cepa</b>	<b>Clave</b>	<b>Lugar y fecha de aislamiento</b>	<b>Responsable de aislamiento</b>
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CPEPAZ-11	Ensenada de La Paz, B.C.S., octubre, 2010	C. Band-Schmidt
<i>Gymnodinium impudicum</i>	GIBACO-1	Bahía Concepción, B.C.S., febrero, 2015	M. Zumaya-Higuera
	GIBACO-13		
<i>Gymnodinium catenatum</i>	G7	Bahía de Manzanillo, Col., mayo, 2010	S. Quijano-Scheggia



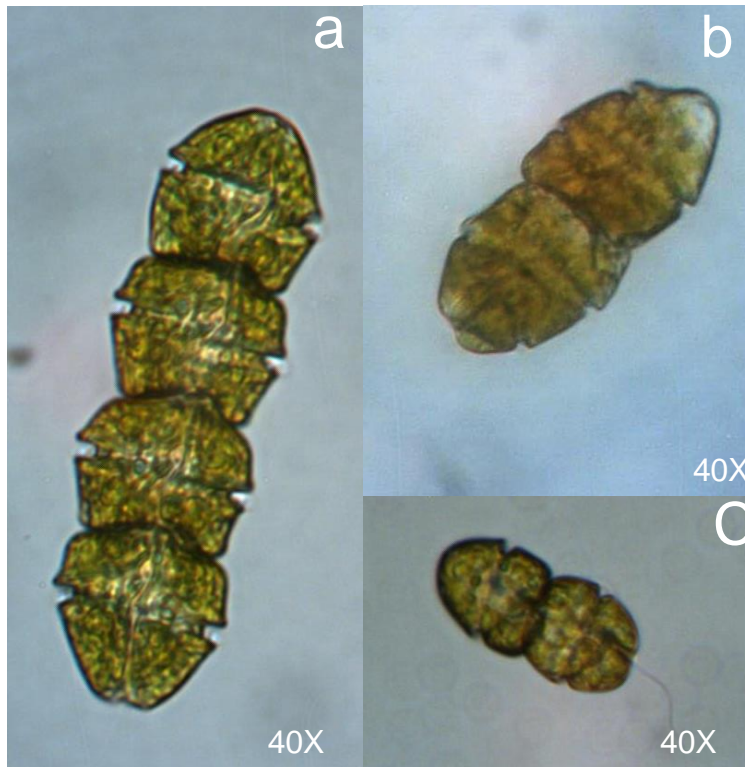


Figura 1. Microfotografías de las especies de dinoflagelados. a) *G. catenatum*. b) *C. polykrikoides*, c) *G. impudicum*. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### 7.3. Escalamiento y curvas de crecimiento

Se realizaron escalamientos progresivos de todas las cepas; *C. polykrikoides*, *G. impudicum* y *G. catenatum*, de 20 mL hasta 150 mL, desdoblado los cultivos en la fase exponencial tardía con un volumen del 5%. Se realizaron conteos cada dos días por triplicado en una cámara Sedgwick-Rafter con capacidad de 1.0 mL y con un microscopio invertido (Zeiss). Se registró el número de células y se calcularon según Guillard (1979) las tasas de crecimiento en la fase exponencial, con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(N - N_0)}{t - t_0}$$

Donde  $N$  y  $N_0$  representan el número de células por mL final e inicial respectivamente,  $t$  y  $t_0$  representan el tiempo final e inicial,  $\mu$  es el resultado expresado en número de divisiones por día.

#### **7.4. Cultivos bi-algales (mixtos) de *G. catenatum* con *C. polykrikoides* y de *G. catenatum* con *G. impudicum***

##### **7.4.1. Cultivos con contacto celular**

A partir de cultivos monoespecíficos de cada una de las cepas se realizaron cultivos mixtos con las siguientes combinaciones: *C. polykrikoides*/*G. catenatum*, *G. impudicum* (GIBACO-1)/*G. catenatum* y *G. impudicum* (GIBACO-13)/*G. catenatum*. Los cultivos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de medio GSe y una densidad inicial de 200 cél mL<sup>-1</sup> de cada cepa con las siguientes proporciones: 200:200 cél mL<sup>-1</sup> para 1:1, 400:200 cél mL<sup>-1</sup> para 2:1 y 200:400 cél mL<sup>-1</sup> para la proporción 1:2. Para determinar cambios en la densidad celular se tomaron 2 mL de la muestra cada 24 h, además se cuantifico la longitud de cadenas y se documentaron los cambios morfológicos. Los conteos se realizaron en una cámara de Sedgwick-Rafter de 1 mL y un microscopio óptico compuesto (LABOMED CXRII). En todos los casos se realizaron cultivos monoalgales como tratamiento testigo.

##### **7.4.2. Cultivos sin contacto celular**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se colocó un tubo de plástico de polipropileno (PP) de 15 mL al cual se le retiró la base inferior y en su lugar se colocó una membrana de nylon de 10 µm (NY10 Millipore). En el matraz se inocularon 150 mL de un cultivo de *G. catenatum* con una densidad celular de 200 cél mL<sup>-1</sup> y dentro del tubo de polipropileno se inocularon por separado 15 mL de: *Cochlodinium polykrikoides* o de las dos cepas de *G. impudicum*, utilizando las proporciones celulares de 1:1, 2:1 y 1:2. Los tratamientos testigos se iniciaron con las mismas densidades y proporciones celulares de cada especie por separado, todos se realizaron por triplicado. Cada 24 h se tomó una alícuota de 2 mL para realizar observaciones y conteos celulares.

### **7.4.3. Filtrados celulares**

Para determinar si existía un efecto negativo de las cepas de *Cochlodinium polykrikoides* y *G. impudicum* sobre *G. catenatum*, se cultivaron las diferentes especies hasta la fase exponencial tardía. En esta fase las células se retiraron del medio de cultivo concentrándolas en filtros de fibra de vidrio de 0.7 µm GF/F Whatman International Ltd., utilizando una bomba de vacío manual. El sobrenadante de los cultivos filtrados se agregó en diferentes volúmenes (10, 20 y 50 mL) en 150 mL de *G. catenatum* en matraces de 250 mL. Se utilizaron dos tratamientos testigo; para el primer tratamiento testigo se utilizaron los monocultivos de *G. catenatum* y se les añadió el mismo volumen (10, 20 y 50 mL) de sus propios filtrados y como segundo tratamiento testigo se le agregó medio GSe a *G. catenatum* en los volúmenes correspondientes (10, 20 y 50 mL). De todos los cultivos se tomó una alícuota de 2 mL cada 24 h, para conteos celulares y observaciones morfológicas.

### **7.5. Cambios morfológicos de *G. catenatum* ante la presencia de *C. polykrikoides* y *G. impudicum***

En todos los experimentos se registró la longitud de las cadenas, lisis celular, formación de quistes temporales, pérdida de movilidad o cualquier otra deformación, comparando los resultados con los tratamientos testigos de *G. catenatum*. Así mismo se tomaron microfotografías con una cámara (ScopePhoto 3.0) a diferentes aumentos en un microscopio óptico (Zeiss Axioscop).

### **7.6. Pruebas estadísticas**

Se realizaron las pruebas de Normalidad, la prueba de Tukey y la prueba de Kruskal-Walis en Matlab para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos de los cultivos (concentraciones, exposición directa o indirecta, cultivos vivos o

mueritos), y/o la duración de la exposición hacia las cepas *C. polykrikoides* y *G. impudicum*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Identificación molecular

#### 8.1.1. Extracción de ADN

De las tres especies consideradas en este estudio, se obtuvo ADN de buena calidad al realizar una modificación a las metodologías, desarrollados por Doyle & Doyle (1990) y Baker *et al.* (2008). Se redujo la pérdida del ADN por manejo y dilución, lo que repercutió directamente en la mejora de la eficiencia de amplificación (Fig. 2).

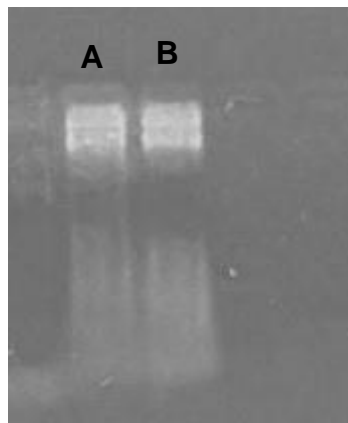


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa-TBE al 1% de ADN total de dinoflagelados. A) *C. polykrikoides*. B) *G. impudicum*.

#### 8.1.2. Secuenciación y análisis de alineamiento

Las secuencias de nucleótidos de la región 28S del LSU del ADNr obtenidas a partir de los productos de PCR, fueron comparadas con la base de datos más redundante mediante el algoritmo BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)), para excluir o confirmar la identificación de la especie. Después de un análisis preliminar

(realizado para confirmar la identidad de los genes blanco), el análisis de alineamiento completo se realizó sólo con aquellas secuencias que presentaron alta similitud con los respectivos genes homólogos registrados en el GenBank (tabla 3). Con el análisis de alineamiento se confirmó la identificación de las tres cepas aisladas. Las dos cepas aisladas de Bahía Concepción se identificaron como *Gymnodinium impudicum* y la cepa aislada de la Ensenada de La Paz se identificó como *C. polykrikoides*, observándose el 100% de identidad con las secuencias de ambas especies registradas en el GenBank.

Tabla 3. Secuencias de nucleótidos registradas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information) utilizadas en la construcción del árbol filogénico de la región 28S del ADNr.

<b>Cepa</b>	<b>No. De acceso</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Fecha</b>	<b>Zona geográfica</b>
<i>G. impudicum</i>	DQ286734.1	1013	07-12-2005	Hong Kong
	DQ779993.1	5807	01-7-2007	Corea
	DQ779992.1	6054	01-7-2007	Corea
<i>C. fulvescens</i>	AB295051.1	1658	05-05-2014	Japón
	KP790180.1	635	20-04-2015	España
<i>G. catenatum</i>	JQ616844.1	1077	08-11-2013	México
	JQ616841.1	1077	08-11-2013	México
<i>C. polykrikoides</i>	JQ616826.1	3619	08-11-2013	México
	JX967271.1	3640	22-01-2014	Estados Unidos
	AB295050.1	2448	05-03-2014	Japón
	EF506625.1	968	23-10-2009	Estados Unidos
	AB295048.1	2448	05-03-2014	Japón

	AB295049.1	1975	05-03-2014	Japón
	EF506627.1	963	23-10-2009	México
<i>A. tamarense</i>	JX524268.1	651	20-02-2015	China

El árbol filogenético donde se utilizó la secuencia JX524268.1 de *Alexabndrium tamarense* como grupo externo mostró la formación de dos clados principales, el primero con las secuencias de *C. polykrikoides* incluyendo a la cepa CPEPAZ-11 con un 100% de similitud, un segundo clado con secuencias de *G. impudicum* que se separó en dos subclados, siendo uno de estos donde se agruparon las secuencias de las cepas GIBACO-1 y GIBACO-13 con la secuencia DQ286734.1 de una cepa de Hong Kong de esta misma especie. Tanto *C. fulvescens*, como *G. catenatum* formaron dos clados bien definidos (Fig. 3).

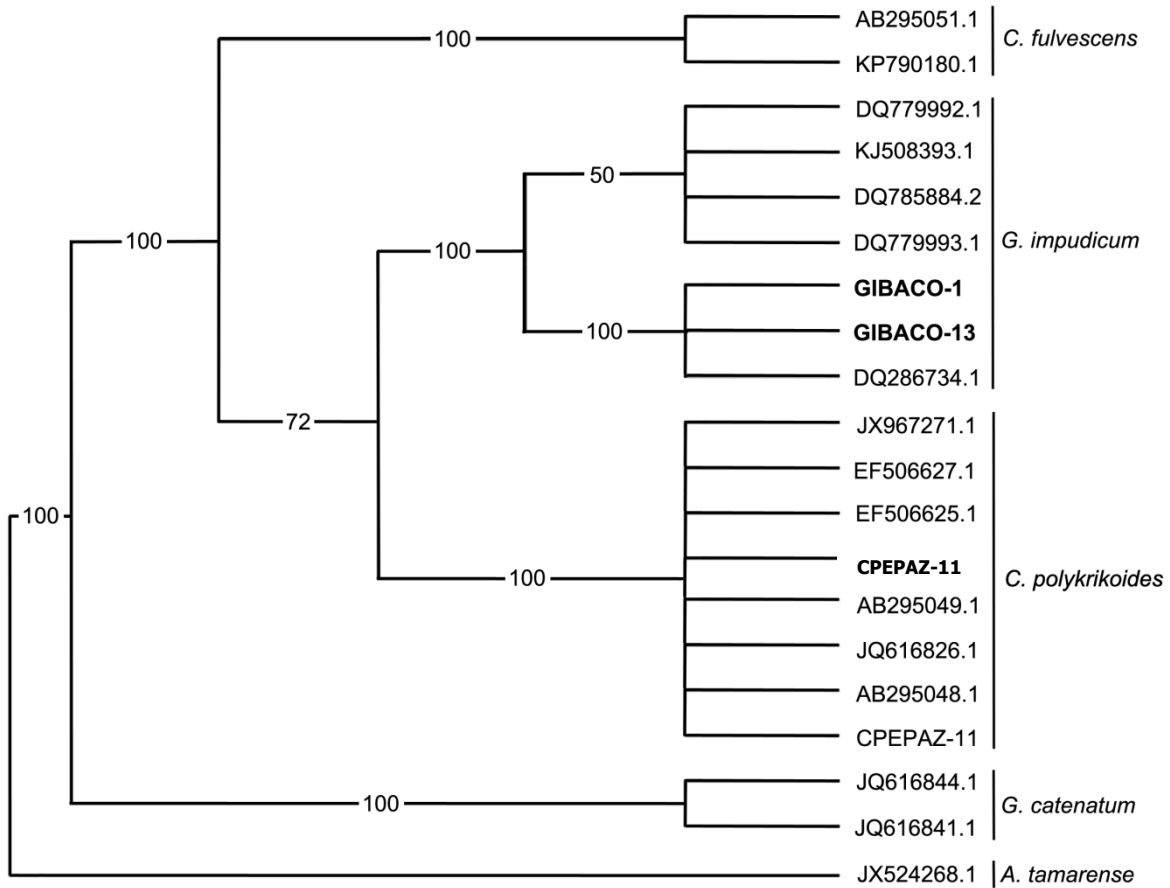


Figura 3. Árbol filogenético de especies de dinoflagelados a partir de las secuencias nucleotídicas parciales del gen 28S del LSU ADNr, utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia.

## 8.2. Curvas de crecimiento

El cultivo de *C. polykrikoides* tuvo una fase de adaptación de 4 días; la fase de crecimiento exponencial inició el día 6 y duró hasta el día 22 del cultivo, alcanzando una densidad máxima promedio de  $7,158 \pm 510 \text{ cél mL}^{-1}$  con una tasa de crecimiento de  $0.11 \pm 0.003 \text{ div} \cdot \text{día}^{-1}$  (Fig. 4). Posterior al día 22 inicia el declive de la curva de crecimiento o fase de muerte.

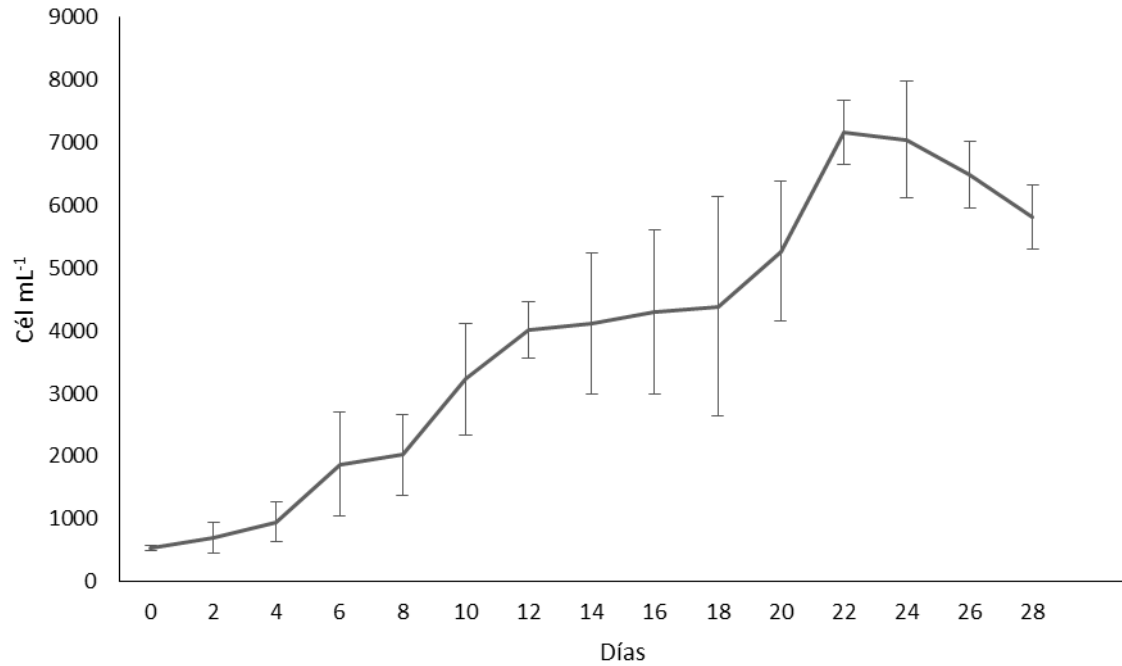


Figura 4. Curva de crecimiento de *C. polykrikoides* en medio GSe, a 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar.

*Gymnodinium impudicum* (cepa GIBACO-1) mostró una fase de adaptación de 3 días, la fase de crecimiento fase exponencial inició el día 4 y duró hasta el día 14, con una biomasa máxima promedio de  $12,867 \pm 359 \text{ cél mL}^{-1}$  y una tasa de crecimiento de  $0.12 \pm 0.03 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$  (Fig. 5). En el día 20 inició el declive de la curva de crecimiento o fase de muerte.



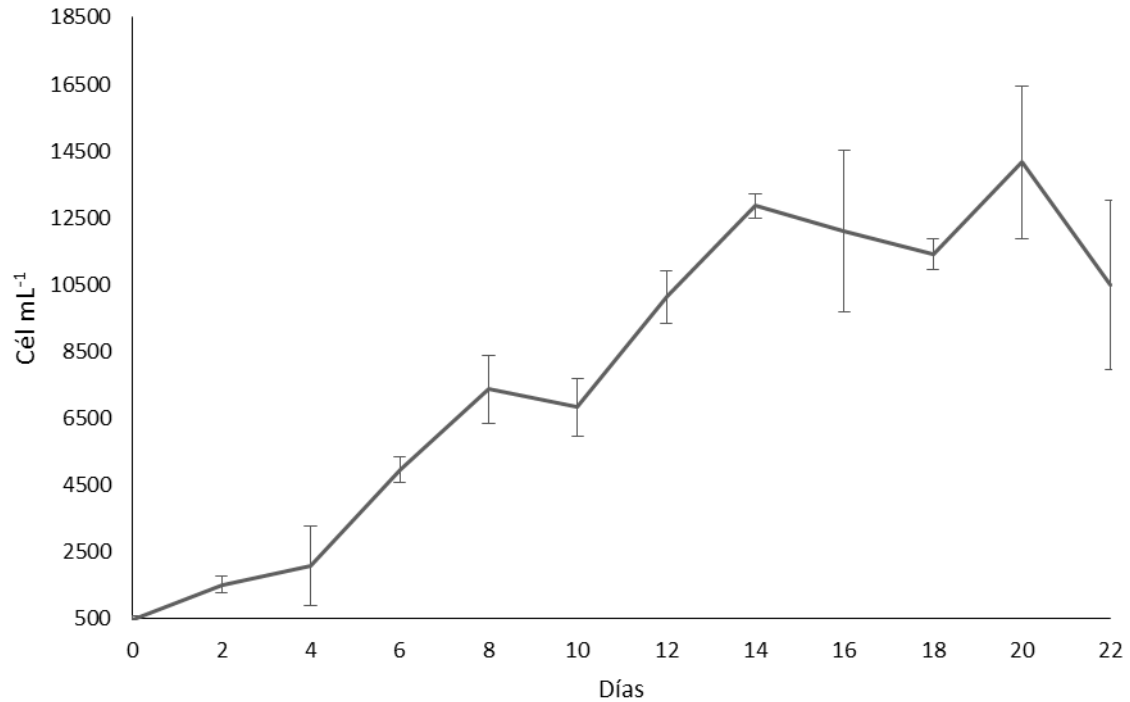


Figura 5. Curva de crecimiento de *G. impudicum* (GIBACO-1) en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar.

*Gymnodinium impudicum* (cepa GIBACO-13) tuvo una fase de adaptación de 2 días, la fase de crecimiento exponencial inició el día 4 y se mantuvo hasta el día 14 alcanzando una biomasa máxima promedio de  $12,263 \pm 1,179 \text{ cél mL}^{-1}$  con una tasa de crecimiento de  $0.13 \pm 0.02 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$  (Fig. 6). En el día 18 inició la fase de muerte.

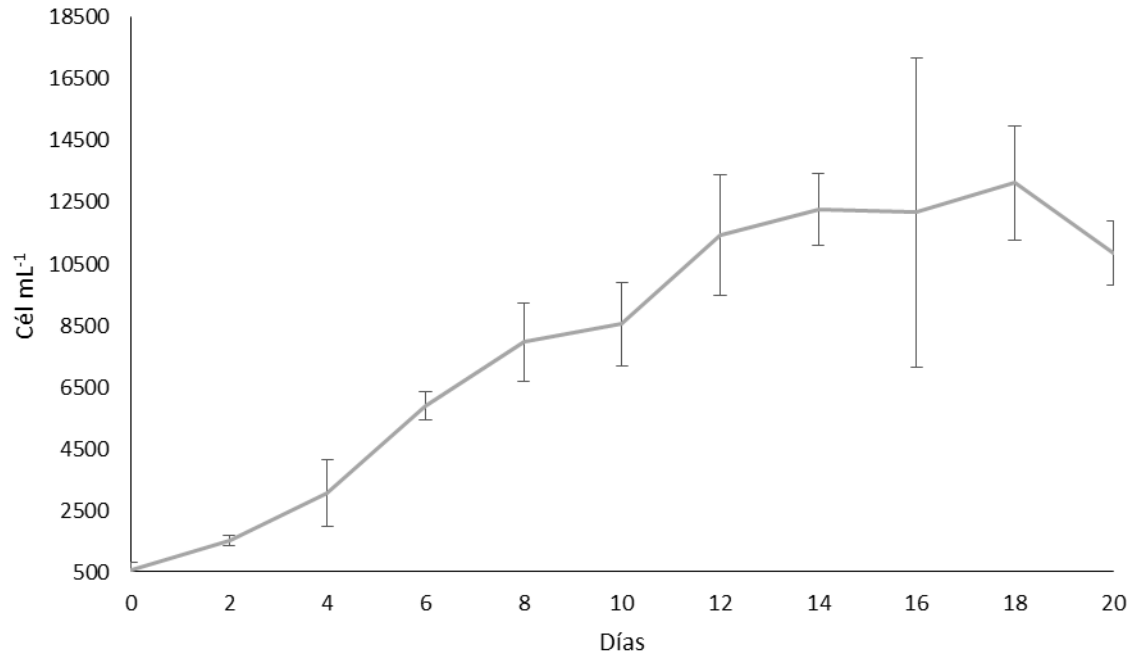


Figura 6. Curva de crecimiento de *G. impudicum* (cepa GIBACO-13) en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar.

*Gymnodinium catenatum* no mostró una fase de adaptación y la fase de crecimiento exponencial se mantuvo hasta el día 10, con una densidad promedio de  $5,717 \pm 1,233 \text{ cél mL}^{-1}$  y una tasa de crecimiento de  $0.20 \pm 0.03 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$  (Fig. 7). Esta especie tampoco tuvo una fase estacionaria, por ende a partir del día 10 inició su fase de muerte.

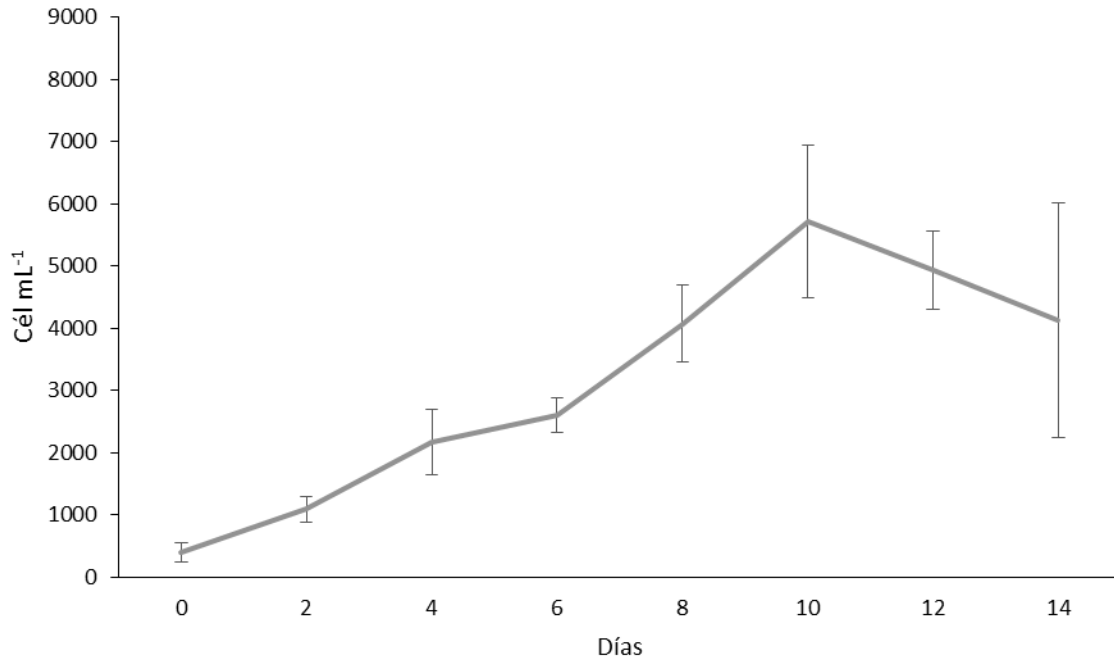


Figura 7. Curva de crecimiento de *G. catenatum* en medio GSe, 34 ups, 24°C, 12:12 oscuridad/luz 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pH 8. Líneas verticales: desviación estándar.

### 8.3. Cultivos bi-algales de *C. polykrikoides* y *G. catenatum*

#### 8.3.1. Cultivos con contacto celular

##### 8.3.1.1. Proporción 1:1

En los cultivos con contacto celular entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum* en la proporción 1:1 (200:200  $\text{cél mL}^{-1}$ ) a las 24 h, la densidad de *G. catenatum* aumentó ligeramente ( $297 \pm 34 \text{ cél mL}^{-1}$ ) y la densidad de *C. polykrikoides* decreció a  $179 \pm 26 \text{ cél mL}^{-1}$ . A partir del segundo día la densidad de *G. catenatum* disminuyó a  $43 \pm 26 \text{ cél mL}^{-1}$ , mostrando diferencias significativas respecto al tratamiento testigo ( $P < 0.05$ ), mientras que *C. polykrikoides* aumentó hasta  $228 \pm 57 \text{ cél mL}^{-1}$ . Los testigos monoalgales de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días alcanzando *G. catenatum* una biomasa de  $2,383 \pm 402 \text{ cél mL}^{-1}$  y *C. polykrikoides* de  $1,406 \pm 573 \text{ cél mL}^{-1}$  (Fig. 8A).

### 8.3.1.2. Proporción 2:1

El tratamiento con proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>) de *C. polykrikoides* y *G. catenatum*) solo duró dos días ya que hubo una mortalidad de más del 90% de *G. catenatum* en el segundo día. A las 24 h la abundancia de ambas especies decreció, y en el segundo día *C. polykrikoides* tuvo una densidad promedio de 154 ± 66 cél mL<sup>-1</sup> y *G. catenatum* de 9 ± 2 cél mL<sup>-1</sup>. Ambas especies mostraron diferencias significativas (P<0.05) respecto a su tratamiento testigo. Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados incrementaron su abundancia alcanzando *G. catenatum* al segundo día 2,383 ± 402 cél mL<sup>-1</sup> y *C. polykrikoides* 1,406 ± 573 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 8B).

### 8.3.1.3. Proporción 1:2

En los cultivos con contacto celular en la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>), *C. polykrikoides* creció hasta el 5° día, alcanzando una densidad promedio de 680 ± 10 cél mL<sup>-1</sup>, mientras que *G. catenatum* decreció continuamente hasta tener 58 ± 19 cél mL<sup>-1</sup>, mostrando diferencias significativas respecto a su tratamiento testigo (P<0.05). En contraste los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados tuvieron un crecimiento mayor, alcanzando en el último día del tratamiento *G. catenatum* una abundancia de 2,383 ± 402 cél mL<sup>-1</sup> y *C. polykrikoides* de 1,406 ± 573 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 8C).

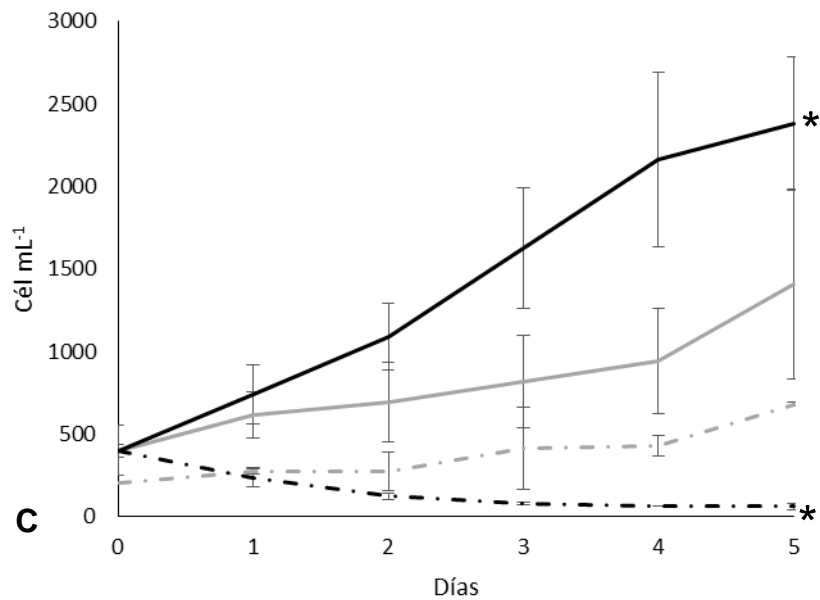
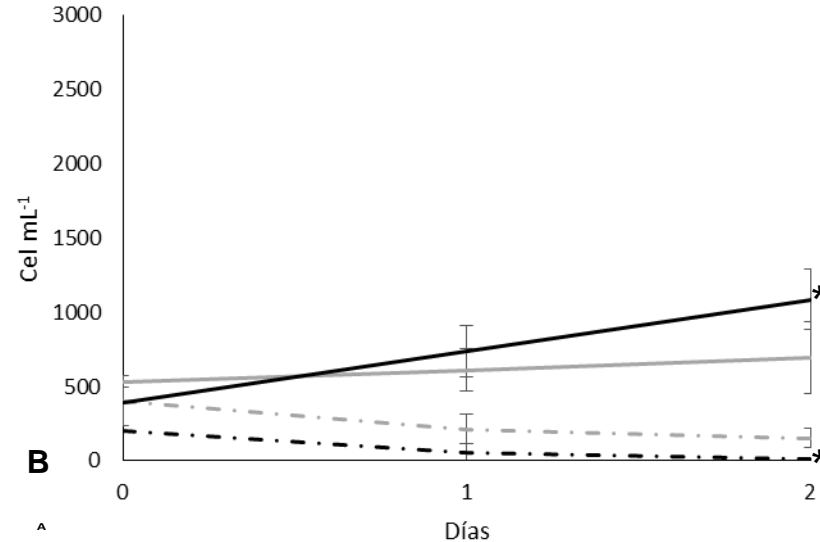
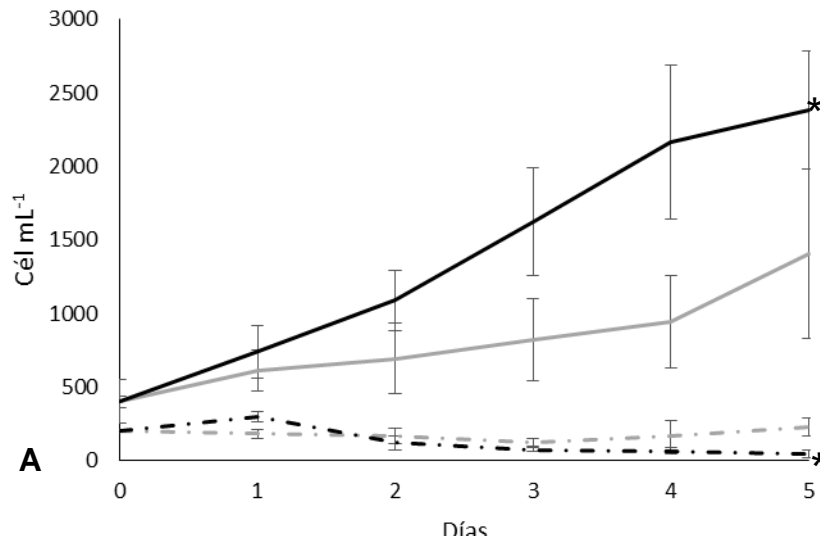


Figura 8. Cultivos con contacto celular entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1, B) Proporción 2:1 y C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo de *G. catenatum*, línea continua gris: testigo de *C. polykrikoides*, línea punteada negra: *G. catenatum* con contacto celular y línea punteada gris: *C. polykrikoides* con contacto celular. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo.

#### 5.2.1.1.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

En el tratamiento con contacto celular en la proporción 1:1, en el testigo monoalgal de *G. catenatum* predominaron las cadenas largas ( $\geq 7$  células) representando el 63% al 67%, mientras que en los cultivos en contacto con *C. polykrikoides* las células individuales en el primer día representaron el 26% y en el cuarto día representaron el 100% del cultivo (Fig. 9A').

El tratamiento con proporción 2:1 el primer día el 65% de las cadenas tenían una longitud de 2 a 3 células y en el segundo día solo se observaron células individuales (Fig. 9B'). Por el contrario en el cultivo testigo entre 63% y 65% de las cadenas fueron de  $\geq 7$  células, mientras las células individuales representaron menos del 3%.

En el tratamiento con proporción celular de 1:2 de *C. polykrikoides* y *G. catenatum* durante los cinco días del tratamiento predominaron las células individuales con un porcentaje de 73% al 98% (Fig. 9C'), por el contrario en el cultivo testigo predominaron las cadenas de  $\geq 7$  células (entre 60 y 67%).

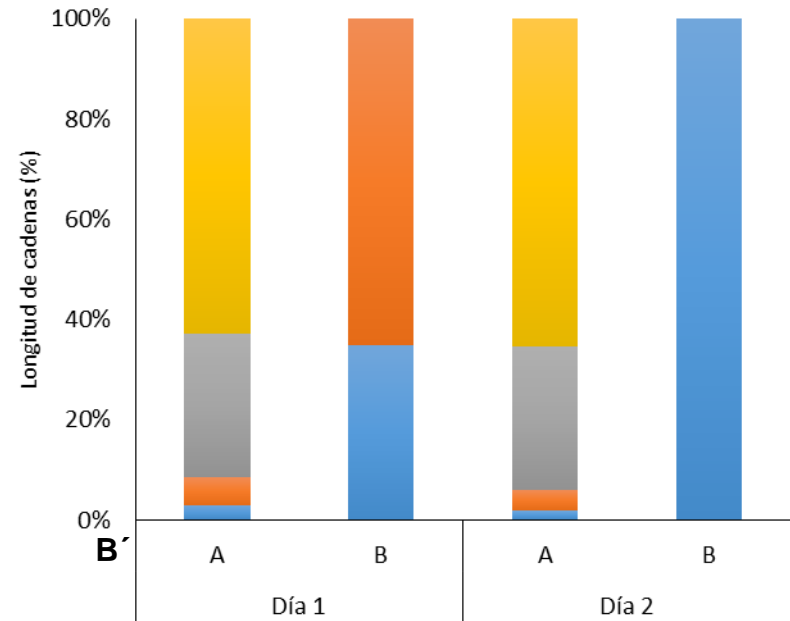
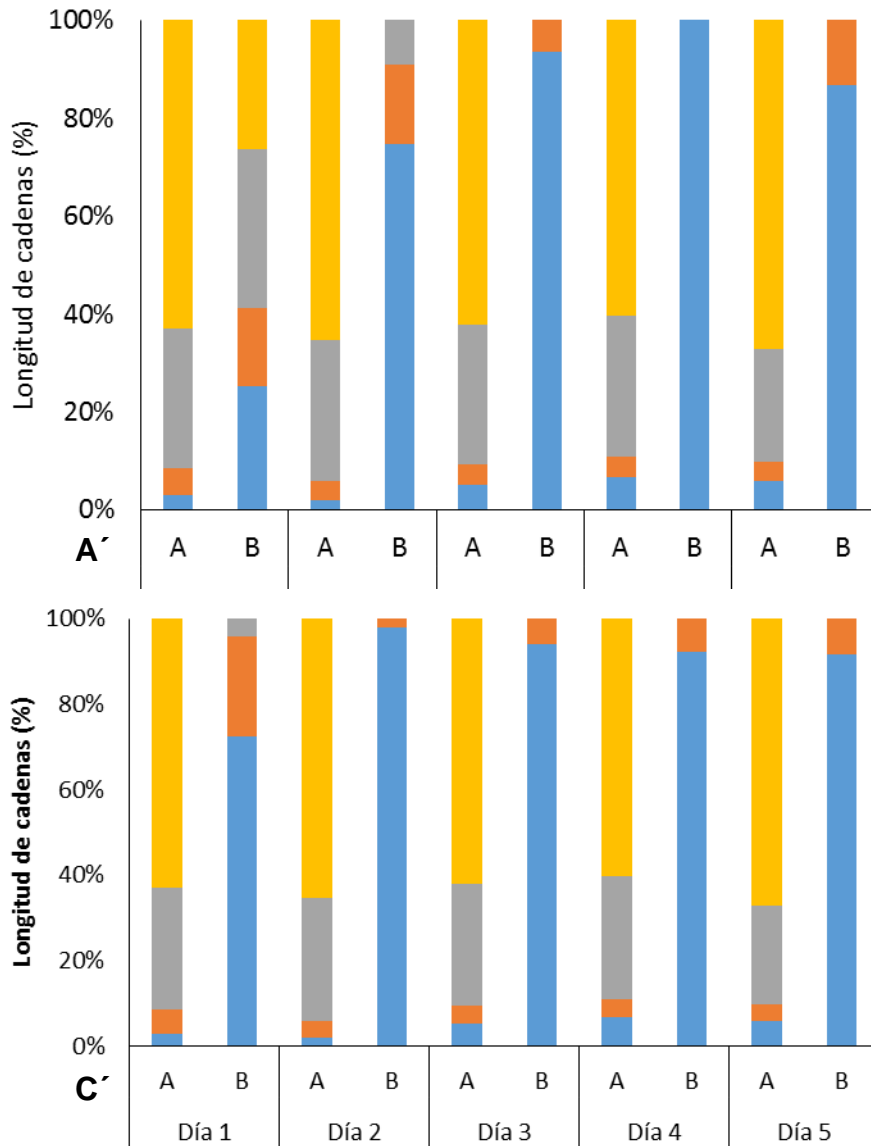


Figura 9. Porcentaje de cadenas en *G. catenatum* en contacto celular con *C. polykrikoides*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: cultivo de *G. catenatum* con *C. polykrikoides*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.1.4. Cambios morfológicos en *G. catenatum*

Al estar *G. catenatum* en contacto con células de *C. polykrikoides* en las proporciones celulares probadas, se observaron células esféricas sin flagelo, desprendimiento de la membrana plasmática y lisis celular (Fig. 10).

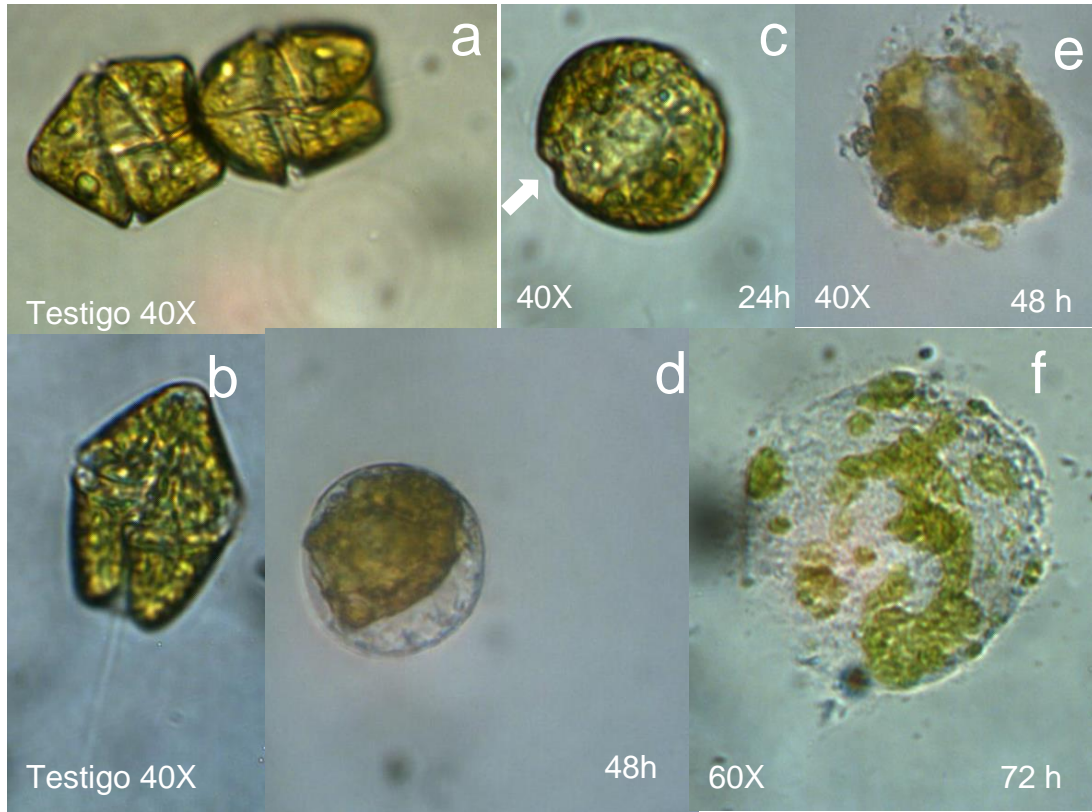


Figura 10. Morfología de *G. catenatum* expuesta a células de *C. polykrikoides*. (a y b) células de *G. catenatum* en el tratamiento testigo sin cambios morfológicos; c) célula individual redonda sin flagelos, d) desprendimiento de la membrana celular (48 h) (e y f) lisis celular (72 h). Tomada por: Zumaya-Higuera.

#### 8.3.2. Cultivos sin contacto

##### 8.3.2.1. Proporción 1:1

En los cultivos sin contacto celular entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum* en la proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), la densidad celular de *G. catenatum* continuó



umentando durante todo el tratamiento llegando a una densidad de  $400 \pm 66$  cél mL<sup>-1</sup> y no presentó diferencias significativas con el testigo. La abundancia de *C. polykrikoides* se mantuvo entre 100 y  $236 \pm 170$  cél mL<sup>-1</sup> en los cinco días del experimento (Fig. 11A).

#### **8.3.2.2. Proporción 2:1**

En la proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>) la densidad de *G. catenatum* tanto en presencia de *C. polykrikoides* como en el testigo aumentó constantemente hasta alcanzar  $470 \pm 142$  y  $430 \pm 89$  cél mL<sup>-1</sup> en el quinto día, respectivamente (Fig. 11B), sin haber diferencias significativas entre ellas *C. polykrikoides* aumentó a  $389 \pm 42$  cél mL<sup>-1</sup> en el segundo día, a partir de ese día decreció continuamente hasta llegar a  $238 \pm 51$  cél mL<sup>-1</sup>.

#### **8.3.2.3. Proporción 1:2**

En la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>) *G. catenatum* aumentó constantemente hasta alcanzar una densidad promedio de  $653 \pm 295$  cél mL<sup>-1</sup> al quinto día. Durante este tratamiento, el cultivo testigo mantuvo su densidad entre  $269 \pm 42$  y  $345 \pm 137$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 11C), tampoco hubo diferencias significativas en el crecimiento de *G. catenatum* con respecto al testigo. *C. polykrikoides* mantuvo su densidad celular entre  $254 \pm 71$  y  $371 \pm 29$  cél mL<sup>-1</sup>, sólo en el cuarto día aumentó a  $739 \pm 63$  cél mL<sup>-1</sup>, disminuyendo su densidad en el último día a  $365 \pm 46$  cél mL<sup>-1</sup>.

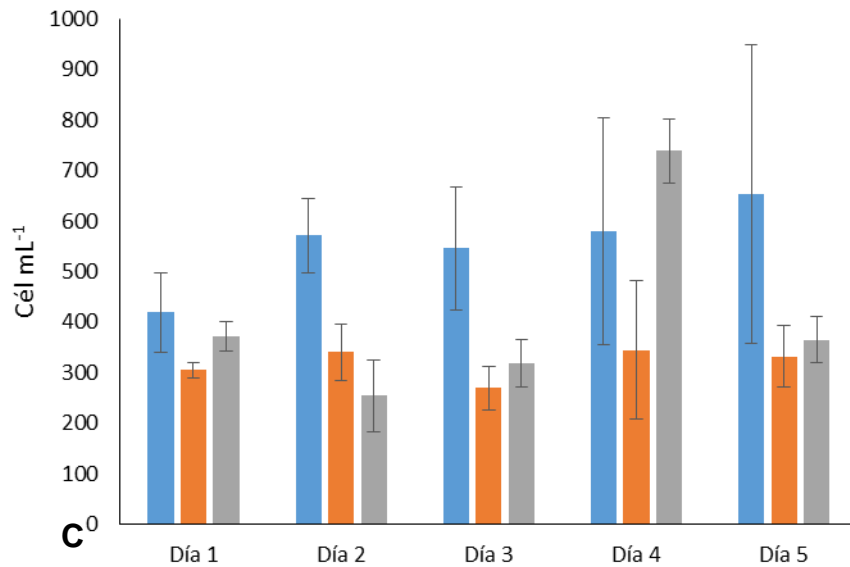
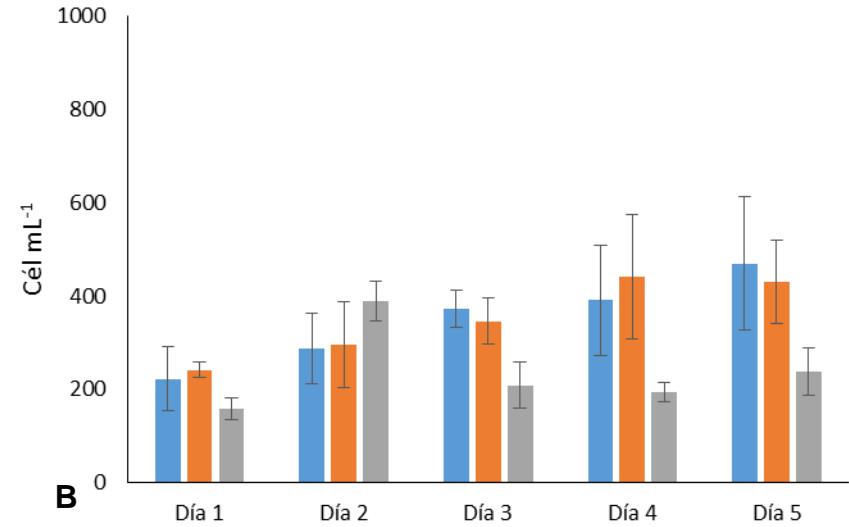
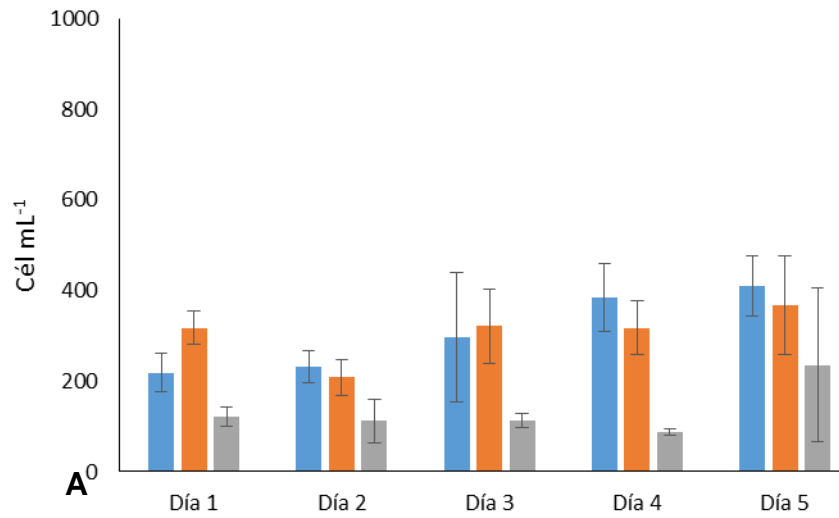


Figura 11. Densidades celulares de cultivos sin contacto celular entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja: tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *C. polykrikoides*. Líneas verticales: desviación estándar.

### **8.3.2.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum***

En la proporción celular 1:1 de los cultivos sin contacto entre *G. catenatum* y *C. polykrikoides* no hubo diferencias en la longitud de las cadenas con respecto al testigo (Fig. 12A'). En ambos casos, predominaron las células individuales hasta el cuarto día entre un 50 y un 60%, disminuyendo en el último día a un 41%. Las cadenas de 2 a 3 células se mantuvieron en un rango de 26 a un 35% hasta el último día donde incrementaron a 46%. Las cadenas de 4 a 6 representaron un porcentaje menor, manteniéndose los primeros 3 días entre 4 y 5%, incrementando al cuarto día a 17% y disminuyendo nuevamente en el último día a un 11%. También se observaron pocas cadenas de  $\geq 7$  células con un porcentaje entre 2 y 4%.

En los cultivos sin contacto celular entre *G. catenatum* y *C. polykrikoides* en la proporción 2:1, tampoco hubo diferencias en la longitud de cadenas con respecto al tratamiento control (Fig. 12B'). Las células individuales tendieron a dominar en ambos casos (de 45 a 61%), seguidas de las cadenas de 2 a 3 células (de 25 a 42%), mientras que las cadenas de 4 o más células representaron menos del 20%.

En los cultivos sin contacto entre *C. polykrikoides* y *G. catenatum* en la proporción 1:2, nuevamente no se observaron diferencias importantes con respecto al testigo en la longitud de cadenas (Fig. 12C'). En ambos casos dominaron las células individuales (de 49 a 71%), seguidas por las cadenas de 2 a 3 células (de 23 a 33%) y las cadenas de 4 o más células representaron menos del 20%.

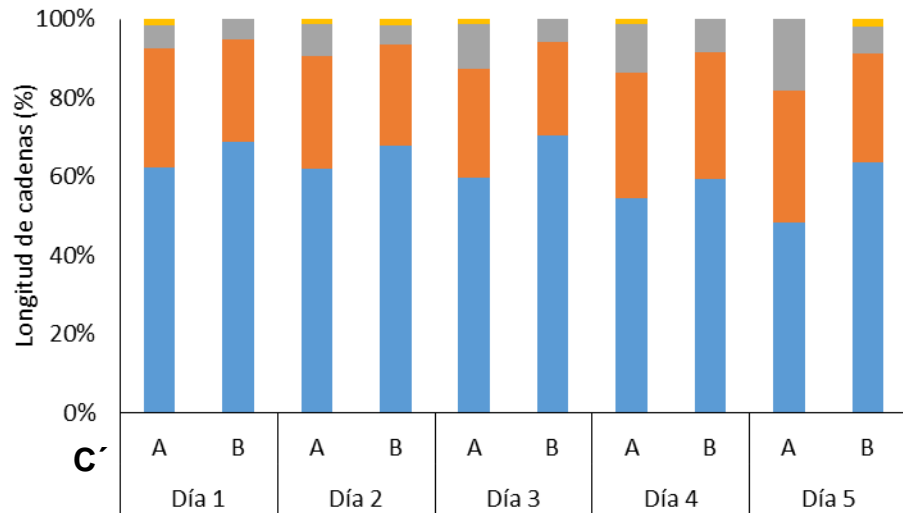
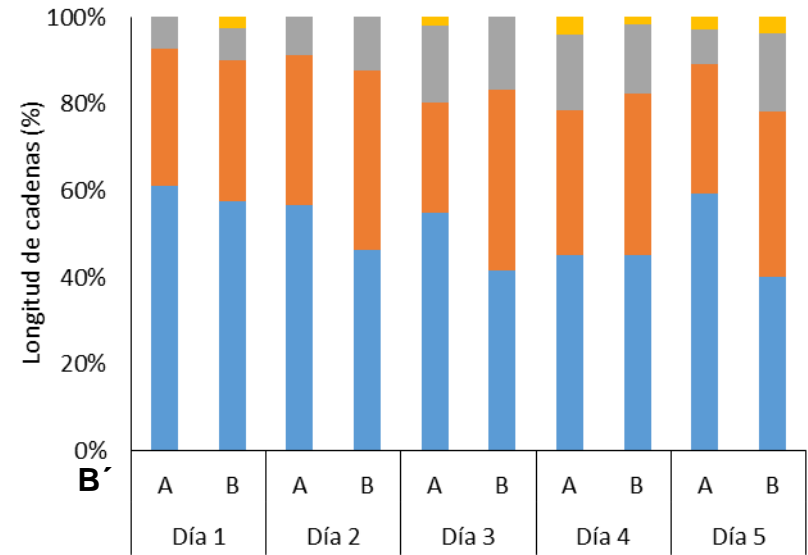
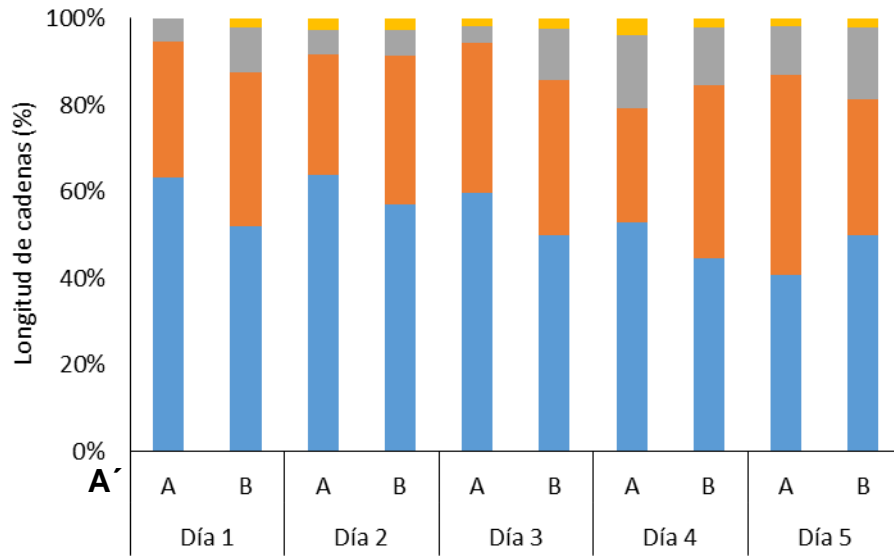


Figura 12. Porcentaje longitud de cadenas de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *C. polykrikoides*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *C. polykrikoides*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.2.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Los principales cambios celulares observados en *G. catenatum* en el experimento de competencia sin contacto celular separados por una membrana de *C. polykrikoides* en las diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2), fueron desarreglos en el cíngulo y el sulcus, células en forma trapezoidal o redondas, desprendimiento de membrana plasmática y núcleo prominente (Fig. 13).

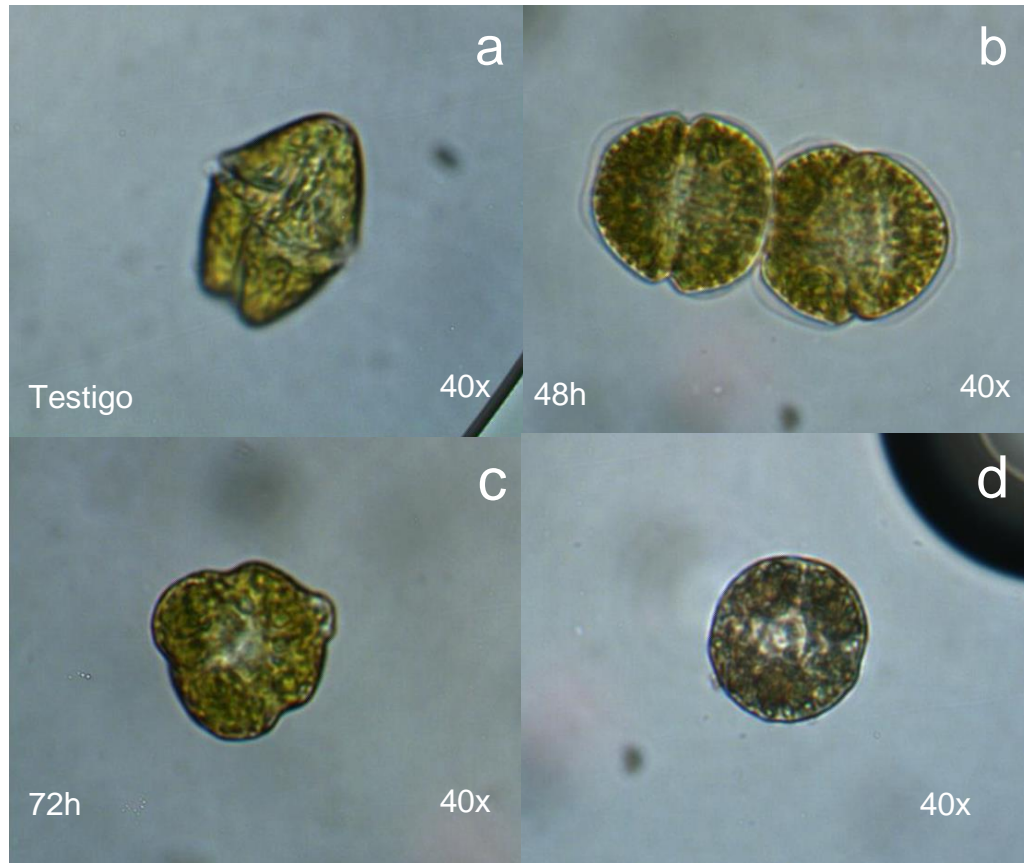


Figura 13. Morfología *G. catenatum* en cultivos sin contacto con *C. polykrikoides* en las tres proporciones (1:1, 2:1 y 1:2). (a) forma típica de la célula individual sin cambios observados en las primeras 24 h. (b) cadena de dos células redondeadas mostrando desprendimiento de membrana. (c) deformación de la célula, cíngulo y sulcus. (d) núcleo prominente, célula redonda. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### **8.3.3. Exposición a filtrado celulares de *C. polykrikoides***

#### **8.3.3.1. Proporción 1:1**

Al agregarle a cultivos de *G. catenatum* 10 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en la proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), se observó que *G. catenatum* incremento su densidad de 200 ± 22 a 259 ± 62 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 14), estas abundancias fueron menores a las del testigo, que incrementaron de 200 ± 13 a 425 ± 14 cél mL<sup>-1</sup>. Al adicionar 20 mL del filtrado de *C. polykrikoides* se observaron diferencias significativas (P <0.05) respecto a los controles, disminuyendo la abundancia de *G. catenatum* a 23 ± 20 cél mL<sup>-1</sup> al 5° día, mientras que en el tratamiento testigo las abundancias variaron entre 202 ± 0.3 a 392 ± 53 cél mL<sup>-1</sup>. Al adicionar 50 mL del filtrado de *C. polykrikoides* al cultivo de *G. catenatum* a las 24 h hubo una mortalidad del 100%, teniendo una densidad final de 4 ± 3 cél mL<sup>-1</sup>.

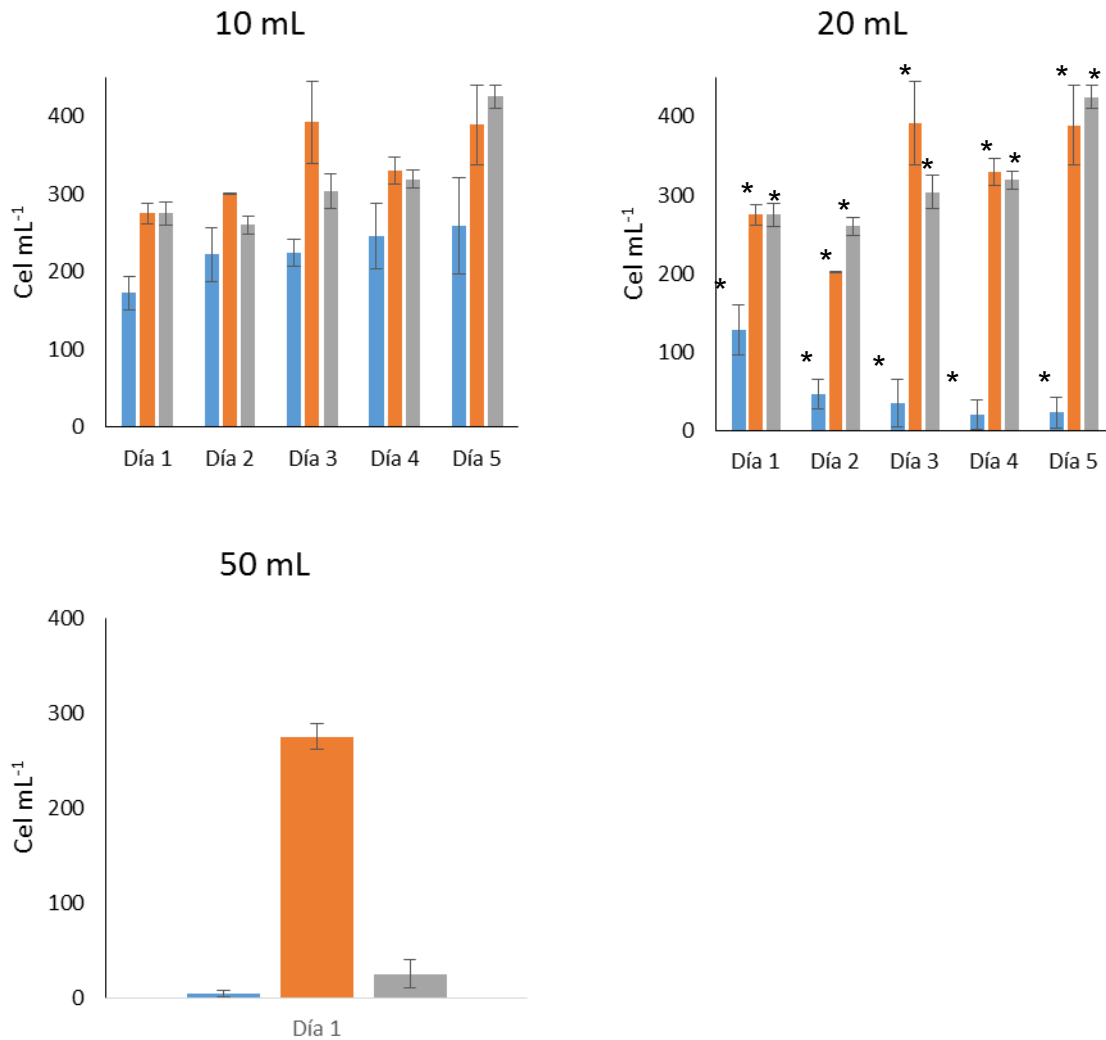


Figura 14. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y sus testigos.

### 8.3.3.1.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 10 mL del filtrado de *C. polykrikoides* al cultivo de *G. catenatum* las células individuales fluctuaron entre 60 y 80%, tanto en el tratamiento como en los cultivos testigo, seguido de las cadenas de 2 a 3 células con un porcentaje de

un ~20% (Fig. 15A'). Las cadenas de cuatro o más células se observaron a partir del segundo día en el testigo con medio GSe y a partir del tercer día en el resto de los tratamientos.

Al agregar 20 mL del filtrado de *C. polykrikoides* en la proporción 1:1, al primer día las células individuales representaron el 50%, mientras que las cadenas de 2 a 3 células correspondieron al 25%, las cadenas de 4 a 6 células al 8% y las cadenas de  $\geq 7$  células al 17% (Fig. 15B'). En ambos testigos también predominaron las células individuales, en el tratamiento testigo con medio GSe a las 24 h sólo hubo células individuales y cadenas de 4 a 6 células y en el tratamiento testigo con filtrado del mismo *G. catenatum* hubo células individuales y cadenas de  $\geq 2$  células. A partir del segundo día en todos los tratamientos incrementó el porcentaje de células individuales (entre 60 y 89%). En el cuarto y quinto día de exposición al filtrado de *C. polykrikoides*, *G. catenatum* sólo se observaron células individuales.

Con la adición de 50 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en la proporción 1:1, en todos los tratamientos sólo hubo células individuales en las primeras 24 h (datos no mostrados).



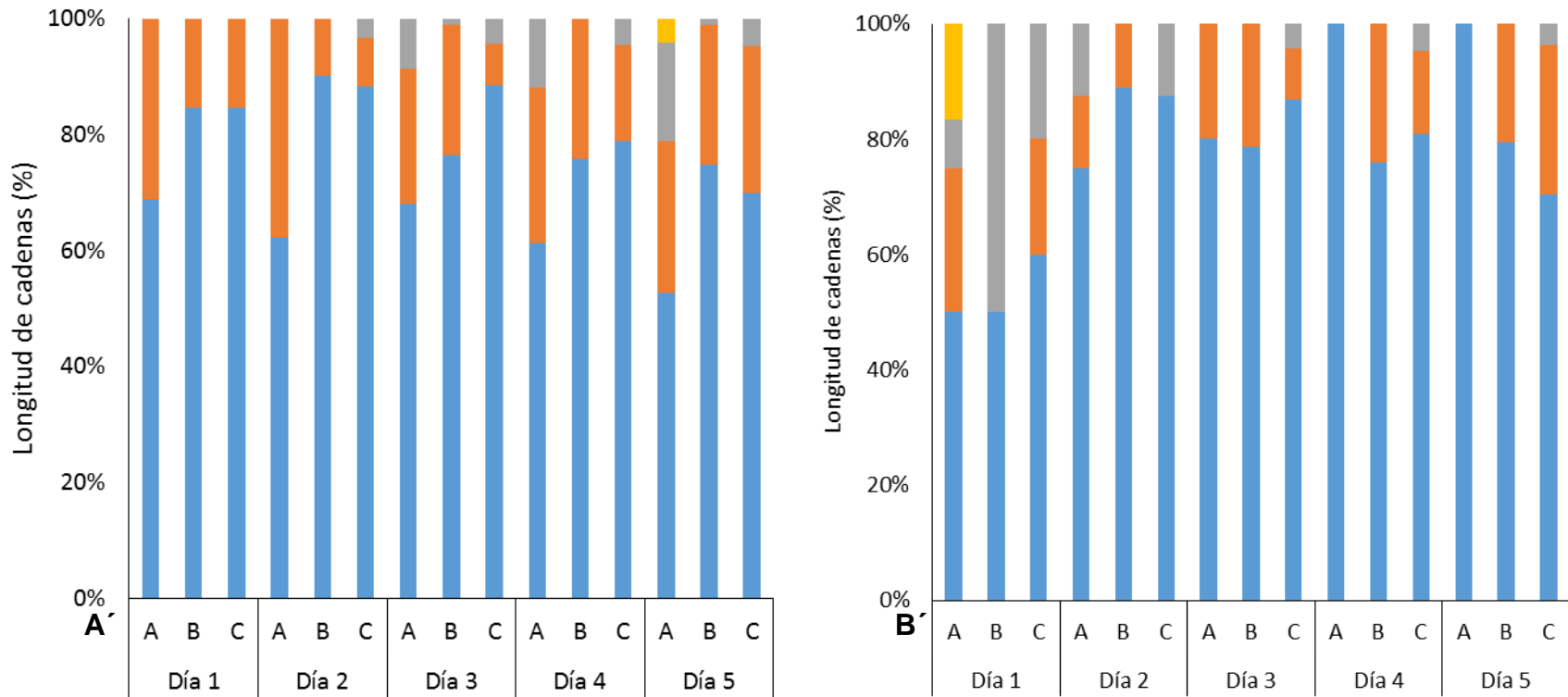


Figura 15. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B') Con 20 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 1:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

### 8.3.3.2. Proporción 2:1

Al agregar 10 mL del filtrado de *C. polykrikoides* al cultivo de *G. catenatum*, este mantuvo su densidad entre  $200 \pm 75$  y  $329 \pm 64$  cél mL<sup>-1</sup> sin diferencias significativas con el tratamiento control (Fig. 16). Al adicionar 20 mL de los filtrados de *C. polykrikoides* la densidad de *G. catenatum* aumentó constantemente hasta al quinto día a  $393 \pm 84$  cél mL<sup>-1</sup>, con densidades significativamente menores ( $P < 0.05$ ) con respecto al tratamiento testigo ( $572 \pm 0.1$  cél mL<sup>-1</sup>), el cual sólo contenía medio GSe. Al agregar 50 mL del filtrado de *C. polykrikoides*, *G. catenatum* aumentó alcanzando  $227 \pm 42$  cél mL<sup>-1</sup> al quinto día, con densidades significativamente menores ( $P > 0.05$ ) que en el tratamiento testigo, el cual contenía filtrados de *G. catenatum* y alcanzó una abundancia de  $341 \pm 23$  cél mL<sup>-1</sup>.

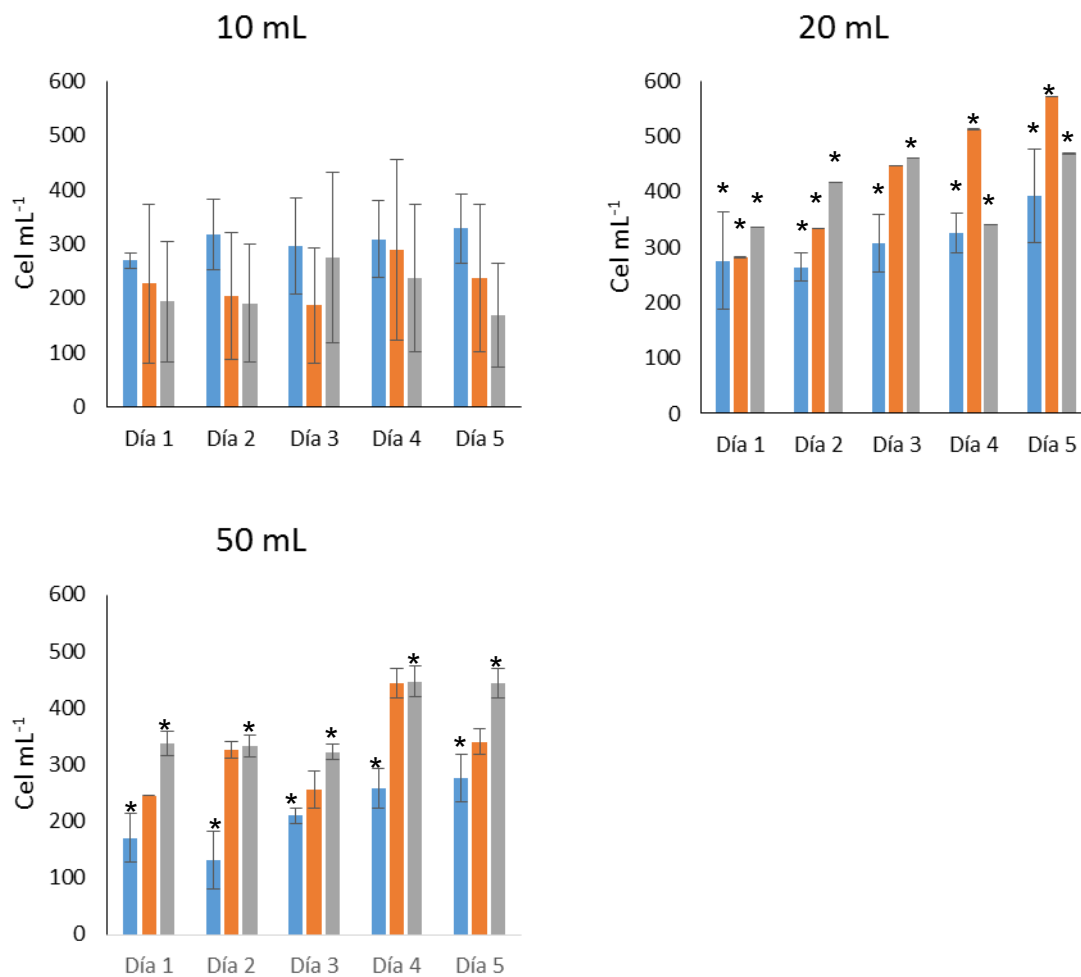


Figura 16. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 2:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris: *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y sus testigos.

### 8.3.3.2.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 10 mL del filtrado de *C. polykrikoides* a *G. catenatum* en proporción 2:1, en todos los tratamientos más del 50% de la población fueron células individuales (Fig. 17A). Las cadenas de 2 a 3 células representaron el 31% en los cultivos expuestos a los filtrados. En los dos controles el porcentaje de

cadena de 2 a 3 células fue de 21 y 30% y las cadenas de 4 a 6 células correspondieron a menos del 23%.

Al agregar al cultivo de *G. catenatum* 20 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en la proporción 2:1 nuevamente en todos los tratamientos más del 60% fueron células individuales (Fig. 17B'), las cadenas de 2 a 3 células fluctuaron entre 18 y 37% y las cadenas de 4 a 6 células representaron menos del 15%. En ningún tratamiento se observaron cadenas de  $\geq 7$  células. A partir del tercer día en los cultivos de *G. catenatum* con el filtrado de *C. polykrikoides* aumentó el porcentaje de células individuales (del 69 a 82%), con respecto a los tratamientos testigos que tuvieron un 70% de células individuales.

Con 50 mL del cultivo filtrado en la proporción 2:1 en todos los tratamientos *G. catenatum* presentó principalmente células individuales (más de 50%), durante los cinco días monitoreados (Fig. 17C'). En el tratamiento de *G. catenatum* con el filtrado de *C. polykrikoides*, el porcentaje de células individuales fue de 72 a 83%, en el testigo con medio GSe las células individuales representaron del 56 al 73% y en el testigo al que se adicionó el filtrado de su mismo cultivo el porcentaje de células individuales fue de 61 y 73%. Del 11 al 40% de la población fueron cadenas de 2 a 3 células y las cadenas de 4 a 6 células representaron menos del 10%. Al exponer a *G. catenatum* al filtrado de *C. polykrikoides*, sólo en el primer día se encontraron cadenas de 7 o más células.

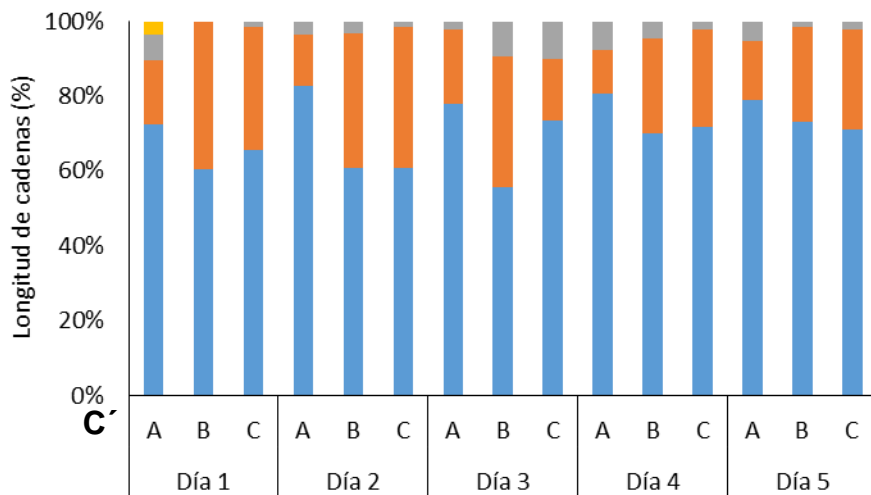
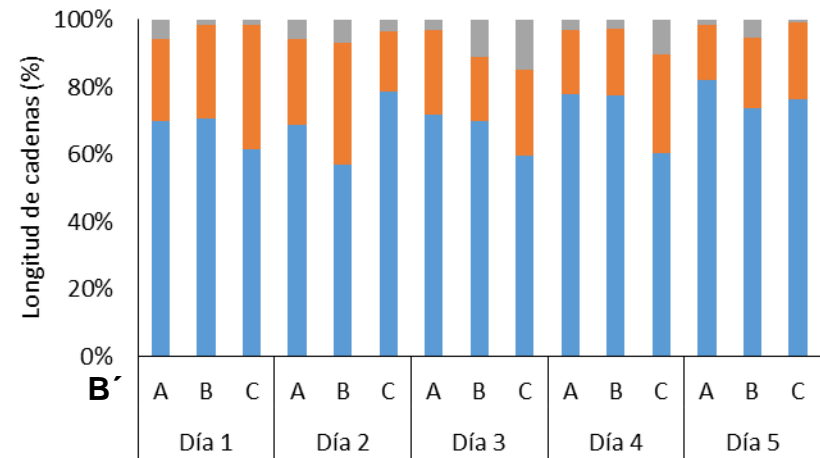
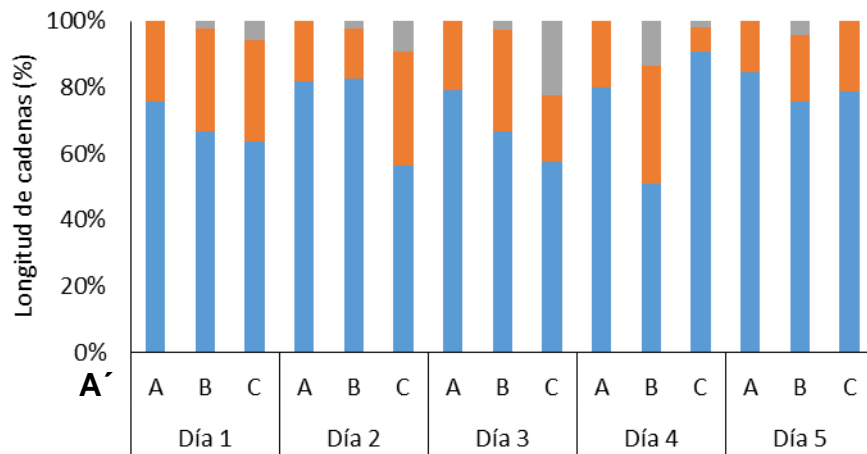


Figura 17. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B') Con 20 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. C') Con 50 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 2:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

### 8.3.3.3. Proporción 1:2

En la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>) el crecimiento de *G. catenatum* fue similar al agregar diferentes volúmenes del filtrado de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL), obteniendo una densidad promedio al quinto día de  $789 \pm 173$  cél mL<sup>-1</sup>,  $781 \pm 155$  cél mL<sup>-1</sup> y  $568 \pm 125$  cél mL<sup>-1</sup> respectivamente, superando en todos los casos las densidades de los testigos controles (de  $400 \pm 4$  a  $510 \pm 34$  cél mL<sup>-1</sup>) (Fig. 18).

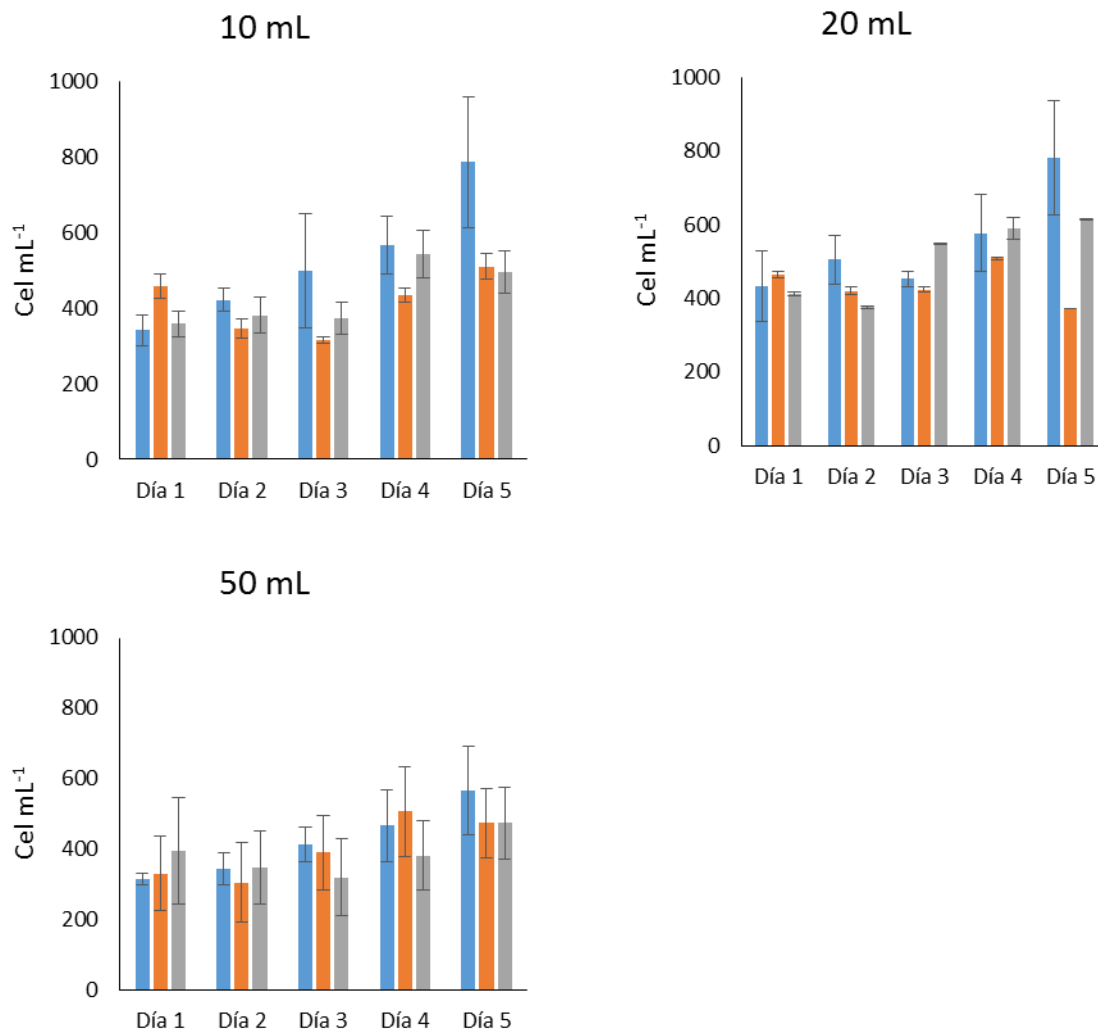


Figura 18. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *C. polykrikoides* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *C. polykrikoides*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris: *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar.

### 8.3.3.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 10 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en la proporción 1:2 del día 2 al 4 se observó un pequeño incremento de células individuales (66 a 83%) con respecto a los dos testigos (62 al 82%) (Fig. 19A´). Las cadenas de 2 a 3 células representaron del 11 a 25%, mientras que las cadenas de 4 a 6 representaron menos del 11%. Las cadenas de  $\geq 7$  células solo se observaron en el primer día en uno de los tratamientos con el 2%.

Al agregar 20 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en proporción 1:2, al cultivo de *G. catenatum*, se observó mayor variabilidad que en los tratamientos descritos previamente, dominando nuevamente las células individuales (de 65 a 86%) (Fig. 19B´). En los primeros tres días al agregar el filtrado el porcentaje de células individuales fue mayor (de 79 a 86%) a los testigos (64%). De las células formando cadenas, las cadenas más abundantes fueron las cadenas de 2 a 3 células (9 a 38%), las cadenas de 4 a 6 representaron menos del 23%, mientras que las cadenas de  $\geq 7$  células no fueron detectadas.

Al agregar 50 mL del cultivo filtrado de *C. polykrikoides* en una proporción 1:2 nuevamente dominaron las células individuales con más del 60%, incluso en algunos casos llegaron a representar el 99% (Fig. 19C´). En general el porcentaje de las células en cadenas es mayor en los tratamientos testigos con excepción de los últimos días del tratamiento (4° y 5°), siendo más comunes las cadenas de 2 a 3 células de longitud (4 a 46%).

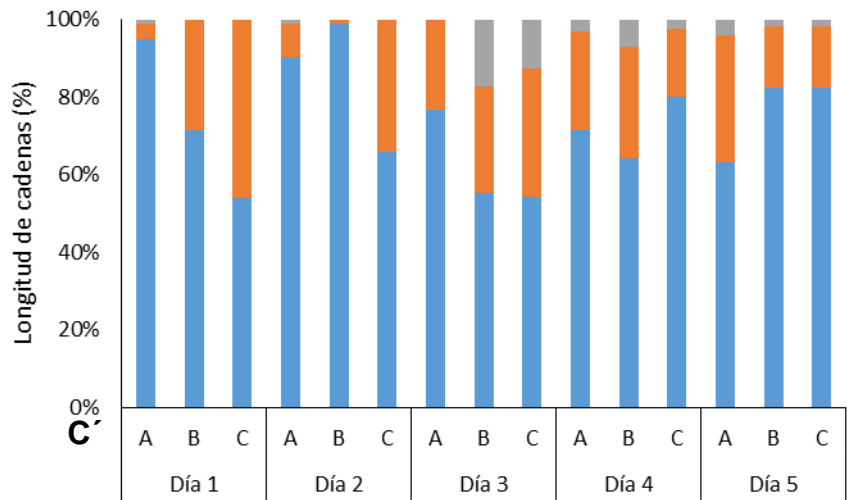
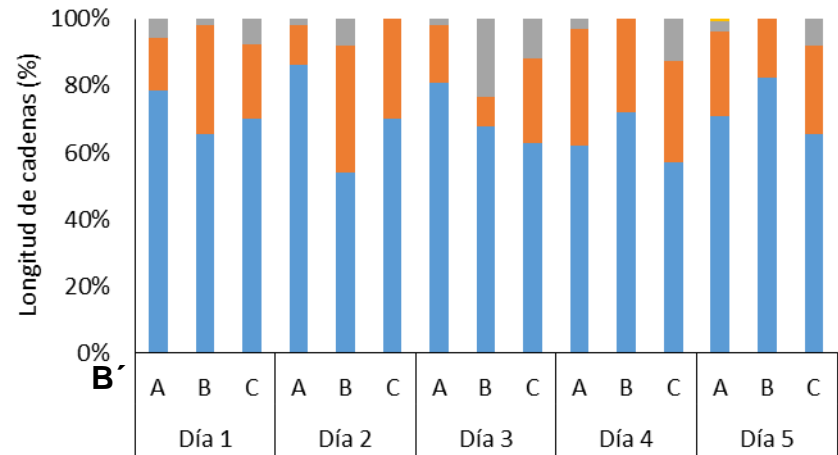
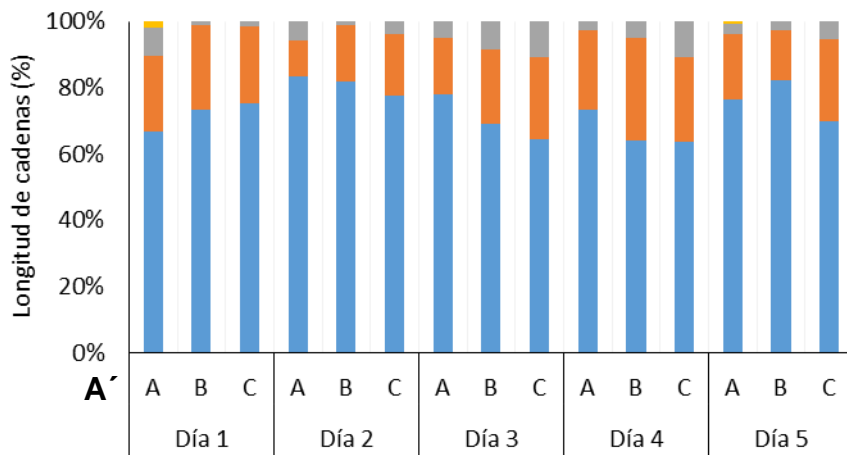


Figura 19. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 10 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. B') Con 20mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. C') Con 50 mL de cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en una proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *C. polykrikoides*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.



#### 8.3.3.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Cuando se agregaron diferentes volúmenes de filtrado (10, 20 y 50 mL), en los experimentos de exposición a los filtrados de *C. polykrikoides* en las diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2), se observaron células redondas, sin flagelos, núcleo evidente, desprendimiento de la membrana plasmática y lisis celular (Fig. 20).

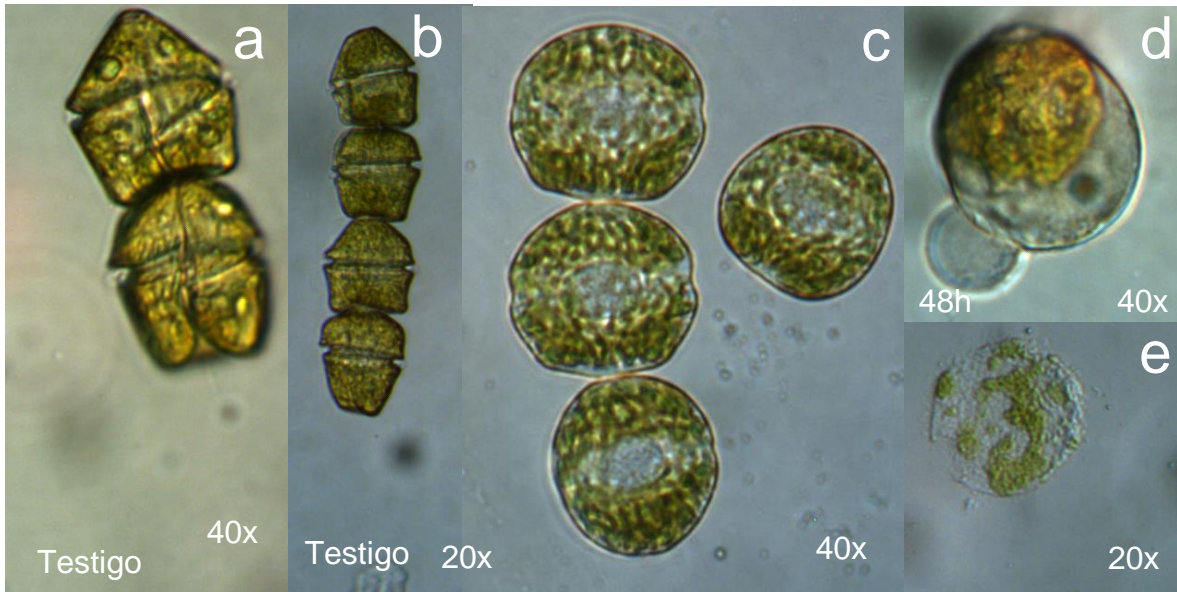


Figura 20. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *C. polykrikoides*. (a y b) Controles de las células de *G. catenatum* sin cambios morfológicos. c) células en cadenas y célula individual redondeada, sin flagelos mostrando núcleo evidente. d) desprendimiento de la membrana plasmática en 48 h. e) lisis celular. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### **8.3.4. *Gymnodinium impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum***

#### **8.3.4.1. Cultivos con contacto celular**

##### **8.3.4.1.1. Proporción 1:1**

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* proporción celular 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), a las 24 h *G. impudicum* y *G. catenatum* aumentaron a 470 ± 22 y 260 ± 146 cél mL<sup>-1</sup>, respectivamente. *G. impudicum* continuó creciendo hasta el 5° día alcanzando una densidad de 2,059 ± 117 cél mL<sup>-1</sup>, *G. catenatum* mantuvo una densidad promedio de 229 ± 99 cél mL<sup>-1</sup> hasta el tercer día, aumentando al 5° día a 514 ± 299 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 21A). Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días, *G. catenatum* alcanzó una densidad de 2,383 ± 402 cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum* de 3,526 ± 787 cél mL<sup>-1</sup>.

##### **8.3.4.1.2. Proporción 2:1**

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* en la proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>) *G. catenatum* mantuvo su densidad entre 190 ± 54 cél mL<sup>-1</sup> y 200 ± 136 cél mL<sup>-1</sup>. *G. impudicum* continuo creciendo hasta alcanzar al cuarto día a una densidad de 2,493 ± 507 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 21B). Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días, de tal manera que *G. catenatum* llegó a 2,383 ± 402 cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum* a 3,526 ± 787 cél mL<sup>-1</sup>.

##### **8.3.4.1.3. Proporción 1:2**

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* con proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>), *G. impudicum* aumentó constantemente alcanzando una densidad promedio de 1,406 ± 228 cél mL<sup>-1</sup> en el último día del tratamiento (Fig. 21C). *G. catenatum* también creció alcanzando una densidad menor de 928 ± 173 cél mL<sup>-1</sup>. Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días, alcanzando *G. catenatum* 2,383 ± 402 cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum* 3,526 ± 787 cél mL<sup>-1</sup>.

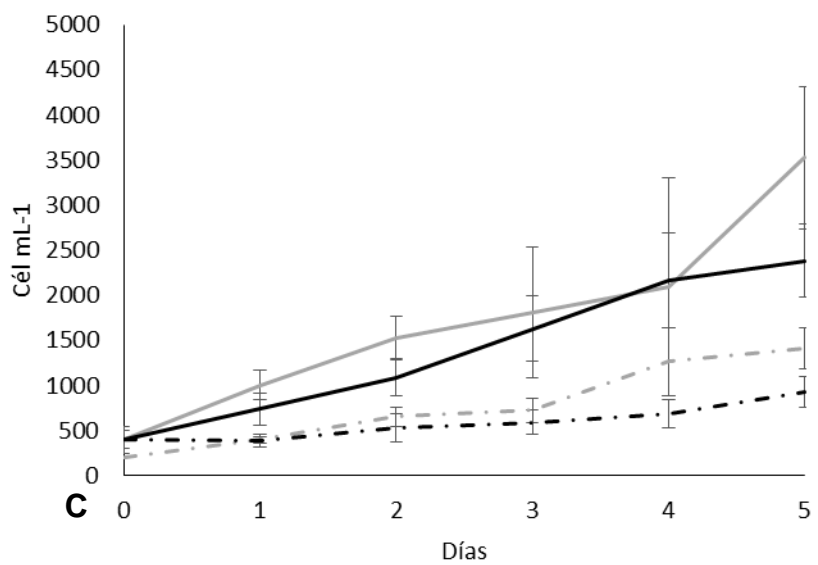
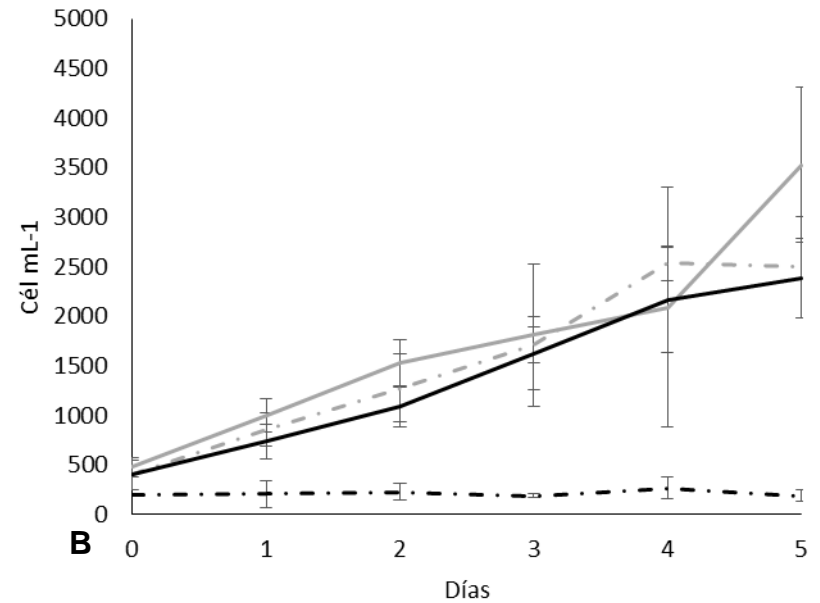
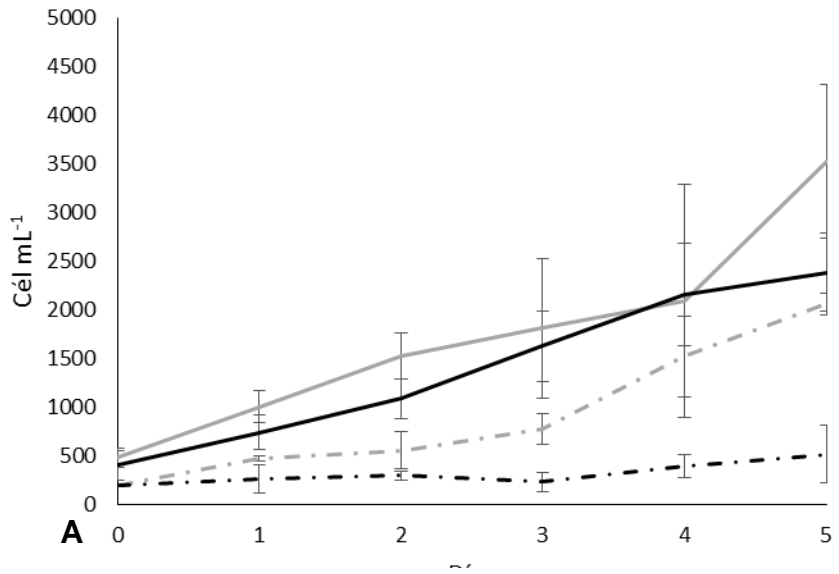


Figura 21. Cultivos con contacto de *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum*. A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo *G. catenatum*. Línea continua gris: testigo *G. impudicum* (GIBACO-1). Línea punteada negra: *G. catenatum* en cultivo con contacto celular. Línea punteada gris: *G. impudicum* (GIBACO-1) en cultivo con contacto celular. Líneas verticales: desviación estándar.

#### **8.3.4.1.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum***

En los cultivos con contacto entre *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum* en proporción 1:1, se observó que a las 24 h predominaron las cadenas de 4 a 6 células. Al cuarto día de estar expuesto *G. catenatum* a células de *G. impudicum* la proporción de células individuales aumentó a 42%, disminuyendo en el 5° día a 26%. Las cadenas de  $\geq 7$  células también disminuyeron, del 33 al 4% (Fig. 22A'). En el cultivo testigo las cadenas de  $\geq 7$  células fueron las más abundantes de 63% al 67%

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* con proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>), *G. catenatum* presentó un mayor porcentaje de células individuales (de 16 a 40%) y cadenas más cortas en comparación con el tratamiento testigo, predominando las cadenas de 4 a 6 células (36 a 43%) (Fig. 22B'), esta tendencia aumenta con los días del tratamiento. En el cultivo testigo las cadenas de  $\geq 7$  células fueron las más abundantes en los cinco días del experimento representando del 60 al 67%.

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* en la proporción 1:2, tuvo un efecto similar a lo observado en el experimento con la proporción 2:1 con ambas especies (Fig. 22C'). Se observó un mayor porcentaje de células individuales (de 2 a 42%) y cadenas cortas (44%) las cuales aumentaron constantemente hasta el 5° día. Después del segundo día las cadenas de  $\geq 7$  células representaron del 44 al 10%. En el cultivo testigo no se observan cambios importantes en el número de células que forman cadenas, los porcentajes más altos corresponden a las cadenas de  $\geq 7$  células (de 60 a 67%).

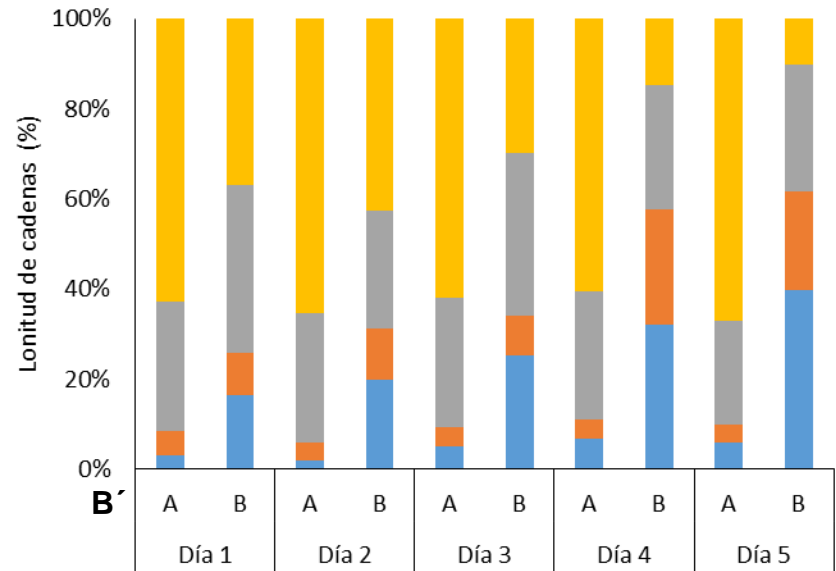
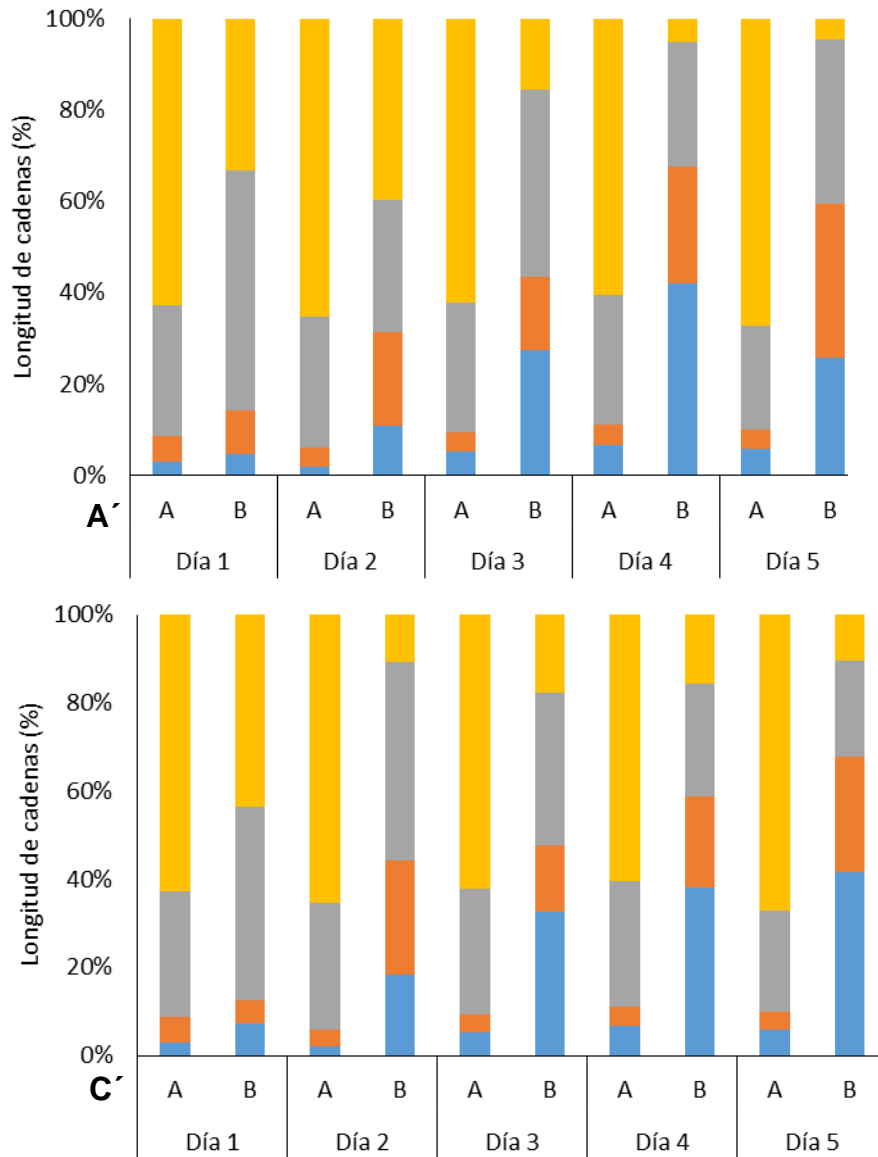


Figura 22. Porcentaje de longitud de cadenas % de *G. catenatum* expuesto a *G. impudicum*. A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: cultivo de *G. catenatum* con contacto celular con *G. impudicum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.4.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Al estar en contacto *G. catenatum* con *G. impudicum* se observaron células redondeadas, ausencia de flagelos, desarreglos en el cíngulo y sulcus y lisis celular (Fig. 23). Estos cambios ocurrieron en todas las proporciones probadas y fueron más notables a partir de las 48 h.

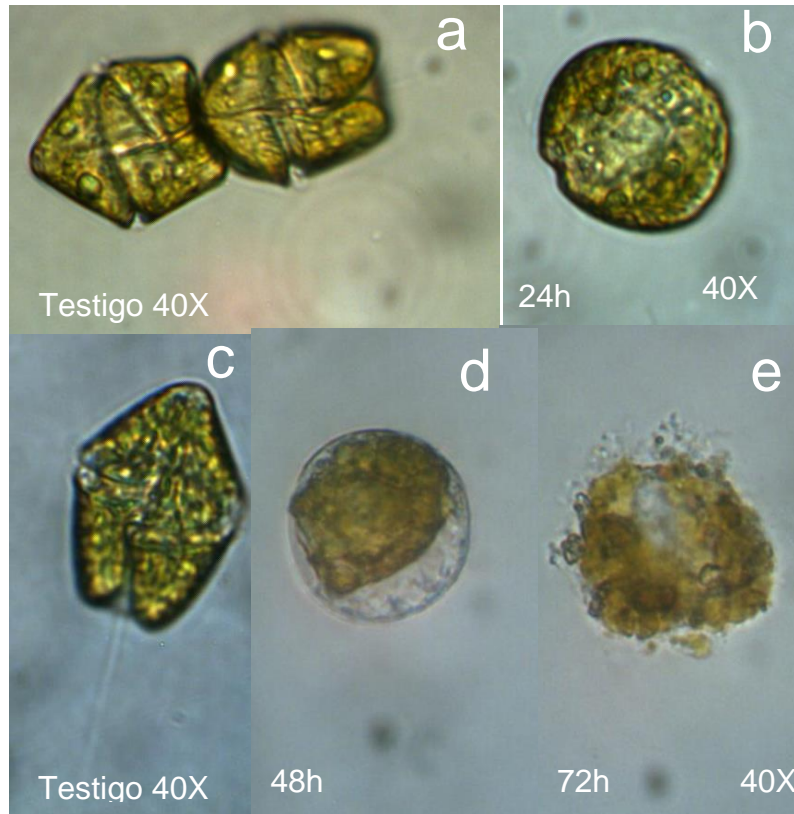


Figura 23. Morfología de *G. catenatum* al estar en contacto con *G. impudicum* cepa GIBACO-1 (a y c) *G. catenatum* sin cambios morfológicos. b) célula redondeada, sin flagelos. d) muerte celular. e) desprendimiento de la membrana plasmática. f) lisis celular. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### 8.3.5. Cultivo sin contacto

#### 8.3.5.1. Proporción 1:1

En los cultivos sin contacto celular entre *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum*, proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), *G. catenatum* mantuvo una densidad entre 200 ± 7 a 365 ± 345 cél mL<sup>-1</sup> al igual que su tratamiento testigo y *G. impudicum* creció constantemente hasta alcanzar 3,337 ± 114 cél mL<sup>-1</sup> al quinto día (Fig. 24A).

#### 8.3.5.2. Proporción 2:1

En el cultivo sin contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* en la proporción celular de 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>), *G. catenatum* mantuvo una densidad entre 322 ± 102 y 477 ± 42 cél mL<sup>-1</sup> al igual que su testigo. *G. impudicum* aumentó constantemente su abundancia hasta tener al 5° día 2,987 ± 152 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 24B).

#### 8.3.5.3. Proporción 1:2

En los cultivos sin contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum* en la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>), *G. catenatum* continuó su crecimiento durante los cinco días del experimento alcanzando 500 ± 115 cél mL<sup>-1</sup>, superando al testigo (400 ± 130 cél mL<sup>-1</sup>), sin haber diferencia significativa. Por su parte, *G. impudicum* creció hasta 2,684 ± 158 cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 24C).

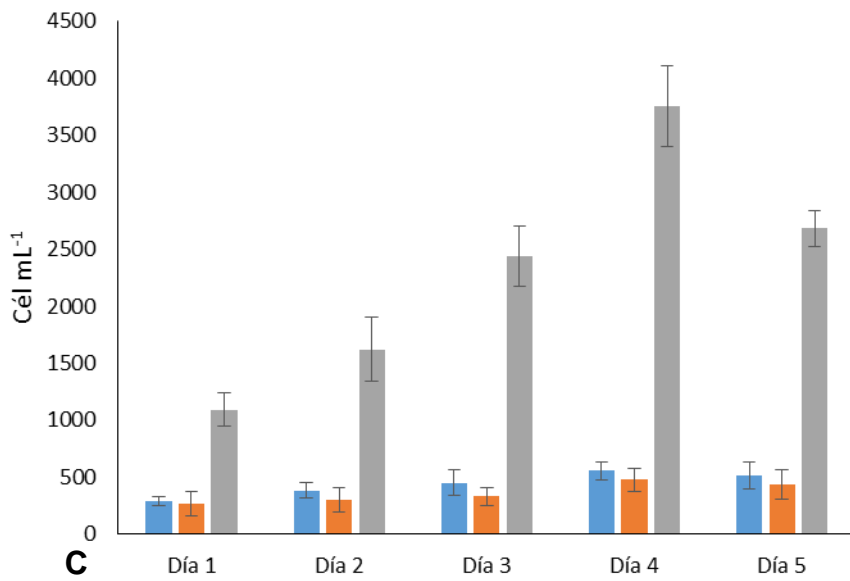
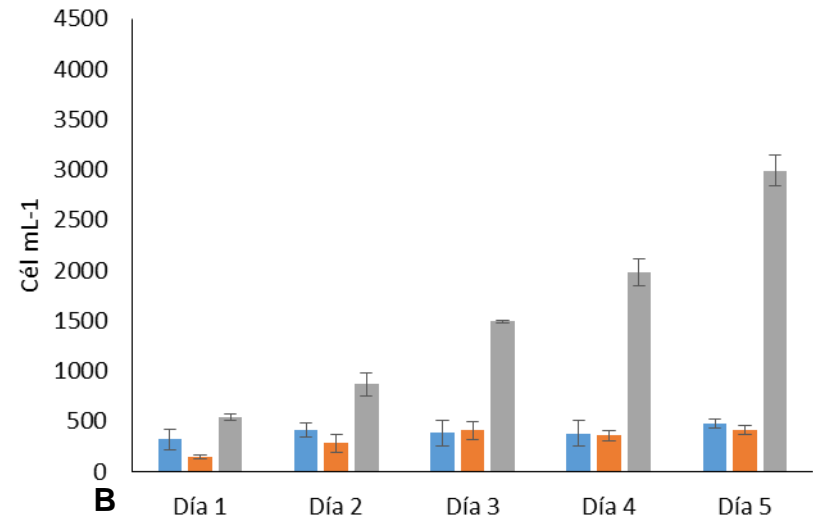
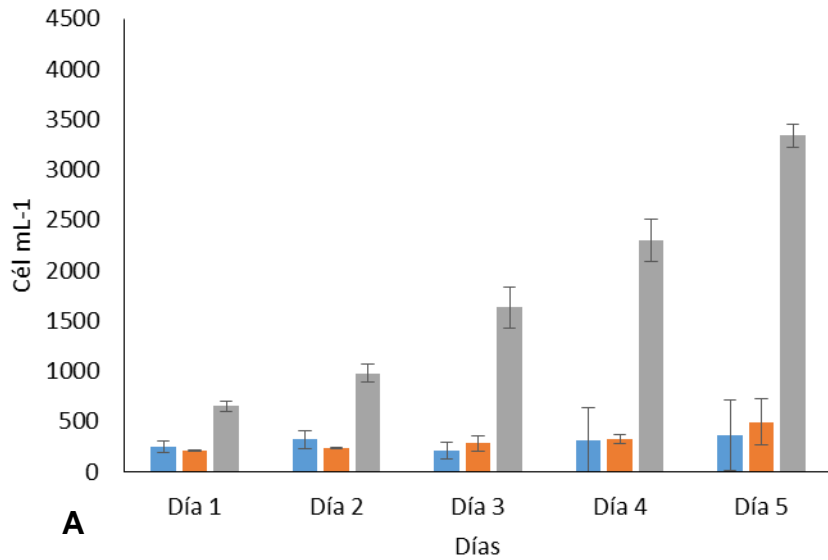


Figura 24. Densidades celulares en cultivos de interacción entre *G. impudicum* (GIBACO-1) y *G. catenatum* sin contacto celular. A) proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja: tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *G. impudicum*. Líneas verticales: desviación estándar.



### **8.3.5.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum***

En el tratamientos sin contacto entre *G. catenatum* y *G. impudicum* en proporción 1:1 no hubo diferencia en el largo de las cadenas, con respecto al testigo o al tiempo de exposición (Fig. 25A'). Tanto en el tratamiento como en el testigo las células individuales oscilaron de 34 a un 65%, seguidas de las cadenas de 2 a 3 células con porcentajes de 16 a 39%, las cadenas de 4 a 6 células tuvieron la misma proporción (16 a 39%) y las cadenas de  $\geq 7$  células representaron menos del 10%.

En el tratamiento sin contacto de *G. catenatum* y *G. impudicum* en la proporción 2:1 tampoco hubo diferencia en el largo de las cadenas, ni con el testigo, ni respecto al tiempo. Tanto en el tratamiento como en el testigo las células individuales representaron del 33 a un 45%, seguidas de las cadenas de 2 a 3 células con 22 al 39%, las cadenas de 4 a 6 células correspondieron del 19 al 33% y las cadenas de  $\geq 7$  células fueron menos del 8% (Fig. 25B').

En el tratamiento sin contacto entre *G. catenatum* y *G. impudicum* en la proporción 1:2 nuevamente no hubo diferencia significativa en el largo de las cadenas, ni con el testigo, ni con el tiempo de exposición. En el tratamiento y en el testigo las células individuales representaron del 39 al 55%, seguidas de las cadenas de 2 a 3 células del 22 al 26%, las cadenas de 4 a 6 células se encontraron con un porcentaje del 25 al 36% y las cadenas de  $\geq 7$  células representaron menos del 5% (Fig. 25C').

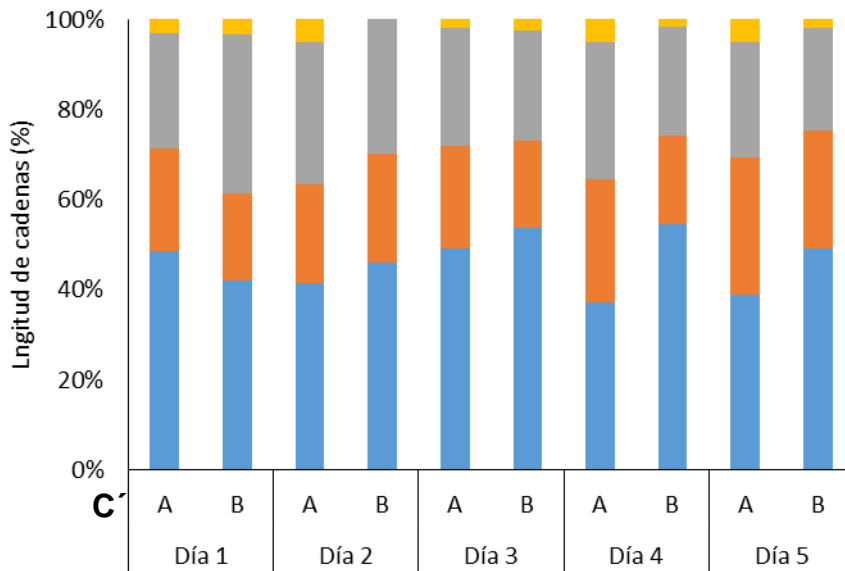
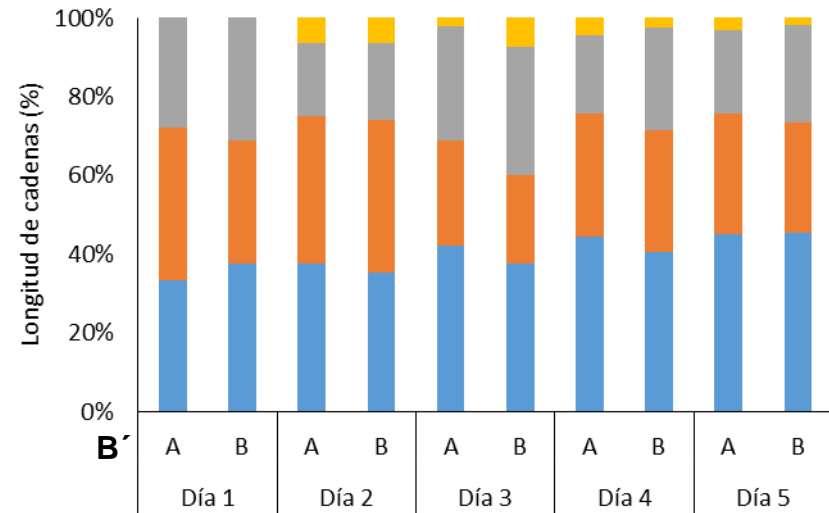
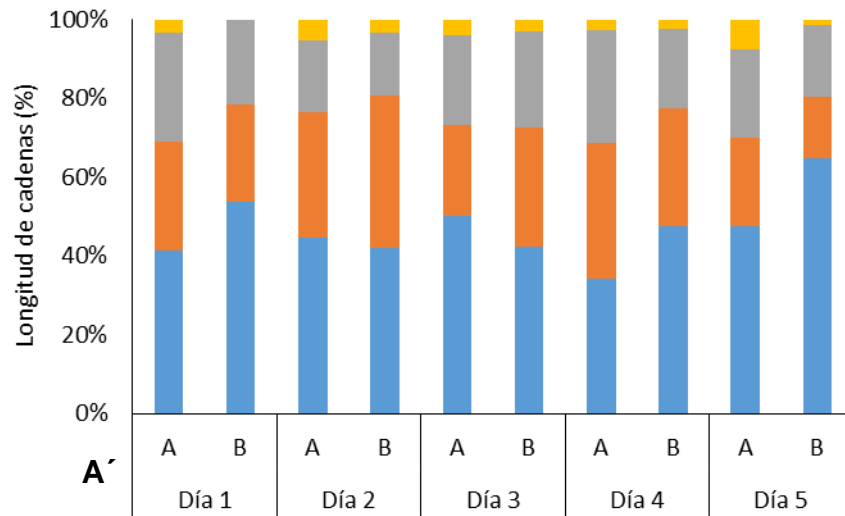


Figura 25. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *G. impudicum* (GIBACO-1). A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *G. impudicum*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

### 8.3.5.3.2. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Los cambios morfológicos observados en células de *G. catenatum* expuestas al cultivo de *G. impudicum* (GIBACO-1), sin contacto celular, (separados por una membrana) en las diferentes proporciones celulares fueron: desarreglos en el cíngulo y el sulcus, forma trapezoidal en células individuales, pérdida de flagelos y desprendimiento de una membrana plasmática (Fig. 26).

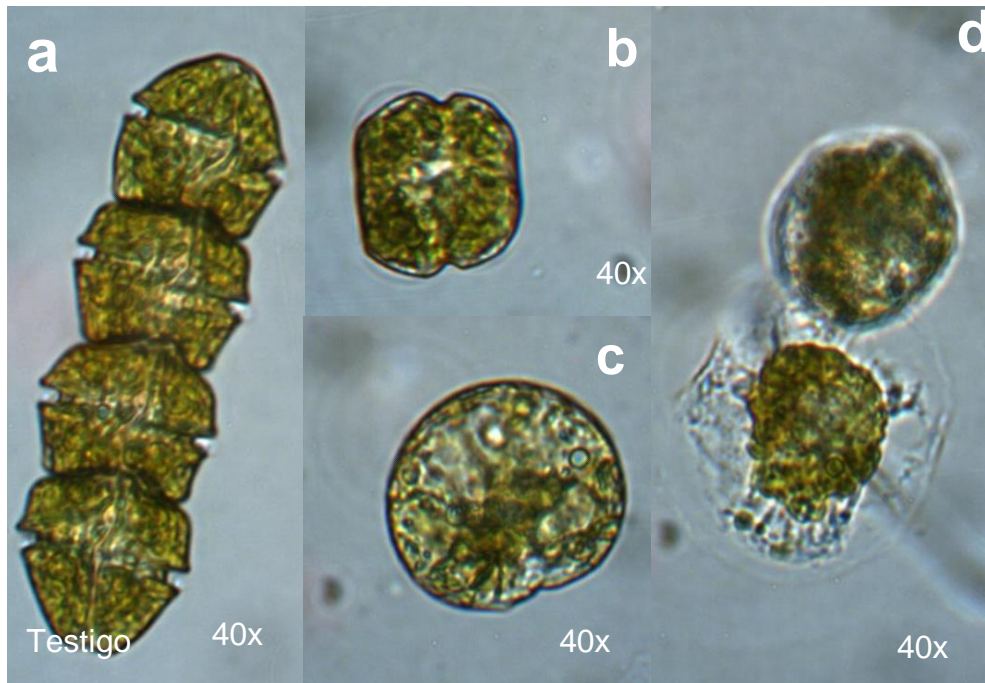


Figura 26. Morfología de *G. catenatum* en cultivos sin contacto celular con *G. impudicum* (GIBACO-1). a) *G. catenatum* sin cambios morfológicos; b) célula con deformación en el cíngulo y sulcus; c) célula redonda, sin flagelos; d) desprendimiento de la membrana plasmática y lisis celular.

### 8.3.6. Exposición a filtrados celulares de *G. impudicum* (GIBACO-1)

#### 8.3.6.1. Proporción 1:1

Al adicionar a cultivos de *G. catenatum* cultivos filtrados de *G. impudicum*, en proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), se observó que al agregar 10 mL de filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* al cuarto día disminuyó su densidad a  $127 \pm 2$  cél

mL<sup>-1</sup>. Al agregar 20 mL de filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* mantuvo su densidad entre  $150 \pm 51$  y  $213 \pm 56$  cél mL<sup>-1</sup> durante los 5 días del tratamiento. Cuando se adicionaron 50 mL de los filtrados, *G. catenatum* mantuvo una densidad entre  $140 \pm 46$  y  $165 \pm 40$  cél mL<sup>-1</sup> hasta el cuarto día, al 5° día esta aumentó a  $280 \pm 54$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 27). En ningún caso hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

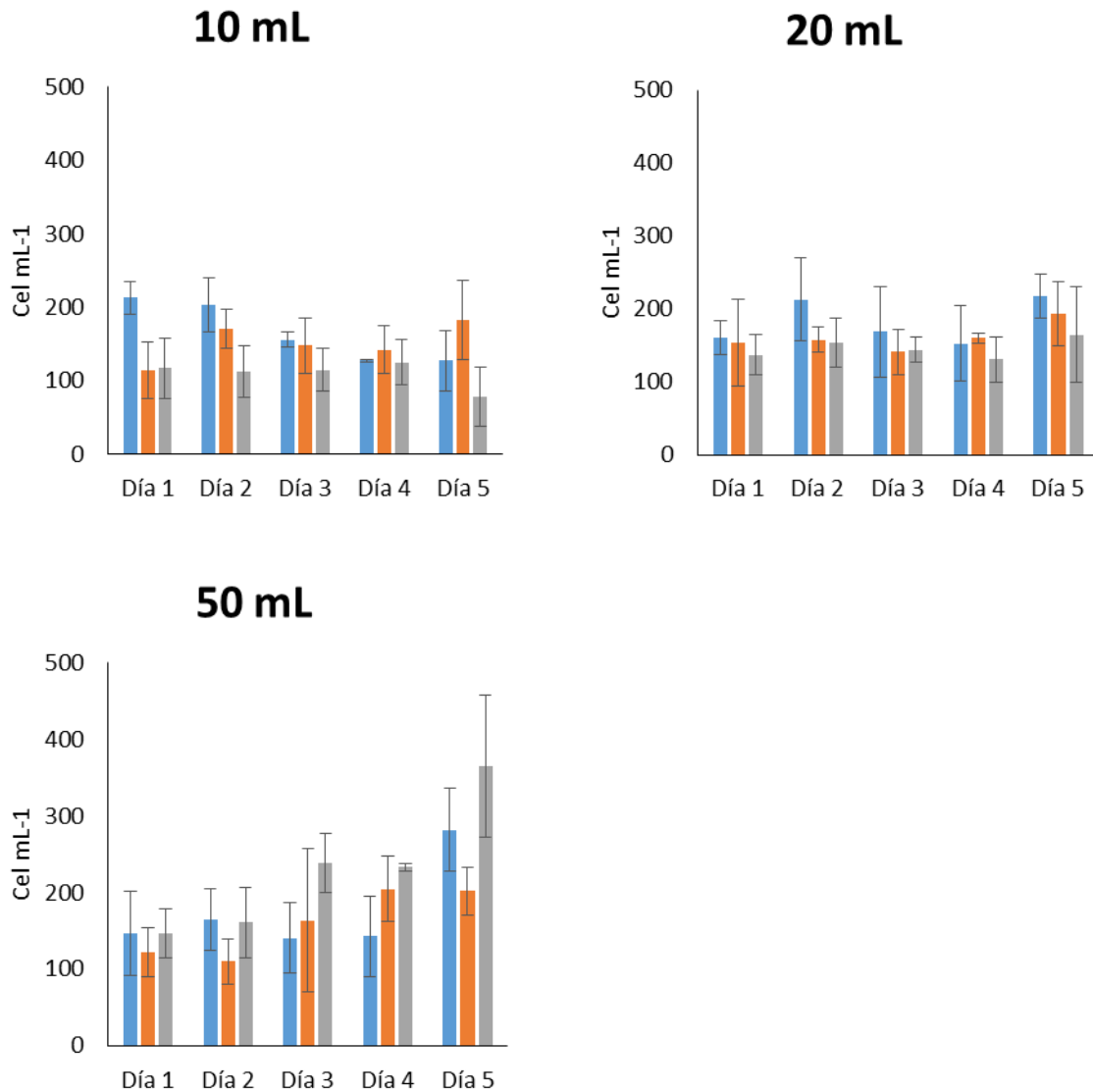


Figura 27. Abundancia de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris: *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar.

### 8.3.6.1.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 10 mL del cultivo filtrado de *G. impudicum* a *G. catenatum* tanto en el tratamiento como en los cultivos controles predominaron las células

individuales (del 86 al 93%) (Fig. 28A´). Al exponer a *G. catenatum* a filtrados de *G. impudicum*, durante todo el experimento se formaron cadenas de 2 a 3 células (del 10 al 18%) y en menor proporción de cadenas de 4 a 6 células (del 3 al 5%).

Al agregar 20 mL del filtrado de *G. impudicum* en la proporción 1:1, *G. catenatum* y sus dos testigos presentaron un patrón similar en la formación de cadenas, un mayor porcentaje de células individuales (más del 70%) (Fig. 28B´), seguido por cadenas de 2 a 3 células (9 a 37%) y las cadenas de 4 a 6 células (7 a 18%). Con excepción del primer día, en el testigo con medio GSe se presentó una mayor cantidad de cadenas de 2 a 3 células (56%).

Al agregar al cultivo de *G. catenatum* 50 mL del filtrado de *G. impudicum* en proporción 1:1, nuevamente en todos los tratamientos se observa un mayor porcentaje de células individuales (más del 60%) (Fig. 28C´), seguido de cadenas de 2 a 3 células (11 a 37%), cadenas de 4 a 6 células (2 a 19%) y cadenas de  $\geq 7$  o más células (2 a 8%).

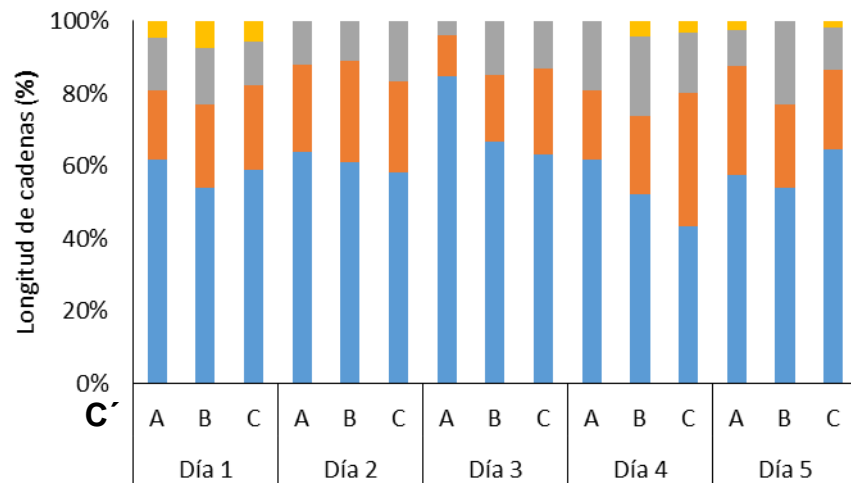
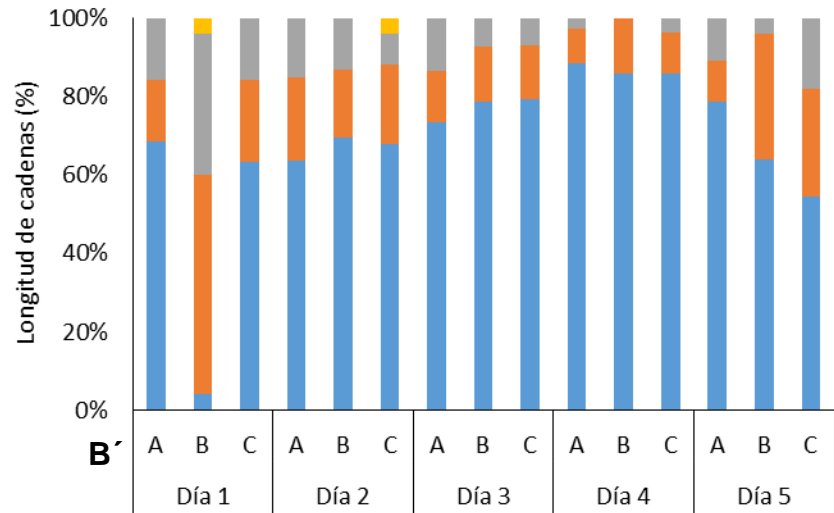
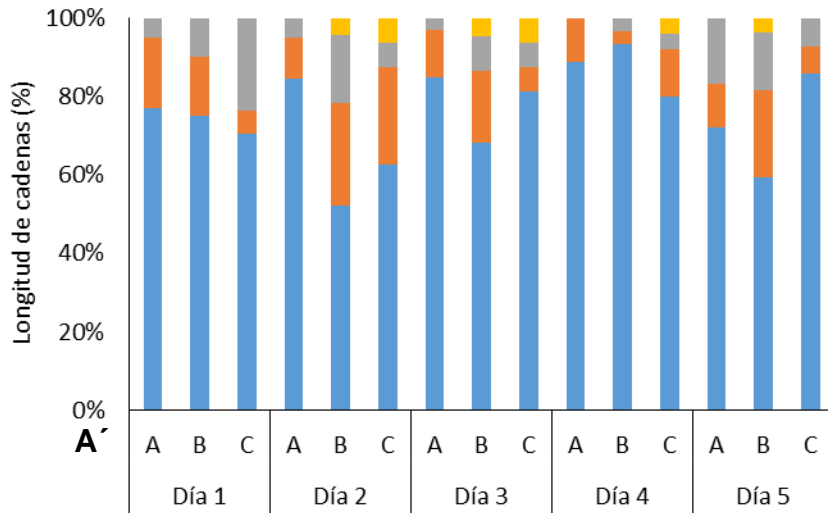


Figura 28. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 10 mL de cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). B') Con 20 mL de cultivos filtrados de *G. impudicum*. C') Con 50 mL filtrados de *G. impudicum*. En proporción 1:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

### 8.3.6.2. Proporción 2:1

Al agregar 20 mL del filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* disminuyó su tasa de crecimiento constantemente, hasta alcanzar una densidad promedio de  $95 \pm 51$  cél mL<sup>-1</sup>, mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto a su testigo al cual se le agregaron filtrados de *G. catenatum* (Fig. 29).

Al agregar 50 mL de los filtrados de *G. impudicum*, la densidad de *G. catenatum* aumentó en las primeras 24 h ( $220 \pm 115$  cél mL<sup>-1</sup>), aunque al segundo día a disminuyó a  $160 \pm 26$  cél mL<sup>-1</sup> y a partir del tercer día empezó a aumentar hasta alcanzar  $254 \pm 134$  cél mL<sup>-1</sup> en el quinto día (Fig. 29).

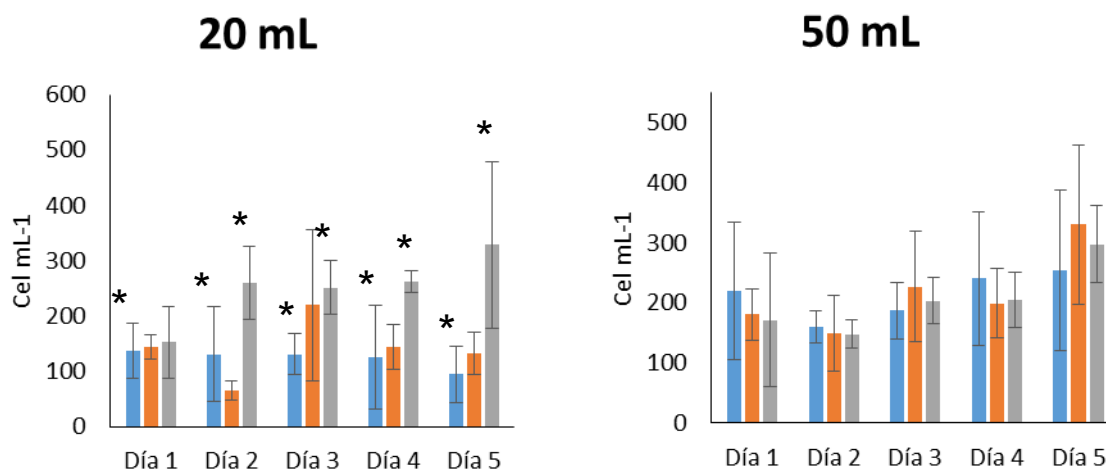


Figura 29. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (GIBACO-1) (20 y 50 mL) en la proporción 2:1. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo.

#### 8.3.6.2.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 20 mL del filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* en proporción 2:1, predominaron las células individuales (de 46 a 85%), las cadenas de 2 a 3 células representaron del 5 al 33%, las cadenas de 4 a 6 células tuvieron un



porcentaje del 4 al 27% y las cadenas de  $\geq 7$  células representaron menos del 7% además solo se observan en el primer, tercer y cuarto día (Fig. 30A').

Con 50 mL de filtrado en la proporción 2:1 *G. catenatum* en todos los tratamientos predominaron las células individuales durante los primeros cinco días del experimento (más del 50%) (Fig. 30B'). En el tratamiento con el cultivo filtrado de *G. impudicum* el porcentaje de células individuales fue mayor (de 44 a 47%), en el tratamiento testigo con medio GSe las células individuales representaron del 44 al 62% y en el tratamiento testigo, al que se le adicionó de su mismo filtrado el porcentaje de células individuales fue del 51 al 64%. Las cadenas de 2 a 3 células estuvieron en un porcentaje del 18 al 22%, las cadenas de 4 a 6 células entre 12 y 30% y las cadenas de  $\geq 7$  células de 6 a 23% con excepción del tercer día donde no se detectaron estas cadenas. Para los tratamientos testigos el porcentaje de cadenas de 2 o más células representó del 35 al 55%.

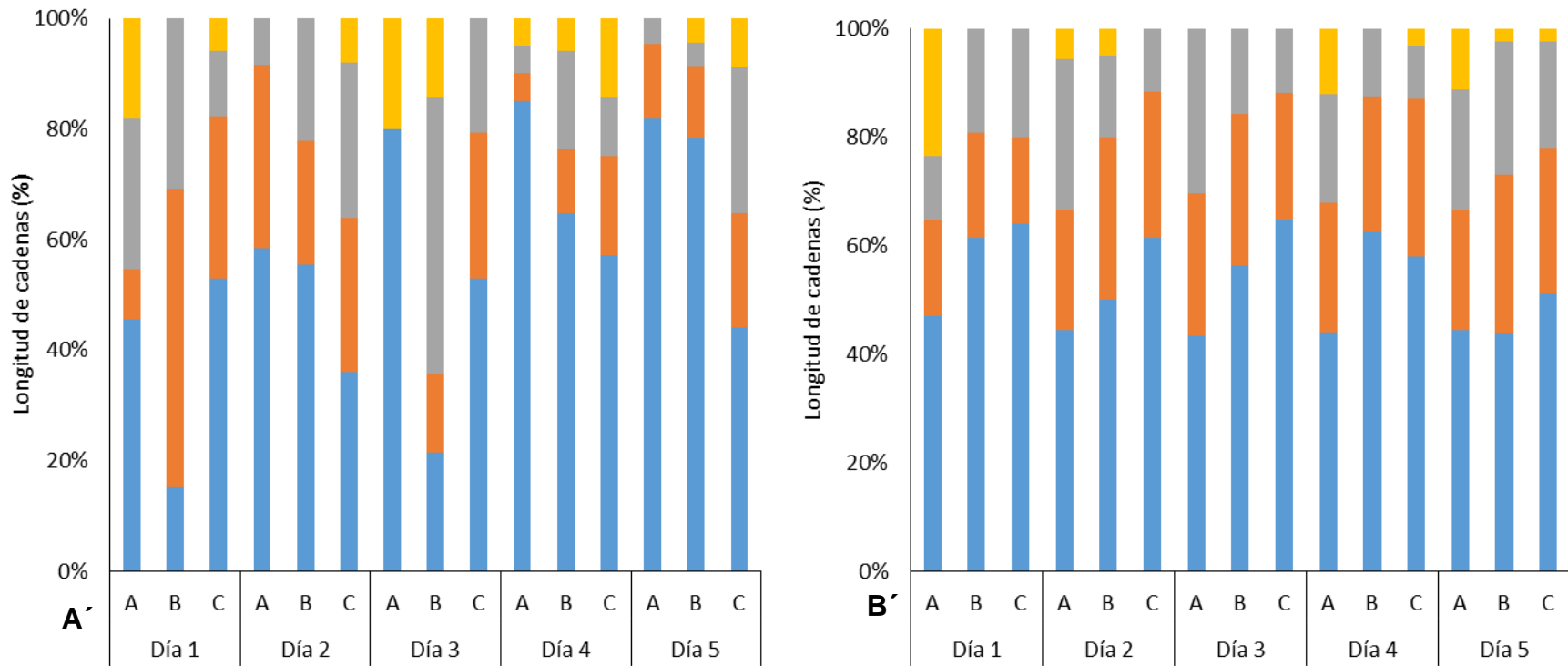


Figura 30. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 20 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum*. B') Con 50 mL de cultivos filtrados de *G. Impudicum* en una proporción 2:1. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

### 8.3.6.3. Proporción 1:2

Al agregar 10 mL del filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* mantuvo su densidad entre  $200 \pm 93$  y  $259 \pm 101$  cél mL<sup>-1</sup>, disminuyendo su densidad en un 50%, siendo significativamente menores que las densidades de los dos testigos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 30).

Al agregar 20 mL de los filtrados de *G. impudicum*, la densidad de *G. catenatum* aumentó en las primeras 24 h alcanzando  $547 \pm 155$  cél mL<sup>-1</sup>, en el segundo día disminuyó su crecimiento a  $466 \pm 144$  cél mL<sup>-1</sup>, a partir de ese día aumentó constantemente su densidad hasta  $671 \pm 266$  cél mL<sup>-1</sup>, ambos tratamientos testigos tienen el mismo patrón de comportamiento que el tratamiento al cual se le agregaron filtrados de *G. impudicum* (Fig. 30).

Al agregar 50 mL del filtrado de *G. impudicum*, *G. catenatum* mantuvo su densidad entre  $263 \pm 132$  y  $337 \pm 85$  cél mL<sup>-1</sup> en todos los días del tratamiento (Fig. 30).

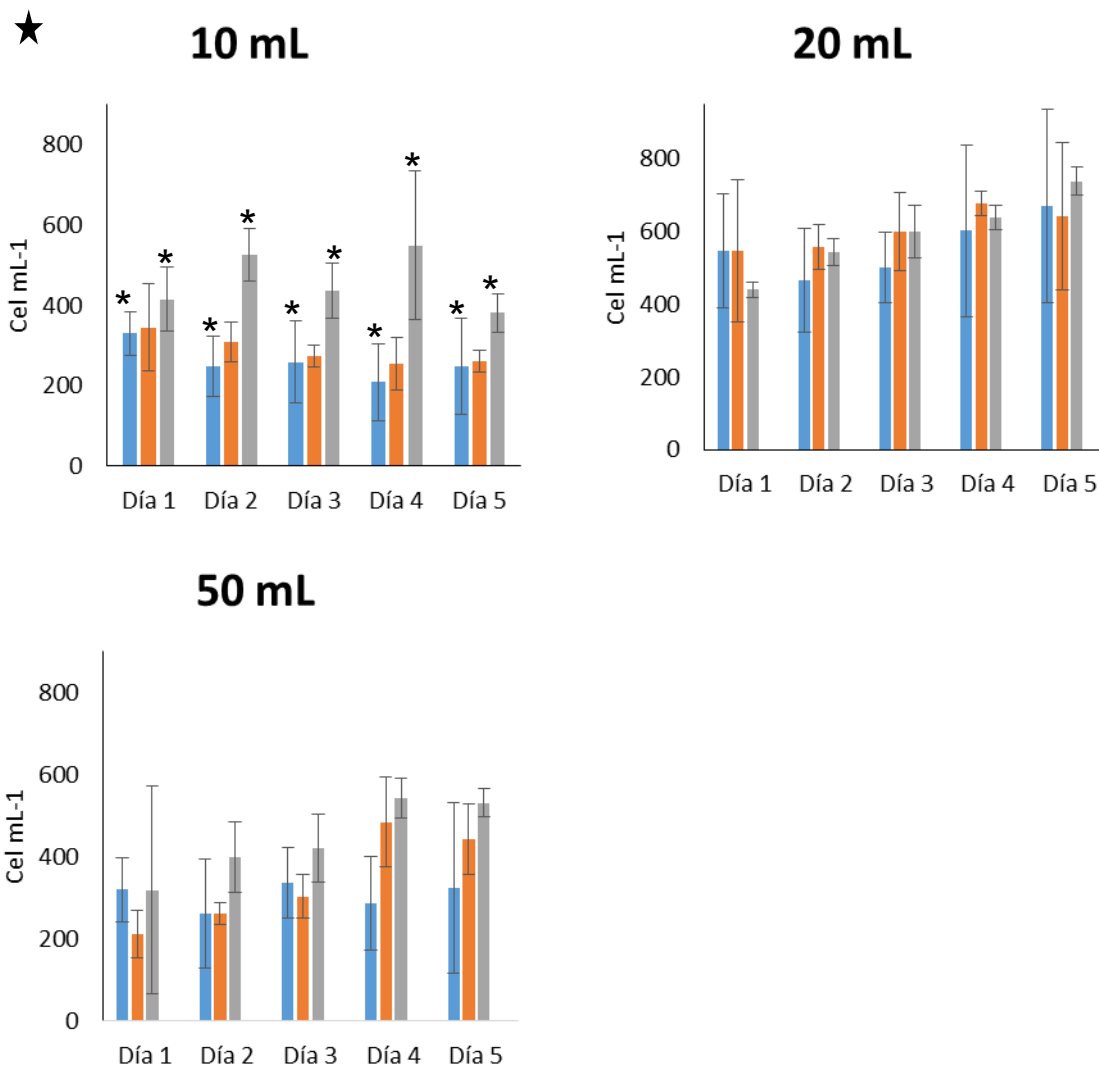


Figura 31. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (10, 20 y 50 mL) en la proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* con cultivos filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar. Asterisco: diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento y su testigo.

### 8.3.6.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 10 mL del cultivo filtrado de *G. impudicum* a cultivos de *G. catenatum* en la proporción 1:2 en todos los tratamientos incluyendo los tratamientos testigos predominan las células individuales (más del 60%) (Fig. 32A') siguiendo las cadenas de 2 a 3 células (de 9 a 17%), cadenas de 4 a 6 células (de 10 a 20%) y cadenas de  $\geq 7$  células (5%).

Con 20 mL del cultivo filtrado en la proporción 1:2 *G. catenatum* en todos los tratamientos presenta una dominancia de células individuales en los cinco días monitoreados (más del 50%) (Fig. 32B'). En todos los tratamientos incluyendo los tratamientos testigos el porcentaje de células individuales es de 55 a 57%, las cadenas de 2 a 3 células representan del 14 al 27%, las cadenas de 4 a 6 células se encuentran en un porcentaje de 18 a 24% y las cadenas de  $\geq 7$  células representan menos del 10%.

Al agregar 50 mL del cultivo filtrado de *G. impudicum* a cultivos de *G. catenatum*, tanto en el tratamiento como en los cultivos controles predominaron las células individuales (del 31 al 57%). Al exponer a *G. catenatum* con el filtrado de *G. impudicum* las cadenas de 2 a 3 células aumentaron de 4 a 19% en los 5 días del experimento, las cadenas de 4 a 6 células mantuvieron un porcentaje entre 21 y 37% y las cadenas de  $\geq 7$  células disminuyeron a 6%. Una tendencia similar en la longitud de cadenas se observa en los dos tratamientos testigos (Fig. 32C').

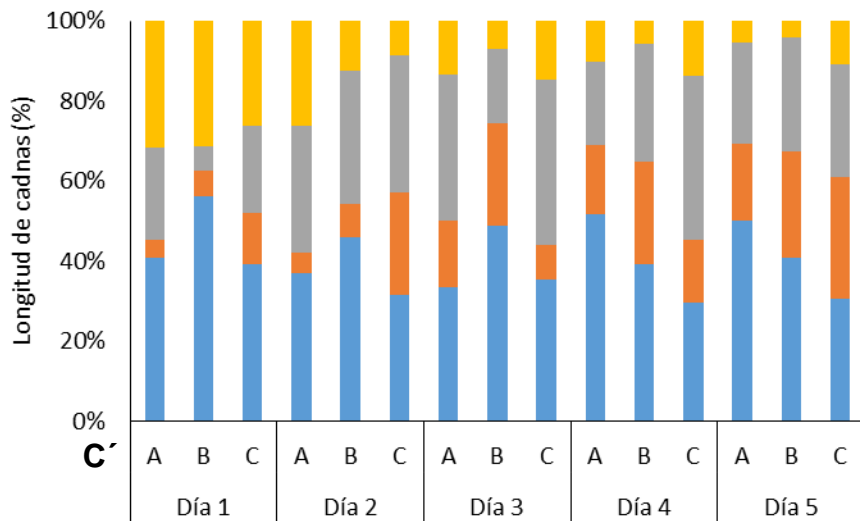
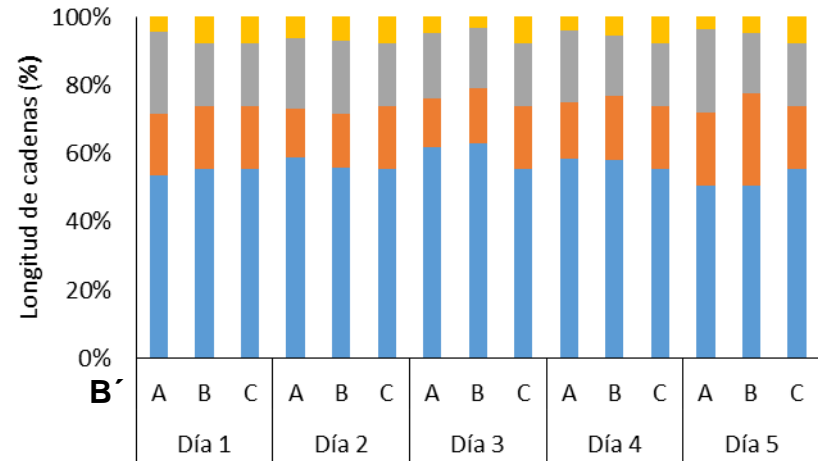
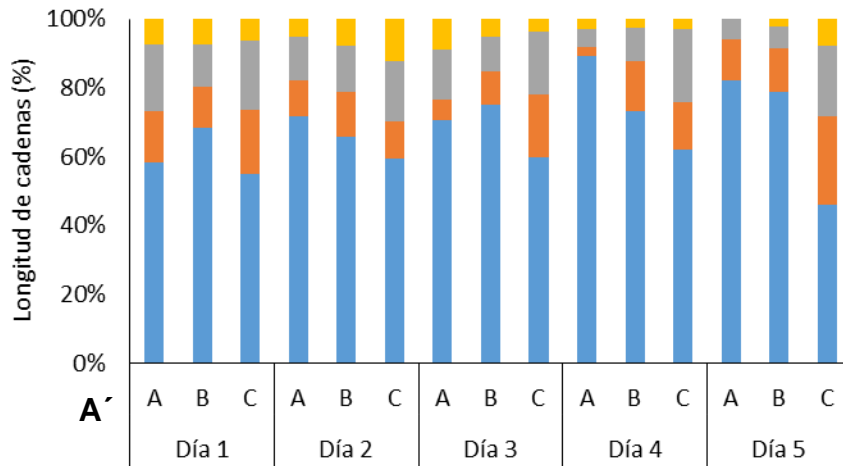


Figura 32. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum*. A') Con 20 mL de cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-1). B') Con 50 mL de cultivos filtrados de *G. impudicum* en una proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum*. B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de ≥ 7 células.

#### 8.3.6.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

En los experimentos de exposición a las diferentes cantidades de cultivo filtrados de *G. impudicum* (10, 20 y 50 mL) y con las diferentes proporciones celulares (1:1, 2:1 y 1:2) se observaron células trapezoidales, células redondeadas, desprendimiento de la membrana plasmática, lisis y muerte celular (Fig. 33).



Figura 33. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *G. impudicum*. a) *G. catenatum* sin cambios morfológicos. b) células redondeada, sin flagelos; c) célula redondeada con deformación en el cíngulo y sulcus. d) lisis celular. e) cadena de *G. catenatum* de cuatro células sin flagelos y desprendimiento de la membrana plasmática. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### **8.3.7. Cultivos bi-algales de *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum***

#### **8.3.7.1. Cultivos con contacto celular**

##### **8.3.7.1.1. Proporción 1:1**

En los cultivos con contacto celular entre *G. impudicum* y *G. catenatum*, proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>) a las 24 h *G. catenatum* decreció a  $176 \pm 29$  cél mL<sup>-1</sup> y la densidad de *G. impudicum* aumentó a  $556 \pm 134$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 34A). *G. catenatum* aumentó hasta aproximadamente  $410 \pm 19$  cél mL<sup>-1</sup> hasta el tercer día, a partir del cuarto día decreció a  $246 \pm 34$  cél mL<sup>-1</sup>. *G. impudicum* aumentó su densidad constantemente hasta el cuarto día ( $1,844 \pm 478$  cél mL<sup>-1</sup>), al quinto día disminuyó a  $1,074 \pm 143$  cél mL<sup>-1</sup>. Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días, alcanzando *G. catenatum* una abundancia promedio de  $2,838 \pm 402$  cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum*  $4,471 \pm 766$  cél mL<sup>-1</sup> el último día del experimento.

##### **8.3.7.1.2. Proporción 2:1**

En la proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>) en los cinco días del tratamiento *G. catenatum* no creció manteniendo su densidad entre  $200 \pm 83$  y  $264 \pm 28$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 34B). *G. impudicum* aumentó su densidad constantemente hasta el tercer día a  $1,548 \pm 160$  cél mL<sup>-1</sup>, en el cuarto día disminuyó discretamente ( $1,426 \pm 114$  cél mL<sup>-1</sup>), aumentando nuevamente en el último día del tratamiento a  $2,984 \pm 294$  cél mL<sup>-1</sup>. Los cultivos testigos de ambos dinoflagelados crecieron durante los 5 días alcanzando el último día *G. catenatum* una abundancia promedio de  $2,838 \pm 402$  cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum* de  $4,471 \pm 766$  cél mL<sup>-1</sup>.

##### **8.3.7.1.3. Proporción 1:2**

En los cultivos con contacto celular en la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>) (Fig. 34C), *G. impudicum* aumentó constantemente su densidad durante el periodo del experimento hasta alcanzar  $2,421 \pm 124$  cél mL<sup>-1</sup>, lo mismo ocurrió con *G. catenatum* que aumentó su densidad hasta  $724 \pm 169$  cél mL<sup>-1</sup>. Los cultivos monoalgales de ambos dinoflagelados también crecieron durante los 5 días, de



estos *G. catenatum* alcanzó una abundancia promedio de  $2,838 \pm 402$  cél mL<sup>-1</sup> y *G. impudicum* de  $4,471 \pm 766$  cél mL<sup>-1</sup>.

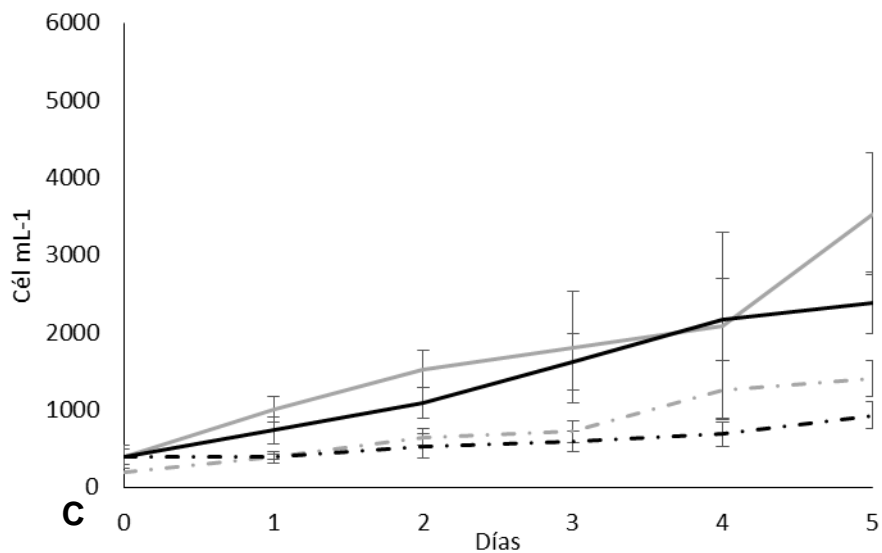
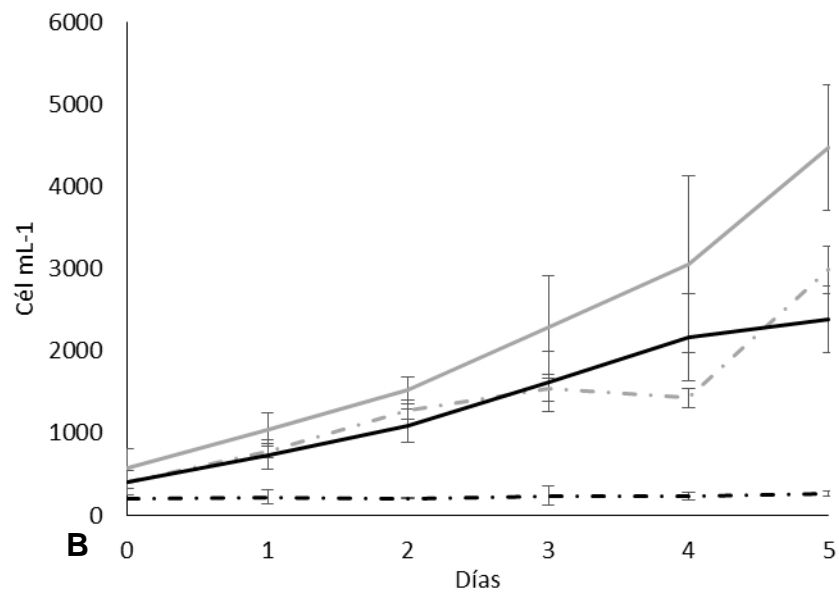
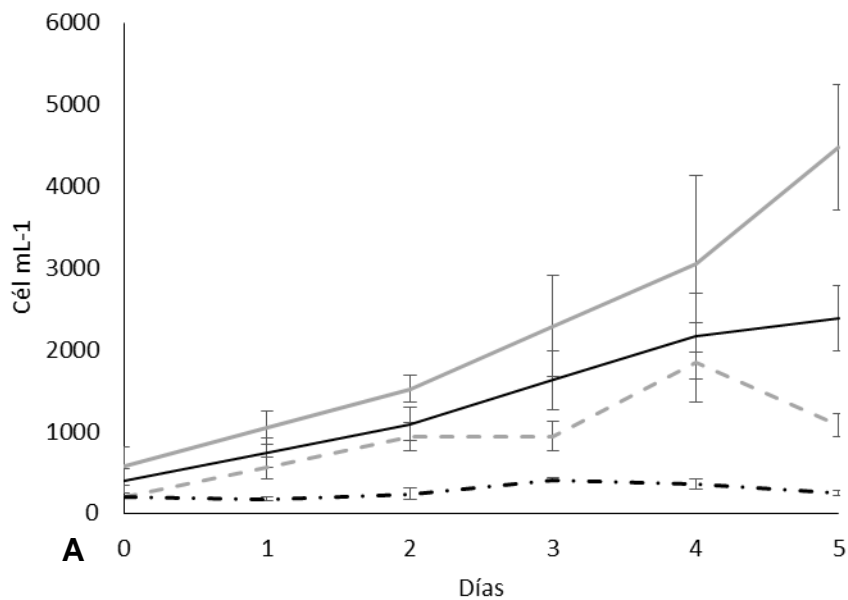


Figura 34. Cultivos con contacto de *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum*. A) proporción 1:1. B) proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Línea continua negra: testigo *G. catenatum*. Línea continua gris: testigo de *G. impudicum*. Línea punteada negra: *G. catenatum* en cultivo con contacto celular. Línea punteada gris: *G. impudicum* en cultivo con contacto celular. Líneas verticales: desviación estándar.

#### **8.3.7.1.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum***

En el tratamiento con contacto celular con *G. impudicum* en la proporción 1:1, el porcentaje de las células individuales de *G. catenatum* aumentaron hasta el cuarto día (30%) disminuyendo a 14% en el quinto. Las cadenas más abundantes fueron las cadenas cortas de 2 a 6 células en todo el tratamiento (Fig. 35A'). En el testigo de siempre predominan las cadenas de  $\geq 7$  células (de 63 a 67%).

Para el tratamiento con proporción 2:1 de *G. impudicum* y *G. catenatum*, al mantener a las dos especies en contacto las células individuales aumentan a lo largo de todo el tratamiento (14 a 39%), el porcentaje de las cadenas de 2 a 3 células también incrementan (9 a 31%), disminuyendo las cadenas de 4 a 6 células (46 a 15%) y de  $\geq 7$  células (31 a 15%) (Fig. 35B'). En el testigo de siempre predominaron las cadenas de  $\geq 7$  células (de 63 a 67%).

En el tratamiento con contacto celular con la proporción celular de 1:2, el porcentaje de las células individuales de *G. catenatum* aumentó a 40% en el 5° día del tratamiento. Las cadenas de 2 a 3 células también aumentaron a 25%, las de 4 a 6 células disminuyeron del 51 al 18%, al igual que las cadenas de  $\geq 7$  células que disminuyeron al 9%. En el cultivo testigo tampoco se observaron cambios importantes en la longitud de las cadenas, siendo de mayor abundancia las  $\geq 7$  células (de 60 a 67%) (Fig. 35C').

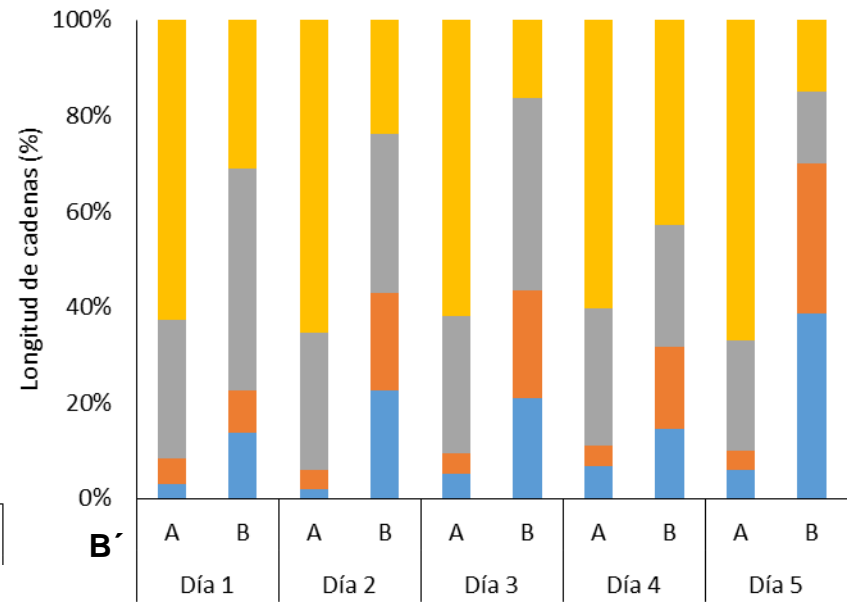
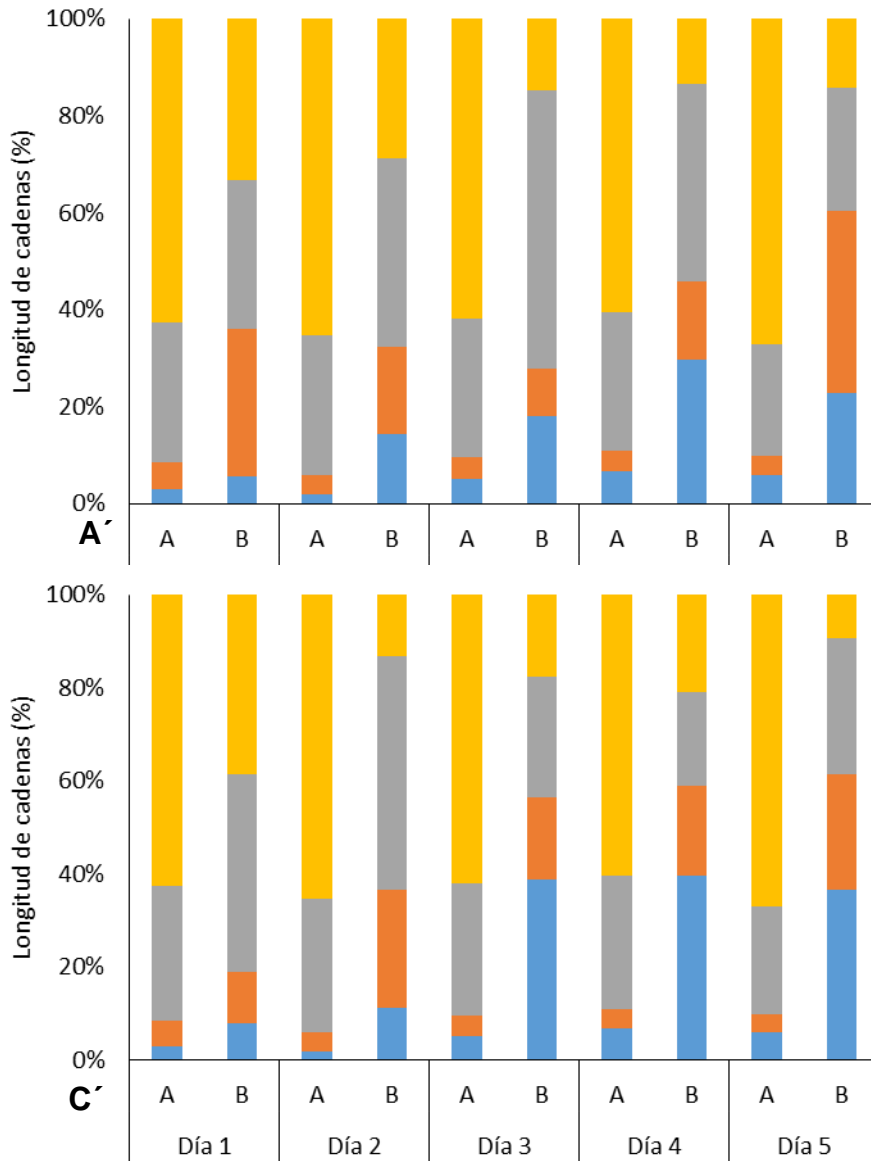


Figura 35. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum* expuesto a *G. impudicum* (GIBACO-1). A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Testigo de *G. catenatum*. B: Cultivo de *G. catenatum* con contacto celular con *G. impudicum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.7.1.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Al estar *G. catenatum* en contacto con células de *G. impudicum* (cepa GIBACO-13) en las diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 1:2), se observaron células semiesféricas, desprendimiento de la membrana plasmática, desarreglos en el cíngulo y sulcus, núcleo prominente, apoptosis y lisis celular (Fig. 36).

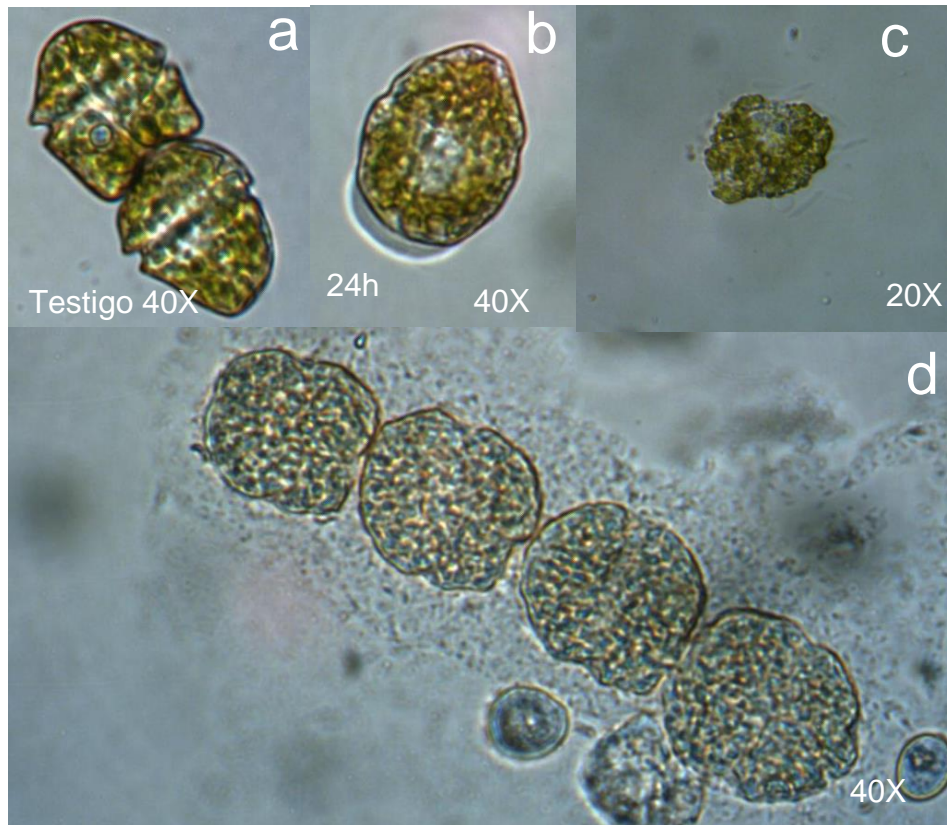


Figura 36. Morfología de *G. catenatum* expuesta a células de *G. impudicum*. a) Control de *G. catenatum* sin cambios morfológicos. b) célula semiesférica con desprendimiento de la membrana plasmática y núcleo prominente. c) lisis células y muerte celular. d) apoptosis. Tomada por: Zumaya-Higuera.

#### 8.3.8. Cultivos sin contacto

##### 8.3.8.1. Proporción 1:1

En los cultivos sin contacto celular entre *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum* en proporción 1:1 ( $200:200 \text{ cél mL}^{-1}$ ), *G. catenatum* mantuvo su

densidad entre  $200 \pm 60$  y  $261 \pm 34$  cél mL<sup>-1</sup> en todo el tratamiento, con densidades menores respecto a su testigo ( $< 380 \pm 70$  cél mL<sup>-1</sup>). *G. impudicum* aumentó constantemente su densidad hasta aproximadamente  $3,296 \pm 500$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 37A).

#### **8.3.8.2. Proporción 2:1**

En los cultivos sin contacto en la proporción 2:1 (400:200 cél mL<sup>-1</sup>) la densidad de *G. catenatum* tanto en presencia de *G. impudicum* como en el testigo mantuvieron una densidad entre  $200 \pm 58$  y  $389 \pm 72$  cél mL<sup>-1</sup>, sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos. En el cultivo monoalgal de *G. impudicum* este alcanzó una abundancia de  $3,120 \pm 195$  cél mL<sup>-1</sup> al quinto día (Fig. 37B).

#### **8.3.8.3. Proporción 1:2**

En los cultivos sin contacto celular en la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>) *G. catenatum* aumentó constantemente hasta alcanzar en el cuarto día una densidad promedio de  $1,228 \pm 414$  cél mL<sup>-1</sup>, disminuyendo su densidad en el último día del tratamiento a  $999 \pm 170$  cél mL<sup>-1</sup>, con una mayor densidad que el testigo ( $500 \pm 228$  a  $592 \pm 10$  cél mL<sup>-1</sup>). *G. impudicum* alcanzó una biomasa al quinto día de  $3,800 \pm 86$  cél mL<sup>-1</sup> (Fig. 37C).

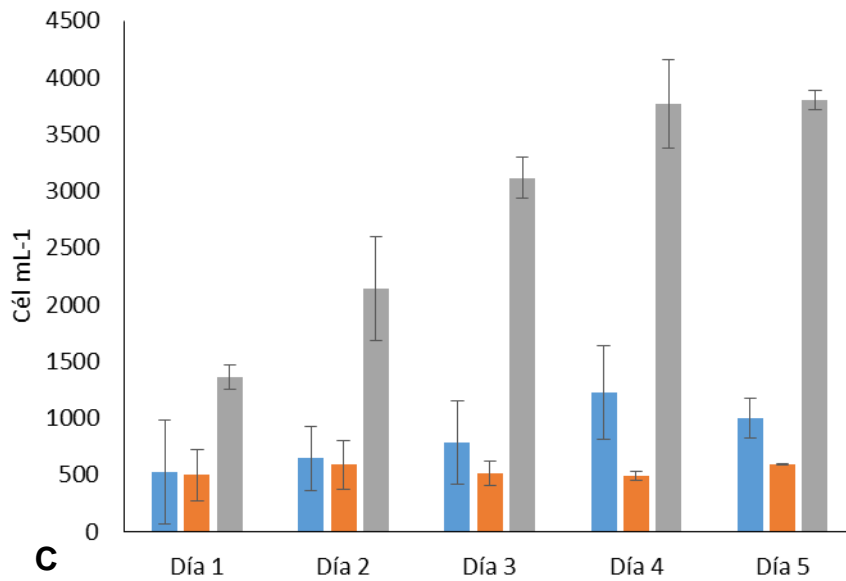
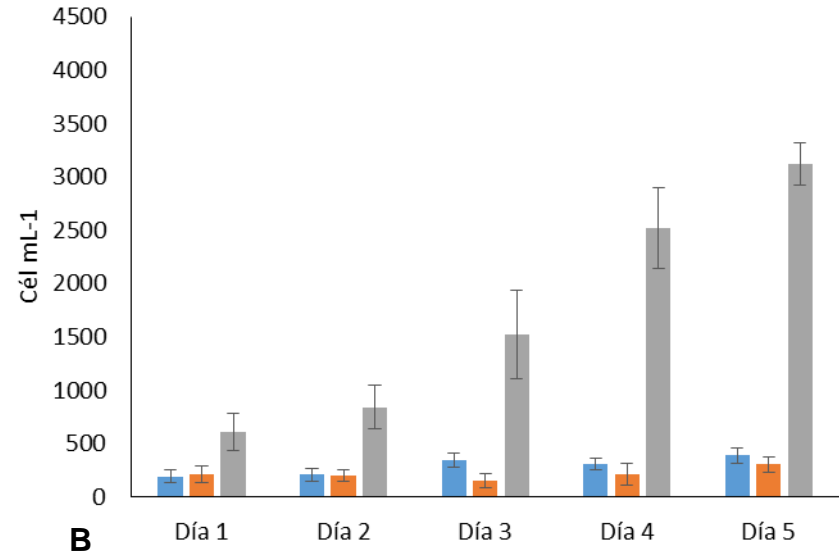
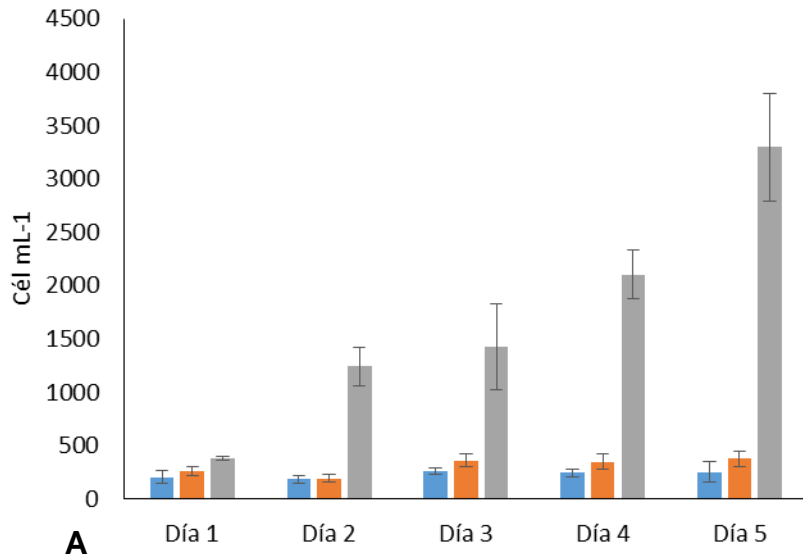


Figura 37. Densidades celulares en cultivos de interacción entre *G. impudicum* (GIBACO-13) y *G. catenatum* sin contacto celular A) Proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: densidad celular de *G. catenatum*. Naranja: tratamiento control de *G. catenatum*. Gris: densidad celular de *G. impudicum*. Líneas verticales: desviación estándar.

#### **8.3.8.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum***

En la proporción 1:1 de los cultivos sin contacto celular entre *G. catenatum* y *G. impudicum* (GIBACO-13) no hubo diferencias en la longitud de cadenas entre el tratamiento y el testigo (Fig. 38A'). Predominaron las células individuales (más del 50%) y aumentaron constantemente durante el tratamiento (de 32 a 71%), las cadenas de 2 a 3 células disminuyeron (de 41 a 22%), al igual que las cadenas de 4 a 6 células que disminuyeron de 41 al 22%. Las cadenas de  $\geq 7$  células no siempre se observaron y representaron solo del 4 al 8% (Fig. 65).

En los cultivos sin contacto de *G. catenatum* y *G. impudicum* en la proporción 2:1 tampoco hubo diferencias en la longitud de cadenas con respecto al testigo (Fig. 38B'). Las cadenas de 2 a 3 células se mantuvieron en una proporción de 24 a 36% y las cadenas de 4 a 6 células con menor porcentaje entre 8 a 20%.

En los cultivos sin contacto celular en la 1:2, tampoco se observaron diferencias importantes respecto al testigo en el patrón de las cadenas (Fig. 38C'). En ambos tratamientos dominaron las células individuales (más del 60%), seguidas por las cadenas de 2 a 3 células (de 20 a 21%), en menor porcentaje las cadenas de 4 a 6 células (de 2 a 10%) y cadenas de  $\geq 7$  células aún en menor proporción (4%).



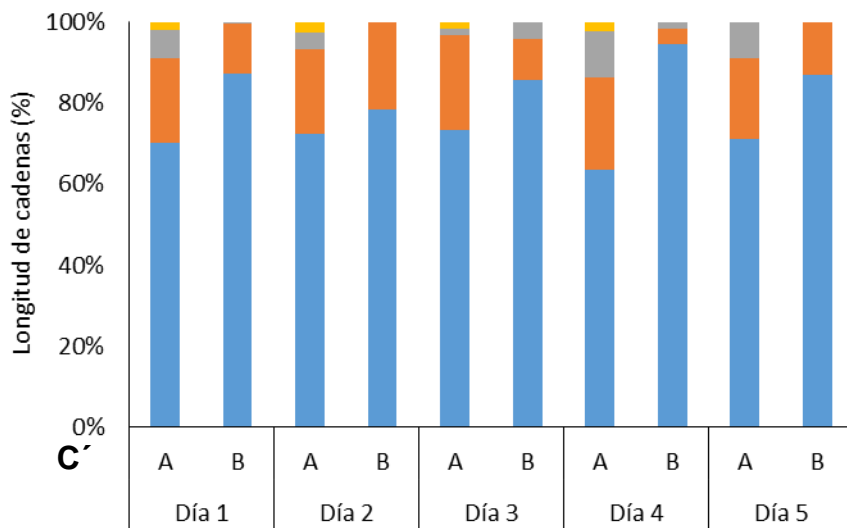
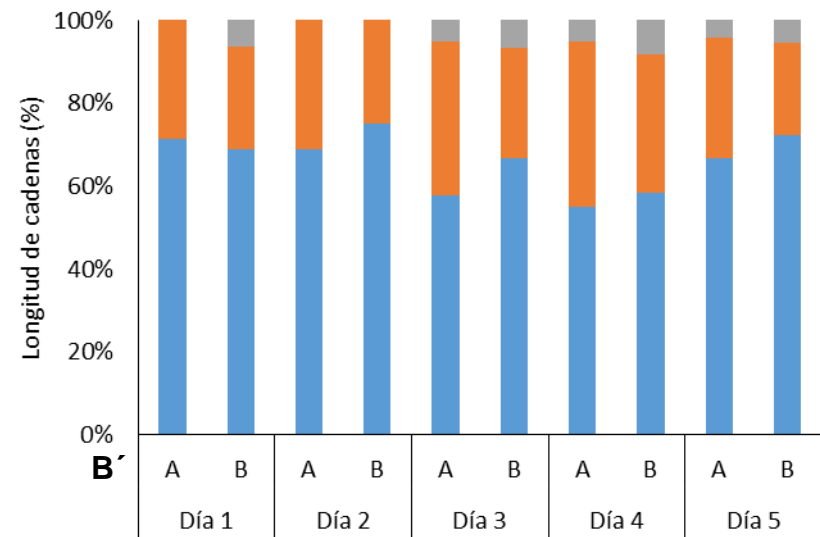
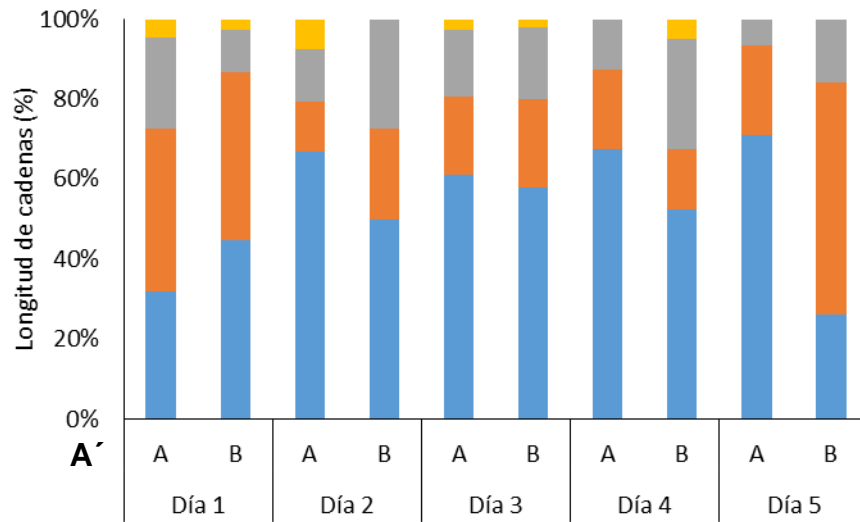


Figura 38. Porcentaje de longitud de cadenas % de *G. catenatum* en cultivo sin contacto celular con *G. impudicum* (GIBACO-13). A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: Cultivo de *G. catenatum* sin contacto celular con *G. impudicum*. B: Testigo de *G. catenatum*. Azul: células individuales. Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.8.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Los principales cambios celulares observados en *G. catenatum* en el experimento sin contacto celular al separarlo por una membrana de *G. impudicum* (GIBACO-13) en las diferentes proporciones celulares (1:1, 2:1 y 2:1), fueron: células esféricas sin flagelos, desarreglos en el cíngulo y el sulcus, desprendimiento de membrana plasmática (Fig. 39).

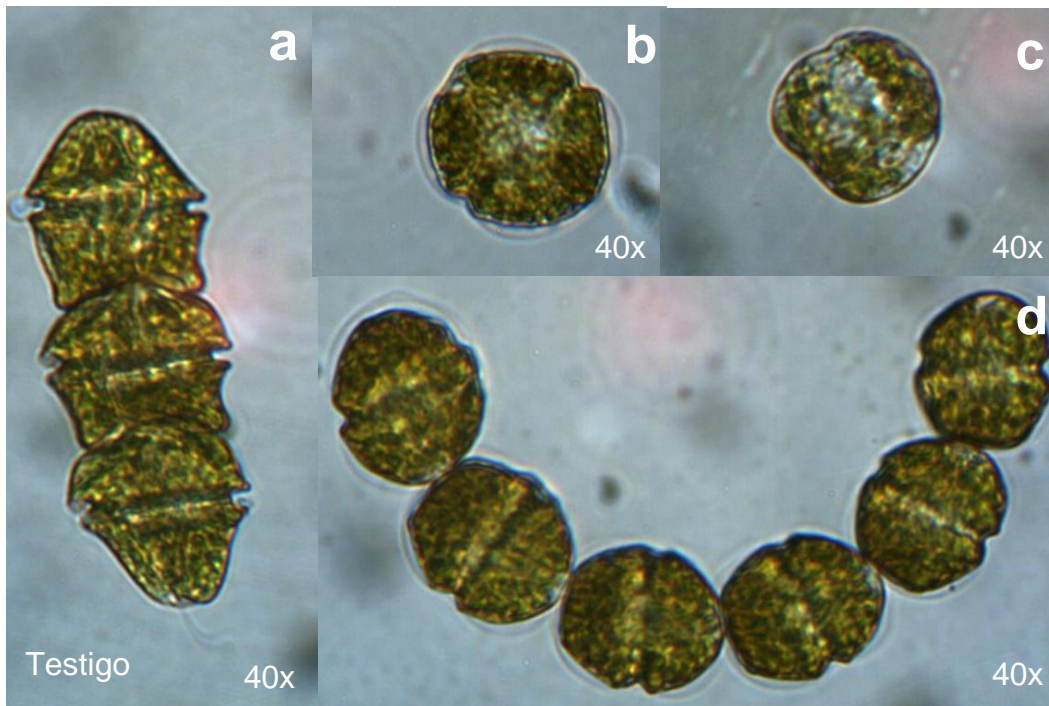


Figura 39. Morfología de *G. catenatum* sin contacto con *G. impudicum* en las tres proporciones (1:1, 2:1 y 1:2). a) forma típica de una cadena de tres células de *G. catenatum* sin cambios morfológico. b y c) célula esférica no se observa el flagelos mostrando desarreglos en el cíngulo y sulcus. d) cadena de seis células mostrando desprendimiento de la membrana plasmática. Tomada por: Zumaya-Higuera.

### **8.3.9. Exposición a filtrados celulares de *G. impudicum***

#### **8.3.9.1. Proporción 1:1**

Al agregar a cultivos de *G. catenatum* cultivos filtrados de *G. impudicum* en proporción 1:1 (200:200 cél mL<sup>-1</sup>), se observó que con 50 mL de *G. impudicum*, *G. catenatum* mantuvo su densidad entre 169 ± 25 a 227 ± 41 cél mL<sup>-1</sup> durante los cinco días del tratamiento (Fig. 40A), sin haber diferencias significativas con los testigos (202 ± 31 a 286 ± 42 cél mL<sup>-1</sup>).

#### **8.3.9.2. Proporción 2:1**

Al agregar 50 mL del filtrado de *G. impudicum* al cultivo de *G. catenatum* este último mantuvo su densidad entre 144 ± 20 cél mL<sup>-1</sup> y 224 ± 55 cél mL<sup>-1</sup> sin haber diferencias significativas con los testigos (Fig. 40B).

#### **8.3.9.3. Proporción 1:2**

Al agregar 50 mL de cultivo filtrado de *G. impudicum* en la proporción 1:2 (200:400 cél mL<sup>-1</sup>) el crecimiento de *G. catenatum* alcanzó una densidad al tercer día de 404 ± 11 cél mL<sup>-1</sup>, en el cuarto día decreció a 288 ± 66 cél mL<sup>-1</sup> y en el quinto día del tratamiento aumentó a 414 ± 146 cél mL<sup>-1</sup> superando la densidad del tratamiento testigo con medio GSe (de 259 ± 56 cél mL<sup>-1</sup> a 404 ± 95 cél mL<sup>-1</sup>), pero sin diferencias significativas (Fig. 40C).

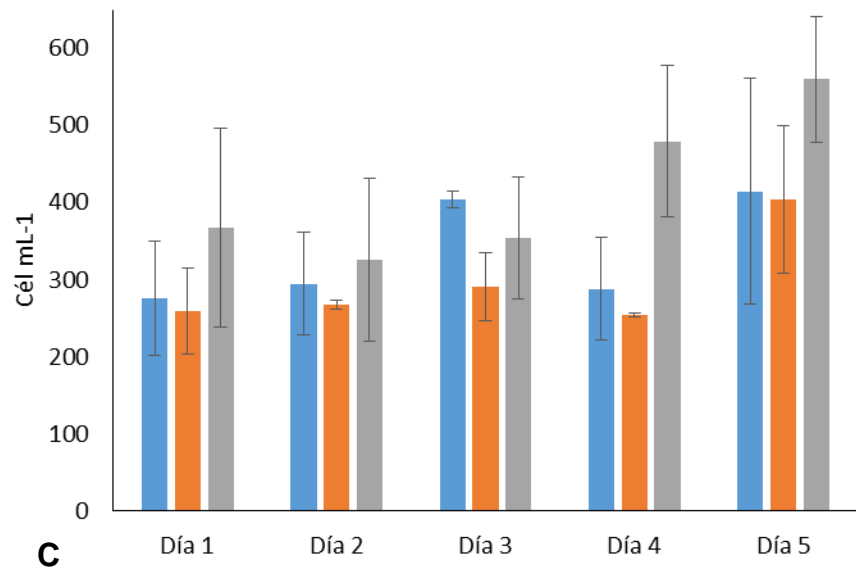
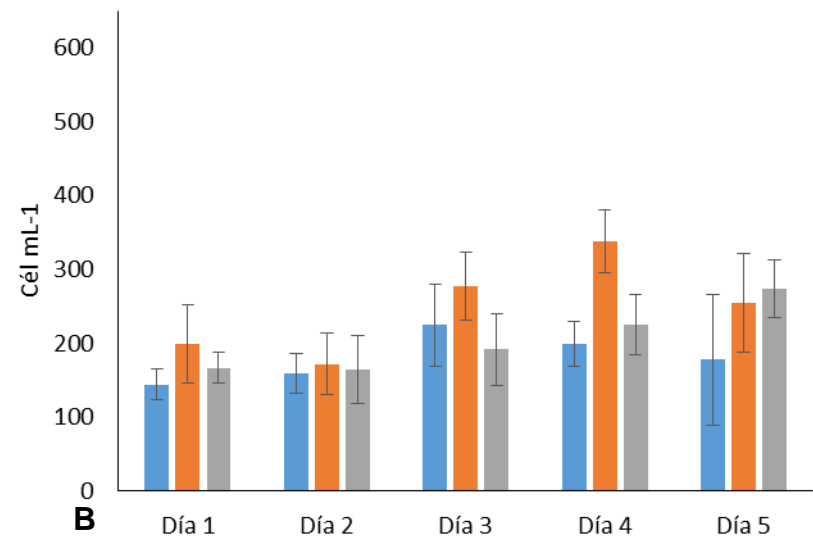
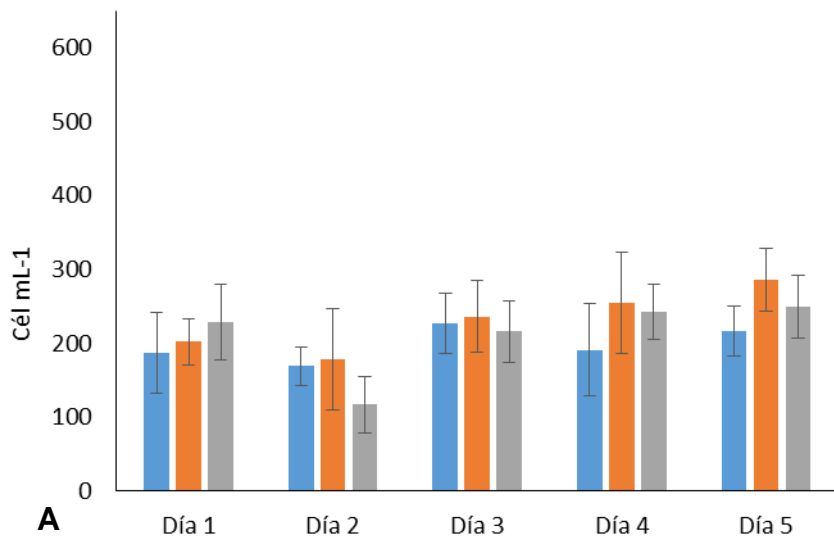


Figura 40. Abundancia celular de *G. catenatum* expuesto a filtrados celulares de *G. impudicum* (GIBACO-13) (50 mL) en la A) proporción 1:1. B) Proporción 2:1. C) Proporción 1:2. Azul: *G. catenatum* en filtrados de *G. impudicum*. Naranja: *G. catenatum* en medio GSe. Gris: *G. catenatum* con su mismo filtrado. Líneas verticales: desviación estándar.

### 8.3.9.3.1. Longitud de cadenas de *G. catenatum*

Al agregar 50 mL del filtrado de *G. impudicum* (GIBACO-13) al cultivo de *G. catenatum* tanto en el tratamiento como en los testigos predominaron las células individuales (del 55 al 81%), seguidas de las cadenas de 2 a 3 células (del 14 al 32%), las cadenas de 4 a 6 células (del 2 a 21%) y cadenas de  $\geq 7$  células solo se observaron en el tercer y cuarto día para *G. catenatum* (4%) (Fig. 41A').

Al agregar 50 mL del filtrado de *G. impudicum* a *G. catenatum* en proporción 2:1 en todos los tratamientos predominaron las células individuales disminuyendo su porcentaje con los días (del 82 a 67%), seguidas de las cadenas de 2 a 3 células (más de 31%) y las cadenas de 4 a 6 células con una proporción menor del 8%. En los dos testigos se observaron cadenas de  $\geq 7$  células con un porcentaje menor a 4% (Fig. 41B').

Al agregar 50 mL de cultivo filtrado de *G. impudicum* en la proporción 1:2 a un cultivo de *G. catenatum* (Fig. 41C'), las células individuales representaron del 47 hasta el 74%, las cadenas de 2 a 3 células disminuyeron su proporción de 41% a 17% en el tercer día aumentando nuevamente en el cuarto y quinto día a 43%. Las cadenas de 4 a 6 células aumentaron del 2 al 8% y las cadenas de  $\geq 7$  células se observaron en el tercer y último día del tratamiento con una proporción menor al 3%. En los dos tratamientos testigos también predominaron las células individuales (del 43 a 61%), seguidas de las cadenas de 2 a 3 células (del 27 a 47%), cadenas de 4 a 6 células con una proporción menor a 19% y en ocasiones se observaron cadenas de  $\geq 7$  células con una proporción menor al 4%.

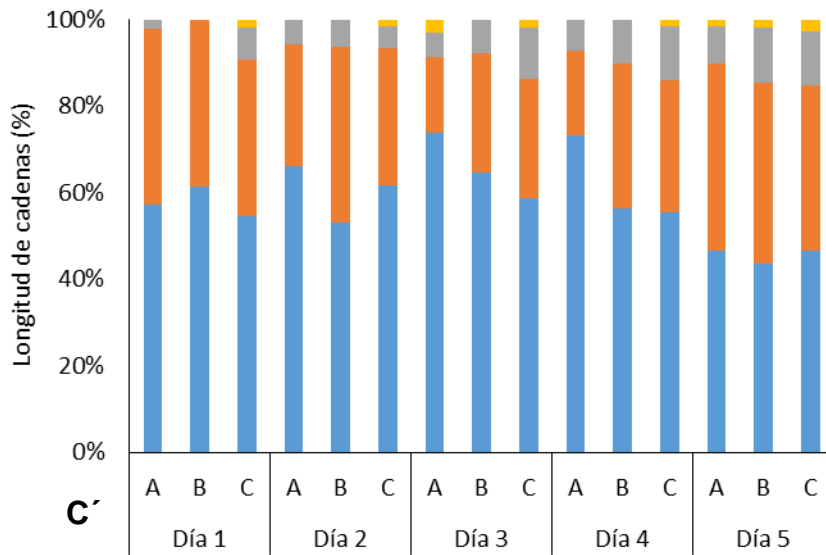
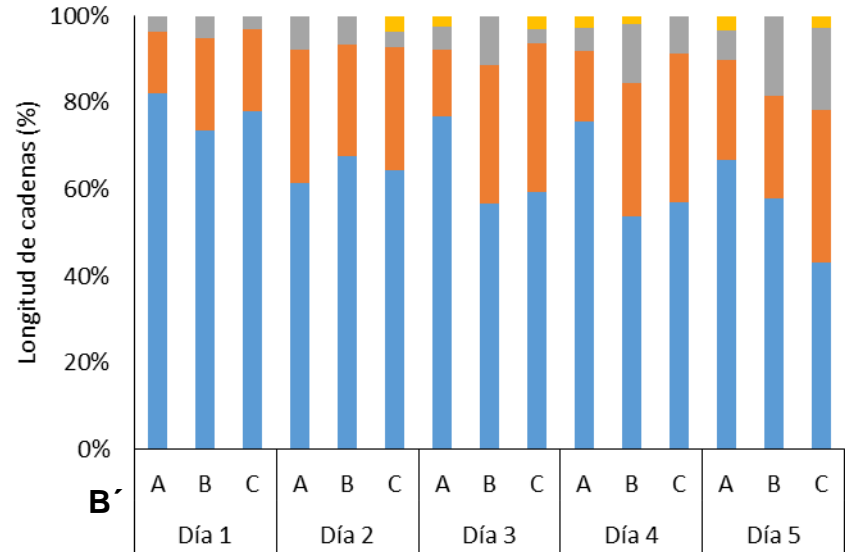
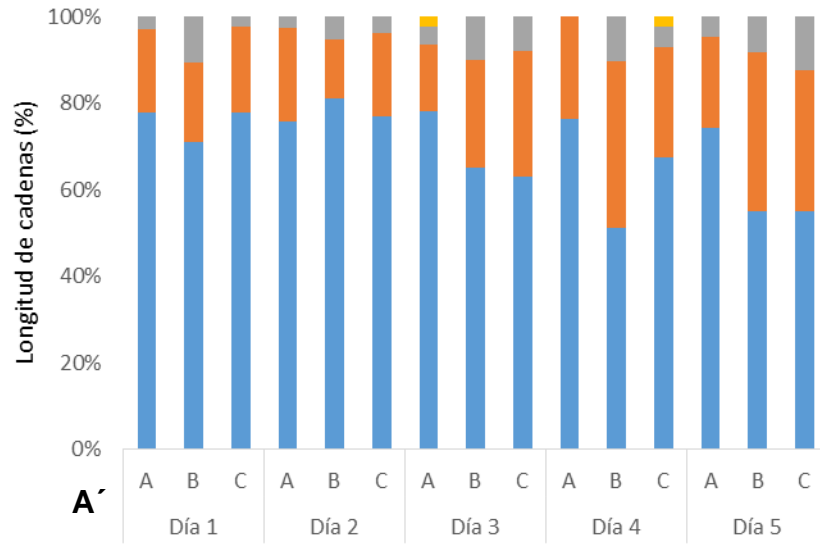


Figura 41. Porcentaje de longitud de cadenas de *G. catenatum* con cultivos filtrados de *G. impudicum* (GIBACO-13) (50 mL). A') Proporción 1:1. B') Proporción 2:1. C') Proporción 1:2. A: *G. catenatum* con cultivo filtrado de *G. impudicum* (GIBACO-13). B: *G. catenatum* sin filtrado. C: *G. catenatum* con su propio filtrado. Azul: células individuales, Naranja: cadenas de 2 a 3 células. Gris: cadenas de 4 a 6 células. Amarillas: cadenas de  $\geq 7$  células.

#### 8.3.9.4. Cambios morfológicos de *G. catenatum*

Al adicionar 50 mL de filtrados celulares de *G. impudicum*, a cultivos de *G. catenatum* en las diferentes proporciones celulares (1:1, 2:1 y 1:2), se observaron células esféricas, sin flagelo, deformación en el cíngulo y sulcus, núcleo evidente y lisis celular (Fig. 42).

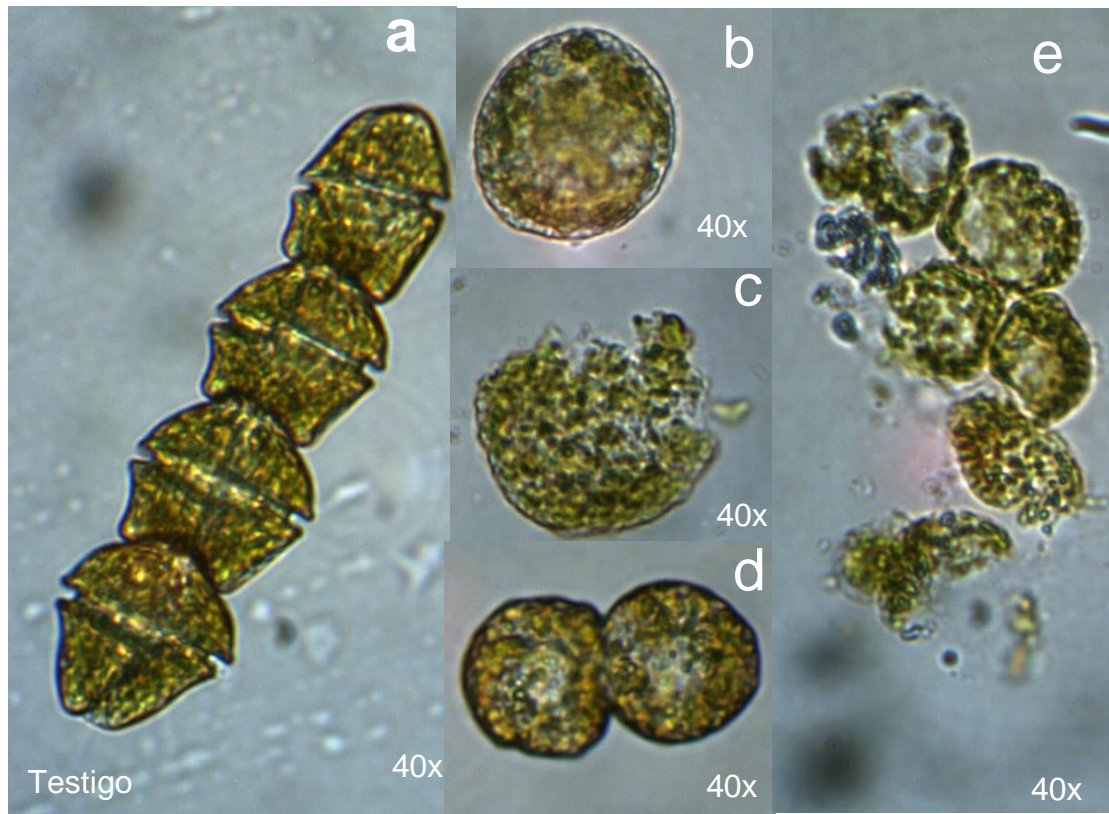


Figura 42. Morfología de *G. catenatum* al exponerlo a cultivos filtrados de *G. impudicum*. a) cadena de cuatro células de *G. catenatum* sin cambios. b) célula esférica. c) lisis celular. d) cadena de dos células redondeadas mostrando núcleo evidente, desarreglos en el cíngulo, sulcus y pérdida del flagelo. e) cadena de seis células mostrando núcleo evidente, deformación de la cadena, desarreglos en el cíngulo, sulcus y lisis celular. Tomada por: Zumaya-Higuera.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Identificación molecular de las cepas de *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum*.

Al utilizar la taxonomía clásica para identificar morfológicamente las especies de este trabajo, se observó que existen algunas similitudes entre ellas que dificulta su clasificación (Fraga *et al.*, 1995) por ejemplo, *C. polykrikoides* es morfológicamente similar a *G. catenatum* y *G. impudicum* y otras especies de *Cochlodinium*. También se sabe que *C. polykrikoides* es similar a *C. fulvescens* ya que ambas especies forman cadenas de hasta 4 células y tienen un núcleo y una mancha oscura (estigma) situada en la parte dorsal anterior de la célula (Iwataki *et al.*, 2007; Matsuoka *et al.*, 2008). *C. polykrikoides* se caracteriza por mostrar células más alargadas que anchas, epicono de tipo cónico, hipocono bilobulado, cíngulo profundo que rodea la célula entre 1.8-1.9 veces. El sulcus se encuentra situado por debajo de éste, presenta en vista dorsal una estigma de color rojo en la parte posterior del epicono, el núcleo se encuentra localizado anteriormente, se puede presentar en cadenas de 2, 4 y raramente de 8 células, puede llegar a medir de largo 56-60  $\mu\text{m}$  y de ancho 39-42  $\mu\text{m}$  (Maciel-Baltazar & Hernández-Becerril, 2013). Mientras que *C. fulvescens* se caracteriza por mostrar células redondeadas y de forma elipsoidal. El cíngulo rodea la célula dos veces y el sulcus se desplaza hacia abajo aparte del cíngulo. Un cuerpo pigmentado rojizo naranja se encuentra en lado dorsal del epicono. El núcleo es esférico y se localiza en la parte anterior del epicono. Presenta cloroplastos granulares y distribuidos a lo largo del cíngulo y periferia de la célula (Gárate-Lizárraga, 2014), y sus medidas son similares a las de *C. polykrikoides*, midiendo 32-55  $\mu\text{m}$  de largo y 25- 38  $\mu\text{m}$  de ancho (Iwataki *et al.*, 2007).

Por otro lado Fraga *et al.* (1995) comentan que *G. catenatum* puede llegar a confundirse con *G. impudicum* especialmente cuando se fija en lugol, Hallegraeff y Fraga (1996) y Cho *et al.* (2001) también mencionan que *C. polykrikoides* puede confundirse con *G. catenatum*, aunque esta generalmente es más pequeña que *G. catenatum*. Además, *G. impudicum* presenta un hipocono ligeramente más pequeño que el epicono, y la célula es convexa en vista lateral, en las células de



*G. catenatum* los lados del hipocono son cóncavos, el cíngulo es afilado y forman un ala gruesa mientras que en *G. impudicum* los lados del hipocono son lisos. *G. impudicum* cuenta con un cingulum distinto con desplazamiento 1.3-1.4 de longitud total de la célula. El sulcus es estrecho, penetrando entre el epicono hasta el ápice, donde gira en sentido contrario viéndolo desde el ápice (Fraga *et al.*, 1995). Se puede encontrar como célula individual o puede formar cadenas de hasta 8 células (Fraga *et al.*, 1995), aunque generalmente de 4 células. Mide entre 14 y 37  $\mu\text{m}$  de longitud y 16 y 32  $\mu\text{m}$  de ancho (Fraga *et al.*, 1995).

Ante la dificultad de identificar morfológicamente a *G. impudicum* y a las especies de *Cochlodinium* sp., se optó por el uso de herramientas moleculares, lo cual fue un complemento para reforzar o dilucidar la identificación que se había hecho con base a la morfología de las células. Esto se llevó a cabo a través de la amplificación de la región 28S del LSU ADN ribosomal, a partir de cultivos monoalgales (Blackburn *et al.*, 1989; Hallegraeff *et al.*, 2003; Iwataki *et al.*, 2007, 2008; Matsuoka *et al.*, 2008). Utilizando la secuenciación de los productos del PCR y el análisis BLAST se confirmó que las morfo-especies *C. polykrikoides* y *G. impudicum* tuvieron una identidad del 100% con las secuencias de sus con-específicos en la base de datos de GenBank. La cepa CPEPAZ-11 se agrupó con 100% de similitud con secuencias de *C. polykrikoides*. GIBACO-13 se agrupó con un 89% de similitud con la secuencia de *G. impudicum* de Hong kong; esta secuencia es el primer reporte de esta especie para las costas mexicanas. La cepa GIBACO-1 por sus características morfológicas y una secuencia preliminar de la región ITS, se había identificado como *C. cf. fulvescens*, al amplificar un fragmento de la región 28S de ADN ribosomal y realizar el análisis de la secuencia se tuvo un 100% de similitud con *G. impudicum*, para descartar algún problema de contaminación por la inadecuada manipulación de la muestra se inició un nuevo cultivo de estas cepas, se volvió a extraer ADN, se amplificó nuevamente la región S, coincidiendo y confirmando su identificación molecular. La incongruencia entre la identificación morfológica y la identificación molecular en dinoflagelados ha sido un problema recurrente (Gómez *et al.*, 2011). En este caso en particular es conveniente profundizar en el análisis morfológico para distinguir

los caracteres que distinguen a las especies. Llama la atención la similitud de las secuencias de *G. impudicum* de Bahía de Concepción con la reportada en GenBank de Hong Kong a tal grado que forman un subclado, sugiriendo una mayor relación filogenética entre ellas. Será conveniente realizar trabajos para determinar cuales si también comparten características morfológicas que además las separe del resto de sus con-específicas.

## **9.2. Tasas de crecimiento de cultivos monoespecíficos de los dinoflagelados *C. polykrikoides*, *G. impudicum* y *G. catenatum*.**

La tasa de crecimiento es un parámetro importante en la dinámica de las poblaciones y en la ecología del fitoplancton, ya que integra numerosos procesos bioquímicos que dan un único resultado, generalmente definido en términos de cambios en el número celular o la biomasa (Tillmann *et al.*, 2009). Las curvas de crecimiento obtenidas en este trabajo muestran diferente número de días para aclimatarse e iniciar y finalizar su fase de crecimiento exponencial, sin embargo la tasa de crecimiento de *C. polykrikoides* y *G. impudicum* (GIBACO-1 y GIBACO-13) fueron muy similares (0.11, 0.12, 0.13 div·día<sup>-1</sup> respectivamente), siendo menores a las de *G. catenatum* (0.20 div·día<sup>-1</sup>). Se han reportado tasas de crecimiento mayores para *C. polykrikoides* (0.39 div·día<sup>-1</sup>) utilizando medio GSe y f/2+Se a 23°C ± 2°C, ciclo de luz/oscuridad 12:12 hrs y 75  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica con salinidad de 36 ups (Dorantes-Aranda, 2006) y para *G. impudicum* con diferentes fuentes de fosfato tiene tasas de crecimiento entre 0.31 y 0.41 div día<sup>-1</sup>. En *G. catenatum* se han reportado tasas de crecimiento entre 0.07 y 0.82 div·día<sup>-1</sup> en medio GSe, en condiciones similares a las de este trabajo (Band-Schmidt *et al.*, 2010; Hallegraeff *et al.*, 2012; Durán-Riveroll, 2014). Lo anterior sugiere que la tasa de crecimiento puede variar entre cepas de la misma especie. En este trabajo se mantienen las mismas condiciones de cultivo para los todos los diferentes tratamientos los cuales fueron descritos en la metodología; en los trabajos en donde se evalúa la temperatura, salinidad y medio de cultivo no se observan diferencias significativas (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2006; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012; Durán-Riveroll, 2014). *G. catenatum* se caracteriza por tolerar amplios

intervalos de temperatura (11.5 – 30 °C) y una salinidad entre 28 y 38 ups (Band-Schmidt *et al.*, 2004).

### **9.3. Efecto de *C. polykrikoides* y *G. impudicum* en el crecimiento y morfología de *G. catenatum*.**

Se obtuvieron evidencias del papel que juegan las interacciones bióticas como la alelopatía y la competencia, cuando especies como *C. polykrikoides* y *G. impudicum* al estar en contacto celular o mediante la liberación de metabolitos al medio, afectan negativamente al dinoflagelado tóxico *G. catenatum*, sugiriendo que ambas especies podrían influir en el declive de florecimientos algales de *G. catenatum* inhibiendo su crecimiento y causando cambios en su morfología.

Se ha demostrado que la densidad celular inicial de dos especies de fitoplancton es crucial para determinar la interacción en un cultivo bi-algal (Uchida *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2011), ya que el efecto alelopático de una especie sobre otra se manifiesta cuando una especie depende de la densidad de otra (Maynard-Smith, 1974; Sato *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005).

La intensidad y la rapidez de la inhibición del crecimiento entre cepas de dinoflagelados pueden determinarse al realizar cultivos bi-algales que permitan el contacto celular entre las especies de interés, empleando diferentes proporciones celulares. Tang y Gobler (2010) mostraron que el efecto de los aleloquímicos depende en gran medida de la población inicial de la comunidad. En el presente estudio esto fue más notorio con *C. polykrikoides* en el tratamiento con la proporción 2:1, donde la densidad celular de *G. catenatum* disminuyó en un 90% al segundo día de haber contacto celular entre ambas especies. En las proporciones 1:1 y 1:2 también se observó una disminución importante en el crecimiento de *G. catenatum* después de 5 días de cultivo. Los cultivos bi-algales de *Gymnodinium impudicum* con *G. catenatum* en todas las proporciones probadas también causaron una mortalidad del 50% en *G. catenatum*, siendo menor que la causada por *C. polykrikoides*.

El efecto del contacto celular entre dinoflagelados ha sido documentado previamente por Yamasaki *et al.* (2011), los autores expusieron células de

*Heterocapsa circulariscuama* a *Prorocentrum dentatum* en un mismo cultivo; observando que la densidad celular de *H. circulariscuama* disminuyó hasta un 50% después de 5 h; cuando fueron separados por una barrera física permeable, no se encontró disminución de su densidad, concluyendo que la mortalidad de *H. circulariscuama* depende del contacto celular. En trabajos anteriores de alelopatía con *G. catenatum*, Fernández-Herrera *et al.* (2016) reportaron una mortalidad de 100% en *G. catenatum* al estar en contacto con células de *Chattonella marina* var. *marina* en una proporción 2:1 en 72 h. Ramírez-Rodríguez (2015) observó que al exponer a cepas de *G. catenatum* (500 cél mL<sup>-1</sup>) a una comunidad bacteriana (9000 cél mL<sup>-1</sup>) en proporción 1:2, se observan diferencias en el crecimiento del dinoflagelado; además observó dos patrones de comportamiento dependiendo de la cepa: el primero fue la obtención de densidades celulares altas y el segundo fue la inhibición en el crecimiento de *G. catenatum*, dando lugar a un descenso de más del 90% de la abundancia, así como a diferencias en el perfil de toxinas paralizantes y cambios en la morfología de la célula. En nuestro trabajo fue evidente que el contacto celular, particularmente con *C. polykrikoides* afecta el crecimiento de *G. catenatum* causando una mortalidad de más del 90% en menos de 48 h.

Al separar a las especies de dinoflagelados mediante una membrana permeable no se observó efecto alguno en el crecimiento que pudiera asociarse a la presencia de metabolitos liberados por *C. polykrikoides* o de *G. impudicum* en las tres proporciones probadas, ya que la densidad celular de *G. catenatum* fue similar a la del tratamiento testigo. Estos resultados sugieren que no existe un efecto alelopático entre estas especies de dinoflagelados, o por lo menos no se observa algún efecto en el crecimiento en las proporciones probadas, sin embargo, sí se observaron cambios en la morfología de las células demostrando que si hay aleloquímicas pero en concentraciones bajas para inhibir su tasa de crecimiento.

Tang & Gobler (2010) observaron un efecto alelopático de *C. polykrikoides* sobre diversas especies de dinoflagelados sin contacto celular, separados

mediante una membrana permeable de 5  $\mu\text{m}$ , así como en cultivos con contacto celular. Cuando *C. polykrikoides* y *A. sanguinea* no tienen contacto (al separarse por una membrana), disminuyó la densidad celular de *A. sanguinea* a las 72 h. Al estar en contacto *C. polykrikoides* y con la rafidofícea *C. marina*, esta última disminuyó su densidad celular, en contraste, en los cultivos separados por una membrana creció (2,400  $\text{cél mL}^{-1}$ ), no obstante fue un crecimiento menor al del control (3,360  $\text{cél mL}^{-1}$ ). Sus resultados indican que no es necesario el contacto directo entre estas especies para tener un efecto alelopático, sugiriendo que al menos algunos de los aleloquímicos responsables son liberados al medio de cultivo. También mencionan que las sustancias liberadas (ROS) se disuelven en el medio de cultivo y no causan un gran impacto en las células mostrando una disminución celular significativamente menor que su testigo. También mencionan que este daño se observó durante el análisis microscópico de células de *G. catenatum*, observándose únicamente células redondeadas. La exposición directa de *C. polykrikoides* a *G. catenatum* causó un efecto más fuerte al estar separados por una membrana permeable, al registrarse las mortalidades más altas de *G. catenatum* en los tratamientos con contacto celular. Es probable que *C. polykrikoides* tenga otros mecanismos para hacer daño a las células, por ejemplo la literatura menciona que posee tricocistos (Hallegraeff & Hará, 1995) que pudieran ser liberados y ejercer un daño físico a la membrana celular de *G. catenatum*.

Muchos de los metabolitos alelopáticos no han sido identificados químicamente, sin embargo, hay evidencia de su actividad la cual varía entre cepas (Kudela & Gobler, 2012). En este trabajo al agregar cultivos filtrados de *C. polykrikoides* a *G. catenatum*, solo hubo una mortalidad significativa (50 y 100%) en las proporciones 1:1 y 2:1, cuando se utilizaron 20 y 50 mL del filtrado. Fernández-Herrera *et al.* (2016) observaron resultados similares y sólo obtuvieron mortalidades del ~50% al agregar 50 mL en la proporción 2:1 y 1:2 de cultivos filtrados de *Chattonella marina* var. *marina* a cultivos de *G. catenatum*. Este comportamiento puede deberse a que las células al momento de filtrarse se dañen

y se rompan y segreguen más aleloquímicos u otras sustancias al medio que pueden dañar a *G. catenatum*.

Al agregar cultivos filtrados de las de dos cepas de *G. impudicum* no hubo diferencias significativas en el crecimiento con respecto al testigo en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, sí se observaron algunas células con cambios morfológicos, indicando que la concentración de las sustancias excretadas al medio de cultivo no fue lo suficientemente dañina o que fueron concentraciones bajas como para no inhibir la tasa de crecimiento.

En este trabajo se observaron algunos efectos negativos sobre *G. catenatum* al estar expuesto a *C. polykrikoides* y *G. impudicum*, siendo más evidente en los experimentos con contacto celular y en menor grado cuando se utilizaron filtrados celulares. Al utilizar una membrana permeable como barrera física no se detectaron cambios en el crecimiento de *G. catenatum*. Se ha sugerido que en el ambiente natural las especies de fitoplancton están constantemente expuestas a los compuestos químicos de otras especies, pero que en condiciones de cultivo están expuestas a los metabolitos secundarios exudados por una sola especie, teniendo esto un efecto mayor sobre la especie blanco (Tang & Gobler, 2010). Sin embargo, además de la concentración en el ambiente, factores como la fotosensibilidad y la actividad bacteriana ocasionan la degradación de esos metabolitos, provocando que algunas poblaciones afectadas logren recuperarse (Windust *et al.*, 1997; Gleason & Paulson, 1984). Tang y Gobler (2010) mencionan que puede haber pérdida de la toxicidad de *C. polykrikoides* después de filtrar el cultivo o separar las células con una membrana de nylon. Yamasaki *et al.* (2007) evaluaron el efecto de *C. polykrikoides* sobre *A. sanguinea*, encontrando que es necesario el contacto celular entre ambas especies para afectar a las células de *A. sanguinea*, ya que al separarlas con una malla de 3  $\mu\text{m}$  no detectaron un efecto alelopático. Por otro lado, estos mismos autores experimentando con *C. polykrikoides*, utilizando una malla de 5  $\mu\text{m}$ , mencionan que los aleloquímicos producidos por *C. polykrikoides* fueron liberados y disueltos en el medio de cultivo y que el contacto directo no es un requisito para

tener efectos alelopáticos en las células blanco. En el presente estudio los resultados coincidieron con las observaciones reportadas por estos autores, en virtud de que al utilizar una malla de 10 µm en las tres cepas confrontadas con *G. catenatum* se logró detectar daño morfológico en sus células, probablemente por la liberación de metabolitos que tuvieron un efecto alelopático sobre *G. catenatum*.

Esto puede estar relacionado con la hipótesis de ecología química planteada por Cembella *et al.* (2003), quien menciona que ante un agente de competencia, otras microalgas o depredadores provocan la activación y excreción de metabolitos al medio, que actúan como una señal (Ives, 1987; Turriff *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1998), ocasionando la producción de una mayor cantidad de metabolitos secundarios (John *et al.*, 2010).

Se sabe que la toxicidad de *C. polykrikoides* se relaciona con agentes citotóxicos (Kim *et al.*, 1999b, 2002), neurotoxinas y sustancias hemolíticas, que pueden ser ácidos grasos poliinsaturados libres (18:5 n3, 22:6 n3) (Kim *et al.*, 2001; Dorantes-Aranda *et al.*, 2009, 2010), así como sustancias reactivas de oxígeno.

La disminución de la población de *G. catenatum* en los tratamientos con contacto celular con *G. impudicum* pudo deberse a que esta especie segrega sustancias mucilaginosas cuando está en contacto con otra especie (Fraga *et al.*, 1995), tornando viscosa el agua de mar. Se ha documentado que cuando alcanza abundancias elevadas, puede variar bruscamente los niveles de oxígeno disuelto o el pH del medio; o por su elevada biomasa compiten por los nutrientes y disminuyen la penetración de luz, afectando negativamente los productos primarios bentónicos, al morir libera niveles importantes de amonio, o causa fermentaciones en el fondo (Sar *et al.*, 2002). A la fecha, no existen reportes de que esta especie produzca toxinas.

Gentien & Arzul (1990) muestran que la actividad alelopática de los filtrados depende del crecimiento de los cultivos y la concentración celular de las microalgas. El poco efecto de los cultivos filtrados de *C. polykrikoides* en *G. catenatum* podría explicarse por la viabilidad de los metabolitos en el medio de

cultivo, como es el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales se degradan en un corto tiempo debido a su fotosensibilidad y por la degradación bacteriana (Gleason & Paulson, 1984; Windust *et al.*, 1996).

La producción de aleloquímicos es una estrategia usada en los florecimientos algales para dominar, competir y coexistir entre especies de fitoplancton (Smayda 1997; Granéli & Hansen 2006; Tillmann *et al.*, 2008b), en nuestros resultados se observó que *C. polykrikoides* siempre dominó y en algunos casos inhibió el crecimiento de *G. catenatum* cuando hubo contacto celular y al agregar filtrado de su cultivo. Por otra parte *G. impudicum* en los filtrados celulares no afectan el crecimiento de *G. catenatum*, esta especie sólo afectó negativamente el crecimiento de *G. catenatum* al haber contacto celular entre ellas.

Una de las adaptaciones, en algunos dinoflagelados es la formación de cadenas que le confiere una mayor rapidez de natación, ayudándole a realizar migraciones verticales para una mejor captación de luz y aprovechamiento de nutrientes (Smayda, 2002). La sobrevivencia de las cadenas de *G. catenatum* es mayor cuando está expuesto a *C. marina* var. *marina*, mientras que las células individuales de *G. catenatum* son más vulnerables al efecto alelopático (Fernández-Herrera *et al.*, 2016). Este comportamiento fue contrario a lo observado en este trabajo, en los tratamientos con contacto celular y en los cultivos filtrados con las dos especies de dinoflagelados en todas las proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 predominaron las células individuales; este comportamiento fue más notorio en los tratamientos que estuvieron expuestos a *C. polykrikoides*. En los experimentos con contacto celular las cadenas más largas fueron las más afectadas ya que posiblemente las células en cadena al tener una mayor superficie de contacto, pueden ser más susceptibles al efecto por contacto directo, por ende al transcurrir los días de exposición el incremento en el número de células individuales fue mayor, sufriendo fragmentación. Lo anterior concuerda con el predominio de cadenas menores a 4 células y células individuales cuando *G. catenatum* estuvo en contacto celular con *C. polykrikoides*, ya que ésta especie es



productora de aleloquímicos y sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Cabe resaltar que el mismo efecto en la longitud de cadenas se observó al estar *G. catenatum* en contacto con *G. impudicum*.

Blackburn *et al.* (1989) señalan que a una mayor longitud de cadenas en los cultivos de *G. catenatum* indica que están en mejores condiciones fisiológicas pues observaron que durante la fase de crecimiento exponencial, la mayoría de las células formaban cadenas de 4-16 células y al ir avanzando en tiempo y bajo condiciones limitantes de nutrientes estas cadenas se fragmentan en células individuales. El largo de las cadenas también está influenciado por las condiciones y composición del medio de cultivo (Blackburn *et al.*, 1989), encontrando que en medio GSe se obtiene una mayor producción de cadenas largas (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Durán-Riveroll, 2014) debido a que este medio tiene extracto de suelo que estimula el crecimiento, agregando una cantidad extra de micronutrientes (González-González, 2010; Ortiz-Moreno *et al.*, 2012).

En los diferentes experimentos se registraron cambios morfológicos de las células de *G. catenatum* al estar en contacto celular, al agregarle cultivos filtrados y al separarlas por una membrana permeable de las células de *C. polykrikoides* y *G. impudicum*. Los cambios que se observaron, fueron células esféricas sin flagelo, desprendimiento de la membrana plasmática, desarreglos en el cíngulo y sulcus, núcleo evidente y lisis celular. Los cambios morfológicos y la longitud de cadenas no se deben a las proporciones de nutrientes, temperatura, salinidad y fotoperiodo ya que estas variables fueron iguales en los tratamientos y los controles. El único agente de estrés fue la presencia de células, filtrados celulares y los exudados de las cepas de *C. polykrikoides* y *G. impudicum*.

Cambios morfológicos también se presentaron cuando *G. catenatum* estuvo expuesto a células o filtrados de *Chattonella marina* var. *marina* (Raphidophyceae) mostrando células redondeadas con núcleos prominentes, ruptura de la membrana celular, lisis celular, desarreglos en el cíngulo y el sulcus (Fernández-Herrera *et al.*, 2016). Las defensas ante cualquier ataque o situación desfavorable depende de la forma de las microalgas (espinas y proyecciones) así como de sus

estrategias ontogénicas (palatabilidad, agregación o formación de colonias) (Van Donk, 1999; Wolfe, 2000).

El comportamiento de *G. catenatum* cuando estuvo expuesto a células, exudados o filtrados de *C. polykrikoides* y *G. impudicum* fue una inhibición en el crecimiento o disminución de su densidad celular. En los tratamientos donde *G. catenatum* estuvo expuesto a *C. polykrikoides* se sugiere que es un efecto alelopático. Al estar expuesto a *G. impudicum* entre ellas hay una competencia, por lo que podemos asumir que estas interacciones promueven la dominancia de una especie de fitoplancton sobre la otra, cuando coexisten en el ambiente natural.

## **10. CONCLUSIONES**

Mediante la secuenciación de la región 28S de la LSU del ADNr se confirmó la identificación de *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum*.

*C. polykrikoides* y *G. impudicum* inhiben el crecimiento de *G. catenatum* particularmente en los cultivos con contacto celular y al exponer a *G. catenatum* a los cultivos filtrados de estas especies, siendo mayor la inhibición del crecimiento con *C. polykrikoides*.

En todos los tratamientos probados, el efecto fue mayor al exponer *G. catenatum* a células o filtrados de *C. polykrikoides*, sugiriendo que *C. polykrikoides* puede inhibir con mayor eficacia el crecimiento de *G. catenatum* en el ambiente natural.

Las cadenas largas de *G. catenatum* son más vulnerables al efecto alelopático de las tres cepas analizadas ya que estas cadenas se disgregaron a células individuales, predominando las células individuales en la mayoría de los tratamientos.

Al estar *G. catenatum* expuesto a cultivo o filtrados de *C. polykrikoides* y de *G. impudicum* se observaron cambios en la morfología de las células:

desprendimiento de la membrana celular, células redondeadas, pérdida de flagelos, deformaciones del cíngulo y el sulcus, núcleo prominente y lisis celular.

Las interacciones de *C. polykrikoides* y *G. impudicum* en condiciones de laboratorio sobre *G. catenatum* demostraron que ambas especies tiene un efecto negativo sobre este; esto se observó con la disminución de su densidad celular y cambios morfológicos, aceptando así la hipótesis propuesta y concluyendo que en su ambiente natural estas especies pudieran inhibir el crecimiento de *G. catenatum*.

## **11. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES**

Dado que se ha observado que los FAN están incrementando en frecuencia y duración es importante continuar con estudios que permitan comprender las interacciones inter-específicas entre las especies de dinoflagelados, incluyendo aquellas que pueden tener efectos adversos en la fauna silvestre y el humano.

En este estudio se identificó molecularmente la cepa GIBACO-1 de *G. impudicum*, sin embargo es conveniente profundizar en sus análisis morfológico para poder describir y complementar su identificación taxonómica.

Todavía no se sabe en sí que interacciones predomina en un FAN, para esto se necesita seguir haciendo experimentos en el laboratorio con diferentes especies de dinoflagelados ya sea tóxico o nocivo y a diferentes proporciones, tomando en cuenta los factores externos.

Continuar con los estudios de *G. catenatum*, debido a su alta toxicidad y sus probables efectos en la salud animal y salud pública.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Rodríguez, R. & F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp: a review with special reference to situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219: 317-336.
- Anderson, D. M. 1994. Red Tides. *Scientific American*. August. 52-58.
- Arzul, G., M. Seguel, L. Guzman & E. E. Denn. 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 232: 285-295.
- Azanza, R. V., L. T. David, R. T. Borja, I. U. Baula & Y. Fukuyo. 2008. An extensive *Cochlodinium* bloom along the western coast of Palawan, Philippines. *Harmful Algae*, 7: 324-330.
- Band-Schmidt, C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval, E. J. Núñez-Vázquez & D. J. López-Cortés. 2014. Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) of the Pacific coast of Mexico. *Toxicon*, 90: 199-212.
- Band-Schmidt, C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E. J. Núñez-Vázquez & F. E. Hernández-Sandoval. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* the Mexican Pacific. *A Review. Marine Drugs*, 8: 1935-1961.
- Band-Schmidt, C., J. J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho-Escamilla, I. Gárate-Lizárraga, R. Alonso-Rodríguez, A. Reyes-Salinas, K. Erler & B. Luckas. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology*, 42: 757-768.
- Band-Schmidt, J., L. Morquecho, D. U. Hernández-Becerril, A. Reyes-Salinas & E. Bravo-Sierra. 2004. Raphidophyceans on the coasts of Mexico. *Hydrobiologia*, 515: 79-89.

- Barraza-Guardado, R., R. Cortés-Altamirano & A. Sierra-Beltrán. 2004. Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Ch. cf ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic algae and algal bloom*, 25: 7-8.
- Blackburn, S. I., G. M. Hallegraeff & C. J. Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania. *Journal of Phycology*, 25: 577-590.
- Bustillos-Guzmán, J. J., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E. J. Núñez-Vázquez & F. E. Hernández-Sandoval. 2012. Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gymnodinium catenatum* Graham del Golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. *Ciencias Marinas*, 38: 101-117.
- Bustillos-Guzmán, J. J., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés., F. E. Hernández-Sandoval, E. Núñez-Vázquez & I. Gárate-Lizárraga. 2013. Pastoreo del dinoflagelado *Noctiluca scintillans* sobre el dinoflagelado producto de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*: ¿Elimina el pastoreo células durante un florecimiento?. *Ciencias Marinas*, 39(3): 291-302.
- Bustillos-Guzmán, J. J., I. Leyva-Valencia, F. E. Hernández-Sandoval, C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés & E. J. Núñez-Vázquez. 2016. Ficotoxinas en aguas del Golfo de California: Una revisión. En: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortíz, A y Núñez-Vázquez, E. J. (eds). *Florecimientos Algas nocivos en México. CICESE*. 38-55.
- Cembella, A. D. 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, 42(4): 420-447.
- Cho, E. S., G. Y. Kim, B. D. Choi, L. L. Rhodes, T. J. Kim & G. H. Lee, G. H. 2001. A comparative study of the harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Gyrodinium impudicum* using transmission electron microscopy, fatty acid composition, carotenoid content, DNA quantification and gene sequences. *Botanica Marina*, 44: 57-66.

- Cortés-Altamirano, R. 1987. Observaciones de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. *Ciencias Marinas*, 13: 1-19.
- Cortés-Altamirano, R. S., D. Licea & S. Gómez. 1999. Evidencias de aumento de microalgas nocivas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. *COLACMAR*. 343-345.
- Cortés-Altamirano, R. & R. Alonso-Rodríguez. 1997. Mareas rojas durante 1997 en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Ciencias del Mar, UAS*. 15: 31-37.
- Cortés-Altamirano, R., R. Alonso-Rodríguez & A. Sierra-Beltrán. 2006. Fish mortality associated with *Chattonella marina* and *C. cf. ovata* (Raphidophyceae) blooms in Sinaloa (Mexico). *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic algae and algal bloom*. 31: 7-8.16.
- Curtiss, C. C., G. W. Langlois, L. B. Busse, F. Mazzillo & M. W. Silver. 2008. The emergence of *Cochlodinium* along the California Coast (USA). *Harmful Algae*, 7: 337-346.
- Donaghay, P. L. & T. R. Osborn. 1997. Towards a theory of biological-physical control of harmful algal bloom dynamics and impacts. *Limnology and Oceanography*, 42: 1283-1296.
- Dorantes-Aranda, J. J. 2006. Efecto ictiotóxico del dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* (Margalef, 1961) en el pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de Maestría. UNAM. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, ICML Unidd Académica. Mazatlán. 67.
- Dorantes-Aranda, J. J., L. M. Gacia-DeLaParra, R. Alonso-Rodríguez, L. Morquecho & D. Voltolina. 2010. Toxic effects of the harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* on the spotted rose sanper *Lutjanus guttatus*. *Environmental Toxicology*, 25(4): 319-326.
- Dorantes-Aranda, J. J., L. M. García-De La Parra, R. Alonso-Rodríguez & L. Morquecho. 2009. Hemolytic activity and fatty acids composition in the

- ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Bahía de La Paz, Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 1401-1405.
- Durán-Riveroll, L. M. 2014. Toxinas paralizantes tipo Benzoil en el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* Graham y modelo teórico de interacción con el canal de sodio. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN). CICIMAR. La Paz, B.C.S., México. 129 p.
- Escalera, L., B. Reguera, Y. Pazos, A. Moroño & M. J. Cabanas. 2006. Are different species of *Dinophysis* selected by climatological conditions?. *African Journal of Marine Science*, 28(2): 283-288.
- Fernández-Herrera, L. J., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés, C. J. Hernández-Guerrero, J. J. Bustillos-Guzmán & E. Núñez-Vázquez. 2016. Allelopathic effect of *Chattonella marina* var. *marina* (Raphidophyceae) on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 51: 1-9.
- Fierrier, M., J. Martinm & J. N. Rooney-Varga. 2002. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 16-706.
- Fistoral, G. O., C. Legrand, E. Selander, C. Hummert, W. Stolte & E. Granéli. 2004. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, 35: 45-56.
- Fraga, S., I. Bravo, M. Delgado, J. M. Franco & M. Zapata. 1995. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia*, 36(6):514-521.
- Franks, P. J. 1997. Models of harmful algal blooms. *Limnology Oceanography*, 42: 1273-1282.
- Gárate-Lizárraga, I. 2014. Occurrence of *Cochlodinium fulvescens* (Gymnodiniales: Dinophyceae) in the southwestern Gulf of California. *Revista de Biología y Oceanografía*, 1: 123-127.

- Gárate-Lizárraga, I., C. J. Band-Schmidt, F. Aguirre-Bahena & T. Grayeb-del Álamo. 2009a. A multi-species microalgae bloom in Bahía de La Paz, Gulf of California, Mexico (Junio 2008). *CICIMAR Océánides*, 24(1): 1-15.
- Gárate-Lizárraga, I., J. A. Díaz-Ortíz, B. Pérez-Cruz, M. A. Alarcón-Romero, L. A. Chávez-Almazán, J. L. García-Barbosa & S. López-Silva. 2011. A multispecies dinoflagellate bloom and shellfish toxicity in Costa Grande, Guerrero, Mexico (December, 2010). *CICIMAR Océánides*, 26(1): 67-71.
- Gárate-Lizárraga, I. & A. Martínez-López. 1997. Primer registro de una marea roja de *Prorocentrum mexicanum* (Prorocentraceae) en el Golfo de California. *Revista de Biología Tropical*, 45: 1263-1271.
- Gárate-Lizárraga, I. & M. S. Muñetón-Gómez. 2008. Bloom of *Peridinium quinquecorne* Abé in la Ensenada de La Paz, Gulf of California (July 2003). *Acta Botanica Mexicana*, 83: 33-47.
- Gárate-Lizárraga, I., C. J. Band-Schmidt, G. Verdugo-Díaz, M. S. Muletón-Gómez & E. F. Félix-Pico. 2007. Dinoflagelados (Dinophyceae) del sistema lagunar Magdalena-Almejas. En: Funes-Rodríguez R., J. Gómez-Gutiérrez & R. Palomares-García (eds): Estudios ecológicos en Bahía Magdalena. *Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional*, La Paz, B.C.S. 145-174.
- Gárate-Lizárraga, I., J. J. Bustillos-Guzmán, L. M. Morquecho & C. H. Lechuga-Déveze. 2000. First Outbreak of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California. *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic and algae blooms*, 21:7.
- Gárate-Lizárraga, I., J. A. Díaz-Ortíz, B. Pérez-Cruz, M. A. Alarcón-Tacuba, A. Torres-Jaramillo, M. A. Alarcón-Romero & S. López-Silva. 2009b. *Cochlodinium polykrikoides* and *Gymnodinium catenatum* in Bahía de Acapulco, Mexico (2005-2008). *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms*, 40: 8-9.



- Gárate-Lizárraga, I., M. Hernández-Orozco, C. J. Band-Schmidt & G. Serrano-Casillas. 2001. Red tides along the coasts of the Baja California Sur, Mexico (1984 to 1999). *CICIMAR Océánides*, 16: 127-134.
- Gárate-Lizárraga, I., D. J. López-Cortés, J. J. Bustillos-Guzmán & F. Hernández-Sandoval. 2004. Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniaceae) in the Gulf of California, México. *Revista de Biología Tropical*, 52(Suppl. 1): 51-58.
- Gárate-Lizárraga, I., E. Muciño-Márquez & D. J. López-Cortés. 2010. Estadios de vida de *Gyrodinium falcatum* (Dinophyceae) en la Bahía de La Paz, de Golfo de California. *CICIMAR Océánides*, 25: 53-58.
- Gárate-Lizárraga, I., M. S. Muñetón-Gómez & V. Maldonado-López. 2006a. Florecimiento del dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Revista de Investigaciones Marinas*, 27: 31-39.
- Gárate-Lizárraga, I., B. Pérez-Cruz, J. Díaz-Ortíz & C. J. Band-Schmidt. 2008. Microalgas y biotoxinas marinas en las costas mexicanas. *Conversus*, 9: 22-26.
- Gárate-Lizárraga, I., G. Verdugo-Díaz & Y. Okolodkov. 2016. Florecimientos algales nocivos en la costa occidental de la Baja. En: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortíz, A., Núñez-Vázquez, E. J. (eds) *CICICE*, 45-59.
- Garcés, E., A. Zingone, M. Montresor, B. Reguera & B. Dale. 2001. LIFEHAB Life histories of microalgal species causing harmful blooms. En: Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B., Dale, B., (eds). European Commission. Calviá, Majorca, España, Octubre. 24-27.
- Gentien, P. & G. Arzul. 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium* cf. *aureolum* (Dinophyceae). *Journal of the Marine Biological Association. U. K.* 70, 571-581.

- Gleason, F. K. & J. L. Paulson. 1984. Site of action of the natural algicide, cyanobacterian, in the blue green alga *Synechococcus* sp. *Archives of Microbiology*, 138: 273-277.
- Gobler, C. J., A. Burson, F. Koch, T. Tang & M. R. Mulholland. 2012. The role of nitrogenous nutrients in the occurrence of harmful algal blooms caused by *Cochlodinium polykrikoides* in the New York estuaries (USA). *Harmful Algae*, 17: 64-74.
- Gómez, F., P. López-García & D. Moreira. 2011. Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica*, 21(3): 343-364.
- González-González, L. M. 2010. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 65.
- Graham, H. W. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society*, 62: 259-261.
- Granéli, E. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8: 94-102.
- Granéli, E. & P. J. Hansen. 2006. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources. En: Granéli, E., Turner, J.T. (eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Ecological Studies, Vol. 189. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, 189-201.
- Granéli, E. & J. T. Turner. 2001. *Ecology of Harmful Algae*. Kalmar: Springer.
- Gross, E. M. 2003. Allelopathy of Aquatic Autotrophs. *First publ. in: Critical Reviews in Plant Science*, 22: 313-339.

- Guluarte-Castro, A. L. & M. A. Bañuelos. 2007. Florecimiento de algas nocivas (Marea roja) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur. *Red Sanitaria*, 3: 1-4.
- Hallegraeff, G. M. 1993. Review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Journal of Phycology*, 32: 79-99.
- Hallegraeff, G. M. & S. Fraga. 1996. Bloom dynamics of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with emphasis on Tasmanian and Spanish coastal waters. En: Anderson, D. M., A. D. Cembella & G. M. Hallegraeff (eds.). *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO ASI Series*. 59-80.
- Hallegraeff, G. M. & Y. Hara. 1995. Taxonomy of Harmful Marine Raphidophytes. In: Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson & A. D. Cembella (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris*. 365-371.
- Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson & A. D. Cembella. 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae. *UNESCO Monogr. Oceanogr. Methodol.* 11. Paris: UNESCO, 792.
- Hallegraeff, G. M., S. I. Blackburn, M. A. Doblin & C. J. Bolch. 2012. Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 14: 130-143.
- Hattenrath-Lenmann, T. & C. J. Gobler. 2011. Allelopathic inhibition of competing phytoplankton by North American strains of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense*: evidence from field experiments, laboratory experiments, and bloom events. *Harmful Algae*, 11: 106-116.
- Heisler, J., P. M. Gilbert, J. M. Burkholder, D. M. Anderson, W. Cochlan, W. C. Dennison, A. Dortch, C. J. Gobler, E. Lewitus, A. Magnien, R. H. G. Marshall, K. Sellner, D. A. Stockwell, D. K. Stoecker & M. Suddleson. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8: 3-13.

- Hernández-Sandoval, F. E., López-Cortés, D. J., Band-Schmidt, C. J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E. J., & Bustillos-Guzmán, J. J. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica*, 19: 245-256.
- Igarashi, T., M. Satake & T. Yasumoto. 1996. Pymnesin-2: a potent ichthyotoxic and haemolytic glycoside isolated from the red tide algae *Pymnesium parvum*. *Journal of the American Chemical Society*, 118: 479-480.
- Ives, J. D. 1987. Possible mechanisms underlying copepod grazing responses to levels of toxicity in red tide dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 112: 131-145.
- Iwataki, M., H. Kawami & K. Matsuoka. 2007. *Cochlodinium fulvescens* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new chain-forming unarmored dinoflagellate from Asian coasts. *Phycological Research*, 55: 231-239.
- Iwataki, M., H. Kawami, K. Mizushima, C. M. Mikulski, G. J. Doucette, J. R. Relox, A. Anton; Y. Fukuyo & K. Matsuoka. 2008. Phylogenetic relationship in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. *Harmful Algae*, 7: 271-277.
- Jeong, H. J., J. H. Ok, A. S. Lim, J. E. Kwon, S. J. Kim & S. Y. Lee. 2016. Mixotrophy in the phototrophic dinoflagellate *Takayama helix* (family Kareniaceae): Predator of diverse toxic and harmful dinoflagellates. *Harmful Algae*, 60: 92-106.
- John, U., U. Tillman, Hülsköter, A. Cembella & T. Aplerman. 2010. The ecological and evolutionary concept behind allelochemical interactions for *Alexandrium* populations. 14th international Conference on Harmful Algae. *Abstract Book. Grecia*. 103.

- Kim, C. S., S. G. Lee, H. G. Kim & J. Jung. 1999b. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Journal of Plankton Research*, 21: 2105-2115.
- Kim, C. S., S. G. Lee, H. G. Kim & J. S. Lee. 2001. Screening for toxic compounds in the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*: is it toxic plankton?. *Algae*, 16: 457-462.
- Kim, D., T. Oda, T. Muramatsu, D. Kim, Y. Matsuyama & T. Honjo. 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132: 415-423.
- Kubanek, J., M. K. Hicks, J. Naar & T. A. Villareal. 2005. Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton?. *Limnology and Oceanography*, 50: 883-895.
- Kudela, R. M. & C. J. Gobler. 2012. Harmful dinoflagellate blooms caused by *Cochlodinium* sp.: Global expansion and ecological strategies facilitating bloom formation. *Harmful Algae*, 14: 71-88.
- Labry, C., E. Denn, A. Chapelle, J. Fruchot, A. Youenou, M. P. Crassous, J. LeGarnd & B. Lorgeoux. 2008. Competition for phosphorous between two dinoflagellates: a toxic *Alexandrium minutum* and non-toxic *Heterocapsa triquetra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358: 124-35.
- Lampert, W. & U. Sommer. 1997. Limnoecology: the ecology of lakes and streams. *Oxford University Press, New York*. 382.
- Lee, M. J., H. J. Jeong, K. Lee, S. H. Jang, J. H. Kim & K. Y. Kim. 2015. Mixotrophy in the nematocyst-taeniocyst complex-bearing phototrophic dinoflagellate *Polykrikos hartmannii*. *Harmful Algae*, 49: 124-134.
- Legrand, C., K. Rengefors, G. O. Fistarol & E. Granéli. 2003. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42: 406-419.

- Lim, A. S., H. J. Jeong, J. H. Kim, S. H. Jamg, M. J. Lee & K. Lee. 2015. Mixotrophy in the newly described dinoflagellate *Alexandrium pohangense*: a specialist for feeding on the fast-swimming ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Harmful Algae*, 49: 10-18.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval, A. Mendoza-Flores & E. J. Núñez-Vázquez. 2014. Condiciones ambientales durante un florecimiento de *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) en la Ensenada de La Paz, Golfo de California. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 1: 97-110.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, J. J. Bustillos-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, F. E. Hernández-Sandoval & E. J. Núñez-Vázquez. 2005. Co-ocurrencia de *Chattonella marina* y *Gymnodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiología*, 21(2): 185-196.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval & E. J. Nuñez-Vázquez. 2011. Co-ocurrencia de *Chattonella marina* y *Gymnodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiológica*, 21 (2): 185-196.
- López-Cortés, D. J., E. J. Núñez-Vázquez, C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga & J. J. Bustillos-Guzmán. 2015. Mass fish die-off during a diatom bloom in the Bahía de La Paz, Gulf of California. *Hidrobiológica*, 25 (1): 39-48.
- Lotze, K. K., W. Schramm, D. Schories & B. Worm. 1999. Control of macroalgal blooms at early developmental stages: *Pilayella littoralis* versus *Enteromorpha* spp. *Oecologia*, 119: 46-54.
- Lovett, J. V., M. Y. Ryuntyu & D. L. Liu. 1989. Allelopathy, chemical communication, and plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 1193-1202.

- Maciel-Baltazar, E. & D. U. Hernández-Becerril. 2013. Especies de dinoflagelados atecados (Dinophyta) de la costa de Chiapas, sur del Pacífico mexicano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48: 245-259.
- Maestrini, S. Y. & D. J. Bonin. 1981. Allelopathic relationships between phytoplankton species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 210: 323-338.
- Matsuoka, K., M. Iwataki & H. Kawami. 2008. Morphology and taxonomy of chainforming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 7: 261-270.
- Maynard-Smith, J. 1974. *Models in Ecology*. Cambridge University Press, E. U. A.
- Mee, L. D., M. Espinosa & G. Díaz. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine Environmental Research*, 19: 17-92.
- Montresor, M. 2001. To what extent dinoflagellate life histories are important for HAB's: LIFEHAB life histories of microalgal species causing harmful blooms. En: Garcés E., Zingone A., Montresor M., Reguera B., Dale B. (eds). *European workshop- Majorca, España, Octubre. 24-27, 2001*, 18-21.
- Morales-Blake, A., C. Cavazos-Guerra & D. U. Hernández-Becerril. 2001. Unusual HABs in Manzanillo Bay, Colima, Mexico. *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms*, 22:6.
- Morquecho-Escamilla, M. & R. Alonso-Rodríguez. 2008. First record of *Cochlodinium fulvescens* in Mexican Pacific. *Harmful Algae News, IOC Newsletter on toxic algae and algal bloom*, 37: 5-6.
- Munir, S., T. Naz, Z. N. Burhan, P. J. Siddiqui & S. L. Morton. 2012. First report of the athecate, chain forming dinoflagellate *Cochlodinium fulvescens* (Gymnodiniales) from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 44: 2129-2134.
- Núñez-Vázquez, E. J., I. Gárate-Lizárraga, C. J. Band-Schmidt, A. Cordero-Tapia, D. López-Cortés, F. Hernández-Sandoval, A. Heredia-Tapia & J. J.

- Bustillos-Guzmán. 2011. Impact of Harmful Algae Blooms on wild and culture animals in the Gulf of the California. *Journal of Environmental Biology*, 32 (4): 407-412.
- Núñez-Vázquez, E. J., A. Heredia-Tapia, J. C. Pérez-Urbiola, R. Alonso-Rodríguez, J. Arellano-Blanco, A. Cordero-Tapia, J. Pérez-Linares & J. L. Ochoa. 2003. Evaluation of dinoflagellate toxicity implicated in recent HAB events in the Gulf of California, Mexico. In: Holland, P., L. Rhodes & L. Brown (Eds.). Cawtron Report No. 906. *Proceeding from HABTech 2003, APEC. A workshop on technologies for monitoring of harmful algal blooms and marine biotoxins*, 94.
- Oberhaus, L., J. F. Briand & J. F. Humbert. 2008. Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *FEMS Microbiology Ecology*, 66: 243-249.
- Ochoa, J. L., E. Núñez-Vázquez & J. Saad. 2003. Diferentes términos utilizados para describir las "Mares Rojas". *Revista de Biología Tropical*, 51(3): 621-628.
- Ochoa, J. L., A. Sánchez-Paz, A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez & A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: origin and impact. *Hydrobiologia*, 352: 195-200.
- Ortiz-Moreno, M. L., C. E. Cortés-Castillo, J. Sánchez-Villarraga, J. Padilla & A. M. Otero-Paternina. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16: 2-12.
- Prince, E. K., T. L. Myers, J. Naar & J. Kubanek. 2008. Competing phytoplankton undermines allelopathy of a bloom-forming dinoflagellate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 2733-41.
- Ramírez-Rodríguez, D. V. 2015. Efecto de la comunidad bacteriana en el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943): crecimiento, perfil



- de pigmentos y toxinas paralizantes. Tesis de Licenciatura. UABCS. La Paz. B.C.S. 79.
- Reigosa, M. J., A. Sánchez-Moreiras & L. González. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 577-608.
- Reis-Costa, P., M. João & K. A. Lefebvre. 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hidrobiología*, 655: 89-97.
- Rengefors, H. & C. Legrand. 2001. Toxicity in *Peridinium aciculiferum*- an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton?. *Limnology and Oceanography*, 46:1990-1997.
- Rey, R. J. 2008. Las Mareas Rojas. *IFAS Extension University of Florida*. 2-4.
- Rice, E. L. 1984. Allelopathy. Second Edition. Orlando (Fla., USA):. *Academic Press*, 422.
- Rizvi, S. J., V. K. Singh & V. Rizvi. 1992. A discipline called allelopathy. *In: Allelopathy: basic and applied aspects (Ed. by S.J.H. Rizvi & V. Rizvi)*. 1-10.
- Saldade-Castañeda, O., J. L. Vázquez-Castellanos, A. Sánchez-Anguiano & A. Nazar. 1991. Intoxicaciones por toxina paralizante de moluscos en Oaxaca. *Laboratorio Nacional de Salud Pública*. 8.
- Sar, E. A., M. E. Ferrerio & B. Reguera. 2002. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. *Instituto Español de Oceanografía. España*. 303.
- Sato, H., C. Yamamoto & K. Terai. 2005. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. *Aquatic Toxicology*, 56: 191-196.
- Sellner, K. G., G. J. Doucette & G. J. Kirkpatrick. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 30: 383-406.

- Shilo, M. 1981. The toxic principles of *Prymnesium parvum*. In: Carmichael WW (Ed). The water environment. *Algal toxins and health*. Plenum Press, New York. 37-47.
- Smayda, T. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *Journal of Oceanography*, 58: 281-294.
- Smayda, T. J. 1997. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton bloom in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42: 1137-1153.
- Smayda, T. J. & C. S. Reynolds. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *Journal of Plankton Research*, 23: 477-461.
- Smayda, T. J. & C. S. Reynolds. 2003. Strategies of marine dinoflagellates survival and some rules of assembly. *Journal Sea Research*, 49: 95-106.
- Smetacek, V. 2001. A watery arms race. *Nature*, 411: 745.
- Strom, S. L. 2008. Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective. *Science*, 320: 1043-1045.
- Suárez-Isla, B. & L. Guzmán-Méndez. 2012. Floraciones de algas nocivas mareas rojas y toxinas marimas. *Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de medicina. Chile*. 1-56.
- Sunda, W. G., E. Granéli & C. J. Gobler. 2006. Positive feedback and the development and persistence of ecosystem disruptive algal blooms. *Journal of Phycology*, 42: 963-974.
- Tang, C. S., W. F. Cai, K. Kohl & R. K. Nishimoto. 1995. Plant stress and allelopathy. *ACS Symposium Series*. 582: 142-157.
- Tang, Y. Z. & C. J. Gobler. 2010. Allelopathic effects of *Cochlodinium polykrikoides* isolates and blooms from the estuaries of Long Island, New York, on co-occurring phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 406: 19-31.

- Tillmann, U. 2004. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51: 156-168.
- Tillmann, U. & U. John. 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellate: An allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Marine Ecology Progress Series*, 230: 41-58.
- Tillmann, U., T. Alpermann, R. Purificacao, B. Krock & A. Cembella. 2009. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 8: 759-769.
- Tillmann, U., U. John, B. Krock & A. Cembella. 2008b. Allelopathic effects of bioactive compounds produced by harmful algae. En: Moestrup O., Doucette, G., Enevoldsen H., *et al.* (eds). Proceedings of the 12th international conference on harmful algae. *International society for the study of harmful algae and intergovernmental oceanographic commission of UNESCO, Copenhagen*. 12-18.
- Tillmann, U., A. Tilman, U. John & A. Cembella. 2008. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae*, 7: 52-64.
- Turner, J. T., P. A. Tester & P. J. Hansen. 1998. Interactions between toxic marine phytoplankton and metazoan and protistan grazers. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G. M. (Eds.),. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, 452-474.
- Turriff, N., J. A. Runge & A. Cembella. 1995. Toxin accumulation and feeding behaviour of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* exposed to the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. *Marine Biology*, 123: 55-64.
- Uchida, T., S. Toda, M. Matsuyama, M. Yamaguchi, Y. Kotani & T. Honjo. 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 285-299.

- VanDonk, E., M. Lüring & W. Lampert. 1999. Consumer-induced changes in phytoplankton: inducibility, costs, benefits, and impact on grazer. *In: The ecology and Evolution of Inducible Defenses. Tollrin, R. y Harvell, C.D., (eds). New Jersey: Princeton University Press, 89-103.*
- Verity, P. G. & V. Smetacek. 1996. Organism life cycle, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series, 130: 277-293.*
- Whittaker, R. H. & P. P. Feeny. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science, 171: 757-770.*
- Windust, A. J., M. A. Quilliam, J. L. Wright & J. L. McLachlan. 1997. Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysis-toxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon, 35: 1591-1603.*
- Windust, A. J., J. L. Wright & J. L. McLachlan. 1996. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae. *Marine Biology, 126: 19-25.*
- Wolfe, G. V. 2000). The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: Constraints, mechanisms, and impacts. *Biological Bulletin, 198: 225-244.*
- Wolfe, J. M. & E. L. Rice. 1979. Allelopathic interactions among algae. *Journal Chemical Ecology, 5(4): 533-542.*
- Yamasaki, Y., S. Nagasoe, T. Matsubara, T. Shikata, Y. Shimasaki, Y. Oshima, T. Honjo. 2007. Growth inhibition and formation of morphologically abnormal cells of *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) G. Hansen *et* Moestrup by cell contact with *Cochlodinium polykrikoides* Margalef. *Marine Biology, 152: 157-163.*
- Yamasaki, Y., T. Shikata, A. Nukata, S. Ichiki, S. Nagasoe, T. Matsubara, Y. Shimasaki, M. Nakao, K. Yamaguchi, Y. Oshima, T. Oda, M. Ito, . R. Jenkinson, M. Asakaw & T. Honjo. 2009. Extracellular polysaccharide-

protein complexes of a harmful alga mediate the allelopathic control it exerts within the phytoplankton community. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 3: 808-817.

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

Zhu, J., J. Wang, H. Shen & H. Wu. 2005. Observation and analysis of the diluted water and red tide in the sea off the Changjiang River mouth in middle and late June 2003. *Chinese Science Bulletin*, 50: 240-247.

Zingone, A. & E. H. Oksfeldt. 2000. The diversity of harmful algal blooms: A challenge for science and management. *Ocean Coastal Management*, 43: 725-748.

Zingone, A. & T. Wyatt. 2005. Harmful algal blooms: keys to the understanding of phytoplankton ecology. En: Robinson A. R., Brink K. H. (eds) *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas*, vol. 13. *Harvard University Press, Harvard, E. U.* 867-892.