

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Crecimiento poblacional y potencial tóxico de *Gymnodinium
catenatum* y *Alexandrium affine* del norte del golfo de
California**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestría en Ciencias

Presenta:

Daniela Melissa Torres Calderón

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Daniela Melissa Torres Calderón

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

Dra. Laura Gómez Consarnau

Dr. Rafael Ramírez Mendoza

Dr. Helmut Maske Rubach



Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología marina

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Daniela Melissa Torres Calderón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en Ecología Marina

Crecimiento poblacional y potencial tóxico de *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium affine* del norte del golfo de California

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

El estudio de las especies formadoras de florecimientos algales es cada vez más frecuente, así como de las variables ambientales que influyen sobre estas. La especie que ha ocasionado más afectaciones en México es *G. catenatum*. En cada región que se presenta parece responder diferente a las condiciones ambientales, por ello se evaluó el efecto de la temperatura e irradiancia sobre este dinoflagelado del norte del golfo de California (GC). Además, se aisló una cepa del género *Alexandrium*, la cual se identificó a nivel especie y también se expuso a condiciones ambientales. Con la finalidad de conocer las condiciones óptimas de crecimiento de estas especies, así como el potencial nocivo y el perfil de toxinas que producen. Los tratamientos consistieron en exponer ambas especies a tres temperaturas, (17, 20 y 25 °C) y dos irradiancias de 90 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz baja) y 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz alta), en todos los cultivos se utilizó medio f/2 y un fotoperiodo de 12:12 (Luz: Oscuridad). En este estudio, se obtuvo el primer registro de *A. affine* en el norte del GC, se observó que la cepa de *G. catenatum* es productora de PST (toxinas de tipo paralizante); también *A. affine* en este estudio produjo ocho análogos de PST bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, en este trabajo se observó que las condiciones ambientales como la luz y la temperatura influyen en el crecimiento poblacional y el potencial tóxico de estos dinoflagelados.

Palabras clave: *Gymnodinium*, *Alexandrium*, luz, temperatura, PSTs

Abstract of the thesis presented by **Daniela Melissa Torres Calderón** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Population growth and toxic potential of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium affine* of the northern Gulf of California

Abstract approved by:

Dr. Ernesto García Mendoza
Thesis Director

The study of algal bloom-forming species is increasingly frequent, as well as the environmental variables that influence them. The species that has caused the most damage in Mexico is *G. catenatum*. In each region that appears to respond differently to environmental conditions, therefore the effect of temperature and irradiance on this dinoflagellate of the northern Gulf of California (GC) was evaluated. In addition, a strain of the genus *Alexandrium* was isolated, which was identified at the species level and also exposed to environmental conditions. In order to know the optimal conditions of growth of these species, as well as the harmful potential and the profile of toxins they produce. The treatments consisted of exposing both species to three temperatures, (17, 20 and 25°C) and two irradiances of 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons (low light) and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons (high light), in all crops half f/2 and a 12:12 photoperiod (light: dark) were used. In this study, the first record of *A. affine* was obtained in the north of the GC, it was observed that the strain of *G. catenatum* is producer of PST (paralytic type toxins); also *A. affine* in this study produced eight analogues of PST under certain conditions. Therefore, in this work it was observed that environmental conditions such as light and temperature influence population growth and the toxic potential of these dinoflagellates.

Keywords: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium affine*, Light, Temperature

Dedicatoria

A mis padres Emilia Calderón y Gabriel Torres porque sin ustedes nada es posible.

A mis compañeros de vida Gabriel Torres y Ulises Torres, por siempre creer en mí, apoyarme, guiarme y cuidarme en cada sueño.

A mis talismanes Booster, Aníbal, Dante y Linda porque aún en la distancia siempre le dan paz, fuerza y alivio a mi corazón.

Para Ik' con todo mi amor porque cuando esta aventura comenzó partiste de este mundo y Homero porque casi al terminar la maestría también te marchaste, pero sé que me acompañan y me dan fuerza con sólo pensarlos.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). En especial al programa de posgrado de Ecología marina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para mi manutención durante la realización de mi proyecto.

A mi director de tesis el Dr. Ernesto García Mendoza por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de apoyar en diferentes actividades.

A los integrantes de mi comité de tesis la Dra. Laura Gómez Consarnau, el Dr. Rafael Ramírez Mendoza y al Dr. Helmut Maske Rubach, por colaborar y aportar ideas para el desarrollo de mi proyecto.

Al Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval y al Dr. José Jesús Bustillos Guzmán del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por apoyar activa y pacientemente en los análisis experimentales.

Al Dr. Helmut Maske Rubach y su técnico César Octavio Almeda Jáuregui por el préstamo de sus instalaciones y material para la realización de mi proyecto.

A la Dra. Marcela Ovalle Marroquín técnico de FICOTOX por su apoyo en el procesamiento de mis muestras.

Al Dr. José Rigel Castañeda Quezada por su apoyo en el análisis molecular.

A la M. en C. Andrea Nicolás Chávez y Biól. Mar. Claudia Rebeca Navarrete Torices por su valioso apoyo en el traslado de mis muestras.

A la Dra. Alfonsina Eugenia Romo Curiel por sus comentarios, consejos y apoyo para la mejora de mi escrito, así como por siempre escucharme cuando necesitaba desahogarme.

A la Dra. Mary Carmen por su apoyo y asesoría en la realización de mi proyecto.

A mis amigos de siempre Valeria, Cinthya, Rosa, Nahúm y Miguel porque nunca me han soltado y siempre me escuchan, sin ustedes ningún sueño se disfrutaría igual.

A mi familia que me regaló esta aventura, Ángeles y Juan, porque siempre estuvieron académica y emocionalmente para apoyarme, sostenerme y llenarme de aventuras.

A mis amigos del laboratorio de Biología algal Michelle y Manolo, Gabriela y Miguel porque me regalaban un poquito de su tiempo para apoyarme, despejarme y divertirnos juntos.

A los amigos que me brindó Ensenada y que siempre atesoraré Ibrahim, Georgina, Mily y Nayeli nada es posible sin gente buena y linda que te acompañe.

.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 Dinoflagelados productores de toxinas paralizantes (PSTs)	4
1.1.1.1 <i>Gymnodinium catenatum</i>	7
1.1.1.2 <i>Alexandrium affine</i>	9
1.2 Justificación	12
1.3 Objetivos	14
1.3.1 Objetivo general	14
1.3.2 Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2. Metodología.....	15
2.1 Aislamiento y mantenimiento de cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>Alexandrium affine</i>	15
2.2 Crecimiento poblacional	16
2.3 Identificación molecular de <i>Alexandrium affine</i>	18
2.4 Análisis de toxinas de tipo paralizante (PSTs) en <i>G. catenatum</i> y <i>A. affine</i>	19
2.5 Análisis estadístico	19
Capítulo 3. Resultados	21
3.1 Identificación molecular de <i>A. affine</i>	21
3.2 Crecimiento poblacional de <i>A. affine</i> y <i>G. catenatum</i>	21
3.3 Análisis de PST en <i>G. catenatum</i> y <i>A. affine</i>	24
Capítulo 4. Discusión.....	27
4.1 Identificación molecular de <i>A. affine</i>	27
4.2 Crecimiento poblacional de los dinoflagelados <i>G. catenatum</i> y <i>A. affine</i>	28

4.3 Producción de PSTs en <i>G. catenatum</i> y <i>A. affine</i>	31
Capítulo 5. Conclusiones	33
Literatura citada	34

Lista de figuras

- Figura 1. Células en cadenas presentes en los cultivos de a) *Gymnodinium catenatum* y b) *Alexandrium affine*, aislados del norte del golfo de California. Foto tomada con Microscopio Leica Microsystems con objetivo 20x. 15
- Figura 2. Diseño experimental para la caracterización del crecimiento poblacional y producción de toxinas PSTs de *G. catenatum* y *A. affine*..... 16
- Figura 3. Muestras tomadas para la caracterización del crecimiento poblacional y producción de toxinas en las diferentes condiciones de cultivo para ambas especies de dinoflagelados. Se tomaron alícuotas por triplicado y un filtro por replica de matraz. 17
- Figura 4. Variación de la abundancia celular de *A. affine* mantenido en diferentes condiciones de cultivo. Las células se mantuvieron en tres temperaturas diferentes a $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LA; a-c) y $90 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LB; d-f). Se presenta el promedio más desviación estándar de tres replicas (símbolos). La línea continua representa el ajuste al modelo de crecimiento de Gompertz..... 25
- Figura 5. Variación de la abundancia celular de *G. catenatum* mantenido en diferentes condiciones de cultivo. Las células se mantuvieron en tres temperaturas diferentes a $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LA; a-c) y $90 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LB; d-f). Se presenta el promedio más desviación estándar de tres replicas (símbolos). La línea continua representa el ajuste al modelo de crecimiento de Gompertz..... 26

Lista de tablas

Tabla 1. Diferentes grupos de toxinas de tipo paralizante, agrupadas en función de sus radicales (R) y su estructura (Modificado Durán-Riveroll et al. 2013 y Band-Schmidt et al. 2019).	6
Tabla 2. Tasas de crecimiento de <i>G. catenatum</i> reportadas para cepas aisladas de diferentes localidades (sitios). Luz ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), * diferentes regiones.....	8
Tabla 3. Tasas de crecimiento (μ) de cepas de <i>A. affine</i> aislado de diferentes regiones. Luz ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).	12
Tabla 4. Secuencias del género <i>Alexandrium</i> utilizadas para el análisis de estimaciones de diferencias en los nucleótidos.	20
Tabla 5. Estimaciones de diferencias entre secuencias del género <i>Alexandrium</i>	21
Tabla 6. Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), abundancias máximas detectadas para <i>G. catenatum</i> y <i>A. affine</i> cultivados a diferentes temperaturas (17°C, 20°C y 25°C) y dos irradiancias (LA y LB). MA: Máxima abundancia, CE: crecimiento exponencial.	23
Tabla 7. Concentración relativa de los análogos de PSTs en células de <i>G. catenatum</i> cultivadas en diferentes condiciones.	24

Capítulo 1. Introducción

Los florecimientos algales nocivos (FAN) son la acumulación de biomasa algal con carácter nocivo que degradan las condiciones ambientales y generan metabolitos tóxicos (García-Mendoza et al., 2016). Los FAN pueden causar mortandades masivas de organismos silvestres y cultivados al degradar las condiciones ambientales. La producción de metabolitos tóxicos afecta tanto la salud de los organismos marinos como la salud pública al consumirse productos marinos contaminados que pueden provocar desde intoxicaciones leves hasta la muerte (Band-Schmidt et al., 2011). Las afectaciones producidas por los FAN se ven reflejadas en pérdidas económicas de actividades costeras como el turismo, la pesca y maricultura (García-Mendoza et al., 2016; López Cortés et al., 2015). Los impactos sobre la salud pública se asocian a los síndromes de intoxicación humana producidos por el consumo de mariscos. Estos síndromes son causados principalmente por biotoxinas producidas por dinoflagelados, a excepción de la intoxicación amnésica por consumo mariscos (ASP, por sus siglas en inglés) que está asociada al consumo del ácido domóico, toxina producida principalmente por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Anderson et al., 2021).

El síndrome de intoxicación por consumo de mariscos (PSP) ocurre cuando las personas consumen algún marisco contaminado con toxinas de tipo paralizante (PSTs). Las PSTs son un grupo de potentes neurotoxinas naturales solubles en agua dentro de las cuales se encuentran la saxitoxina (STX) y 57 análogos (Band-Schmidt et al., 2019; Wiese et al., 2010). Estas toxinas provocan una variedad de síntomas gastrointestinales y neurológicos debido al bloqueo en los canales de sodio, potasio y calcio que dañan el funcionamiento celular e inhiben las señales eléctricas que mantienen la actividad nerviosa y la comunicación sináptica (Cusick & Sayler, 2013; Van Dolah et al., 2001; Wiese et al., 2010). Su efecto dependerá del tipo y cantidad de toxina, pero puede causar la muerte por paro cardiorrespiratorio (Botana et al., 2016). En ambientes marinos, las PST son producidas por dinoflagelados de los géneros *Gymnodinium* (*G. catenatum*), *Pyrodinium* (*P. bahamense*) y *Alexandrium* (más de diez especies) (Band-Schmidt et al., 2019).

Los FAN son eventos recurrentes en el Golfo de California (GC) tanto en la región norte (NGC) como en la parte sur y los registros datan de 1878 (Gárate-Lizárraga et al., 2016; Streets, 1878). Algunos de estos florecimientos han causado alteraciones en el ecosistema (Band-Schmidt et al., 2019;

García-Mendoza et al., 2016) y en el NGC la principal especie formadora de FAN es *G. catenatum* (Band-Schmidt et al., 2010, 2019). Esta especie ha estado asociada a múltiples florecimientos registrados en el GC, y el Pacífico mexicano y algunos han causado afectaciones severas al ambiente, la salud humana y animal, y en la economía de la región (Band-Schmidt et al., 2010; Durán-Riveroll et al., 2019; García-Mendoza et al., 2016; Medina-Elizalde et al., 2018). También se han reportado especies del género *Alexandrium* en el GC como *A. affine* registrada en Bahía Concepción con una abundancia de 60 a 1000 x 10³ cél L⁻¹ (Band-Schmidt, Lilly L., et al., 2003; Gárate-Lizárraga et al., 2001). Esta especie se ha asociado con florecimientos de otros dinoflagelados formadores de cadenas como *G. catenatum* (Bravo, 1986; Fraga & Bakun, 1993), *Cochlodinium sp.*, y *Pheopolykrikos hartmannii* (Kim et al., 1990). Cabe resaltar que *A. affine* solo ha sido reportado en el GC por Band-Schmidt et al. (2003). Aun cuando varias especies del género *Alexandrium* son tóxicas y son causantes de PSP, *A. affine* no se consideraba como una especie productora de PST; sin embargo, es conocida por producir compuestos líticos y otros aleloquímicos (Basti et al., 2015; Hallegraeff et al., 1991; Kim et al., 2023).

En México, los casos de PSP han sido causantes de muertes humanas y se ha reconocido la afectación de al menos 460 individuos con 32 muertes (Band-Schmidt et al., 2019; Lewitus et al., 2012) (Santiago-Morales, 2016). En el NGC, los FAN de *G. catenatum* son recurrentes durante la temporada invernal lo que ha resultado en la implementación de vedas sanitarias por la acumulación de toxinas en bivalvos (Gárate-Lizárraga et al., 2004; Medina-Elizalde et al., 2018; Murillo Martínez, 2015). Los factores ambientales o biológicos que determinan la presencia de *G. catenatum* durante una temporada tan específica en el NGC no son completamente conocidas. Sin embargo, deben existir condiciones adecuadas para que la proliferación de esta especie, así como es necesaria una población autóctona de *G. catenatum* para que sus FAN se desarrollen (Hallegraeff et al., 2012). Esta especie se caracteriza por producir quistes que pueden permanecer en el sedimento y que al germinar sirven como inóculo para la proliferación de la especie (Butman et al., 2014). La distribución de quistes se relaciona con las características físicas de los sedimentos y la hidrodinámica de la región donde se encuentren (Butman et al., 2014). Para comprender la dinámica de los semilleros y el comportamiento de los quistes en el NGC, Castañeda-Quezada et al. (2021) compararon la concentración y la distribución espacial de quistes de *G. catenatum* entre una condición de presencia de FAN y cuando no se presentaba este fenómeno. Las proliferaciones se

presentan en el NGC en periodos bien definidos entre diciembre a abril (Ramírez-Castillo, 2020), debido probablemente a los semilleros de quistes presentes en esta región.

Otro factor que influye en el desarrollo de FAN en el NGC son las condiciones ambientales adecuadas para la proliferación de la especie. En invierno en el NGC la temperatura desciende de manera importante de 31-32 °C que se presentan en verano a temperaturas de hasta 15 – 17 °C (Ramírez-León et al., 2015). Esto podría representar una condición favorable para el crecimiento de *G. catenatum*. De acuerdo con Hallegraeff y Fraga (1998), la temperatura puede determinar la biogeografía de diferentes ecotipos de esta especie. *G. catenatum* es una especie que se distribuye globalmente desde aguas templadas hasta aguas tropicales (Hallegraeff et al., 2012). Se ha identificado un probable “ecotipo frío” que prolifera principalmente en temperaturas de alrededor de 12 a 18 °C mientras que el “ecotipo caliente” lo hace a temperaturas mayores de 20 °C (Band-Schmidt et al., 2004; Hallegraeff et al., 2012).

En México la mayoría de las proliferaciones de *G. catenatum* se reportan en el sur del GC y cerca del Pacífico tropical. Band-Schmidt et al. (2010), reportó que *G. catenatum* se distribuye en el Pacífico mexicano a una temperatura promedio entre 13°C y 27°C con base al análisis de registros realizados entre 1939 y 2007. Por lo tanto, *G. catenatum* presenta un rango de tolerancia a la temperatura muy amplio. Por ejemplo, Morales-Blake et al. (2000) han registrado proliferaciones de *G. catenatum* en las costas de Colima a temperaturas entre los 23 a 25 °C. Cortes-Altamirano et al. (1999) reportó la mayor abundancia de *G. catenatum* entre 20 a 21 °C en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa. Asimismo, Aguirre-Gómez et al. (1999) registró en esta misma bahía a la especie cuando hubo un incremento repentino de la temperatura (22 a 24 °C). En Bahía de La Paz la temperatura registrada durante un FAN de *G. catenatum* fue de 20.9 °C (Hernández-Sandoval et al., 2009). Por otro lado, en Puerto Libertad, Sonora, se ha reportado a la especie entre 16 °C y 17 °C (Cortes-Altamirano et al. 1999). Por lo tanto, la cepa (“ecotipo”) del NGC puede tener una afinidad a condiciones de temperatura baja en comparación a las que se distribuyen al sur de esta región. Por lo que es importante evaluar el crecimiento poblacional de cepas aisladas del NGC a diferentes temperaturas y determinar si esta variable es importante para el desarrollo de sus proliferaciones. También es importante conocer el efecto de diferentes variables ambientales en la producción de toxinas ya que esto define el potencial tóxico de una especie. Los estudios sobre el efecto de la luz en el crecimiento y producción de toxinas de los dinoflagelados son escasos. Específicamente en *G.*

catenatum los estudios sobre el efecto de la luz son casi nulos. El único trabajo sobre el efecto de la luz sobre este dinoflagelado es el de Murillo-Martínez (2015), quien encontró que el crecimiento poblacional de esta especie depende de la irradiancia ya que la mayor tasa de crecimiento (0.28 d^{-1}) así como la mayor abundancia ($5,902 \text{ cél mL}^{-1}$) se registraron en cultivos expuestos a luz alta ($350 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). También se registró que la concentración y el perfil de toxinas no presentó diferencias significativas entre diferentes irradiancias de cultivo.

Por lo tanto, en este trabajo se caracterizó el crecimiento poblacional de *G. catenatum* aislado del NGC a diferentes temperaturas e irradiancias. Durante el aislamiento de esta especie, se estableció otra cepa de un dinoflagelado potencialmente tóxico ya que se reconoció como una especie de *Alexandrium*, por lo que se caracterizó su afinidad taxonómica por métodos moleculares para identificarla a nivel de especie. Se evaluó, asimismo, el potencial tóxico (producción de PSTs) de ambas especies en diferentes condiciones de cultivo. Este trabajo aportará información sobre las condiciones ambientales que promueven la formación de FAN de especies potencialmente nocivas del NGC.

1.1 Antecedentes

De acuerdo con la Comisión oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO, aproximadamente 98 especies del fitoplancton producen toxinas, de las cuales 70 son dinoflagelados (Moestrup et al., 2006). Los dinoflagelados son organismos eucarióticos muy diversos con alrededor de 3000 especies descritas y son considerados como uno de los principales grupos de fitoplancton que contribuyen a la producción primaria global (Bravo & Figueroa, 2014).

En el océano Pacífico mexicano, se han registrado 91 géneros de dinoflagelados siendo *Gymnodinium* y *Alexandrium* de los más representativos (Delgado del Villar et al., 2021).

1.1.1 Dinoflagelados productores de toxinas paralizantes (PSTs)

Las PSTs son neurotoxinas naturales constituidas por un núcleo tetrahidropurínico y presentan un anillo fusionado en posición angular, son solubles en agua y están representadas por la saxitoxina

(STX) y 57 análogos que tienen sustituciones de diferentes radicales en la estructura principal de la toxina (Band-Schmidt et al., 2019; Wiese et al., 2010).

Las neurotoxinas pueden bloquear los canales de sodio, potasio y calcio que dañan el funcionamiento celular e inhiben las señales eléctricas que mantienen la actividad nerviosa y la comunicación sináptica (Cusick & Saylor, 2013; Van Dolah et al., 2001; Wiese et al., 2010) (Tabla 1). Las diferentes PSTs se agrupan de acuerdo con sus radicales y su estructura, y presentan una toxicidad diferente que está relacionada con el grado de afinidad con el sitio de unión en los canales de sodio (Stafford & Hines, 1995; Wiese et al., 2010).

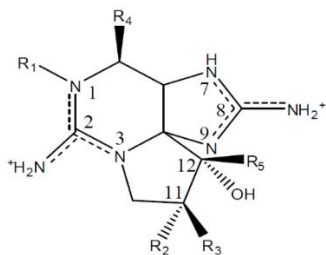
El grupo considerado el más potente son los carbamatos (saxitoxina, STX; neosaxitoxina, NEO y las gonyautoxinas, GTX1 a GTX 4) y el menos potente es el grupo de las N-sulfocarbamoilo (B1 y 2, y C1 a C4). Las toxinas decarbamoilo (dcGTX1 a dcGTX 4, dcSTX y dcNEO) exhiben toxicidades específicas intermedias (Shimizu, 2000; Wiese et al. 2010; Band-Schmidt et al. 2019; Tabla 1).

Las PST son producidas principalmente por dinoflagelados de los géneros *Gymnodinium* (*G. catenatum*), *Pyrodinium* (*P. bahamense*) y *Alexandrium* (más de diez especies) (Band-Schmidt et al., 2019). Algunos bivalvos, crustáceos, gasterópodos y peces planctívoros se alimentan de organismos productores de PSTs, por lo que acumulan las toxinas en los tejidos y son transferidas a otros organismos de la trama trófica (Medina-Elizalde et al., 2018). Cuando las personas consumen algún marisco contaminado pueden presentar síntomas del síndrome de intoxicación paralizante por consumo de mariscos (PSP), el efecto dependerá del tipo y cantidad de toxina, pero puede causar la muerte por paro cardiorrespiratorio (Botana et al., 2016). En México, el PSP ha afectado al menos a 460 individuos con 32 muertes reconocidas (Band-Schmidt et al., 2010; Bustillos-Guzmán et al., 2015; Santiago-Morales, 2016).

Para determinar y cuantificar las PST existen diferentes métodos: los métodos biológicos con bioensayos en ratón, los métodos químicos que consisten en ensayos inmunoenzimáticos, y el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Chu y Fan, 1985; Rojas de Astudillo et al. 2002). El método de HPLC es considerado el más efectivo para determinar el perfil de las toxinas PSTs, con el cual se puede evaluar la producción, transformación de estos compuestos (Hummert et al., 1997; Sullivan et al., 1985).

Tabla 1. Diferentes grupos de toxinas de tipo paralizante, agrupadas en función de sus radicales (R) y su estructura (Modificado Durán-Riveroll et al. 2013 y Band-Schmidt et al. 2019).

Toxina	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	H	OCONH2	OH
neoSTX	OH	H	H	OCONH2	OH
Mono-Sulfatadas					
GTX1	OH	H	OSO3-	OCONH2	OH
GTX2	H	H	OSO3-	OCONH2	OH
GTX3	H	OSO3-	H	OCONH2	OH
GTX4	OH	OSO3-	H	OCONH2	OH
GTX5 (B1)	H	H	H	OCONHSO3-	OH
GTX6 (B2)	OH	H	H	OCONHSO3-	OH
Di-Sulfatadas					
C1	H	H	OSO3-	OCONHSO3-	OH
C2	H	OSO3-	H	OCONHSO3-	OH
C3	OH	H	OSO3-	OCONHSO3-	OH
C4	OH	OSO3-	H	OCONHSO3-	OH
Decarbamoil					
dcSTX	H	H	H	OH	OH
dcneoSTX	OH	H	H	OH	OH
dcGTX1	OH	H	OSO3-	OH	OH
dcGTX2 *	H	H	OSO3-	OH	OH
dcGTX3	H	OSO3-	H	OH	OH
dcGTX4 *	OH	OSO3-	H	OH	OH
Desoxidecarbamoil					
doSTX *	H	H	H	H	OH
doGTX1 *	OH	H	OSO3-	H	OH
doGTX2 *	H	H	OSO3-	H	OH
Monohidroxi-benzoato					
GC1 *	H	H	OSO3-	OCOPhOH	OH
GC2 *	H	OSO3-	H	OCOPhOH	OH
GC3 *	H	H	H	OCOPhOH	OH
GC4 *	OH	H	OSO3-	OCOPhOH	OH
GC5 *	OH	OSO3-	H	OCOPhOH	OH
GC6 *	OH	H	H	OCOPhOH	OH
Dihidroxi-benzoato					
GC1a *	GC1a	GC1a	GC1a	GC1a	GC1a
GC2a *	GC2a	GC2a	GC2a	GC2a	GC2a
GC3a *	H	H	H	DHB	OH
GC4a *	OH	H	OSO3-	DHB	OH
GC5a *	OH	OSO3-	H	DHB	OH
GC6a *	GC6a	GC6a	GC6a	GC6a	GC6a
Sulfato-benzoato					
GC1b *	H	H	OSO3-	SB	OH
GC2b *	H	OSO3-	H	SB	OH
GC3b *	H	H	H	SB	OH
GC4b *	OH	H	OSO3-	SB	OH
GC5b *	OH	OSO3-	H	SB	OH
GC6b *	OH	H	H	SB	OH



La estructura química de las toxinas paralizantes es altamente polar y carece de un cromóforo sensible a la absorción de luz ultravioleta por lo que la técnica de HPLC consiste en obtener un compuesto fluorescente a través de una reacción de oxidación, la cual es detectada y cuantificada por fluorometría (Hummert et al., 1997; Yu et al. 1998). En América Latina (AL) aproximadamente 1,410 personas se han intoxicado (94 muertes) por PSP desde 1970 y hasta el 2016 (Band-Schmidt et al., 2019). *Pyrodinium bahamense* ha causado el mayor número de intoxicaciones (819 casos) entre los principales géneros de dinoflagelados productores de PSTs, seguido del género *Alexandrium* (350 casos) y finalmente *G. catenatum* con 241 casos. A pesar de las intoxicaciones y pérdidas económicas por PSP que se han reportado son pocos los países de AL que han establecido o mantenido programas de monitoreo (Band-Schmidt et al., 2019).

1.1.1.1 *Gymnodinium catenatum*

Gymnodinium catenatum es un dinoflagelado desnudo que en condiciones óptimas de crecimiento forma cadenas de entre 4, 8 o 16 células e incluso más largas (Band-Schmidt et al., 2019). El tamaño de sus células varía de 25 a 65 μm , dependiendo si son células solitarias o formadoras de cadenas (Hallegraeff y Fraga, 1998; Taylor et al. 1995). En la expedición oceanográfica de 1939 realizada por G. Allan Hancock se registró por primera vez la presencia de esta especie en el norte del GC, pero fue hasta 1943 que Herbert W. Graham la describió como especie nueva, reportando una abundancia de $1000 \times 10^3 \text{ cél L}^{-1}$ a una temperatura entre 14°C y 17°C , y salinidades entre 35.07-35.50 (Band-Schmidt et al., 2014; Graham, 1943). Otra característica importante de esta especie es que forma quistes que son transportados por las corrientes marinas, por lo que su distribución es cosmopolita (Hallegraeff y Fraga, 1998; Castañeda-Quezada et al., 2021)

G. catenatum es una especie de dinoflagelado ampliamente estudiada en México debido a los diferentes florecimientos que se han presentado en las costas del país (Band-Schmidt et al., 2019). Los primeros registros de FAN de *G. catenatum* datan de 1979. Mee et al. (1986) reportó un evento en Mazatlán, Sinaloa, que provocó la muerte de peces y la hospitalización de personas intoxicadas, incluso la muerte de tres niños. A la fecha, se han registrado 37 casos de personas intoxicadas con PST producidas por *G. catenatum* (Band-Schmidt et al., 2019). Además de los impactos a la salud pública, también se tienen registros de las pérdidas económicas que ha derivado la presencia de

FAN de esta especie. En el 2011 se registró la presencia de *G. catenatum* en San Felipe, Baja California, en el norte del GC (NGC) y se ha comprobado que es la especie responsable de la acumulación de toxinas en bivalvos en esta región (Murillo Martínez, 2015). En el NGC la producción de almeja generosa *Panopea globosa* genera aproximadamente 10 millones de dólares al año y en el 2015 se prohibió su extracción durante al menos 5 meses consecutivos por la presencia de PSTs en el molusco (COFEPRIS, 2015; Medina-Elizalde et al., 2018), dejando pérdidas millonarias para el sector productivo. En ese año se detectó una concentración de PST de hasta 16,740 $\mu\text{g STX eq kg}^{-1}$ en masa visceral, lo que representó 21 veces el del límite regulatorio (800 $\mu\text{g STX eq kg}^{-1}$) (Medina-Elizalde et al., 2018).

G. catenatum es una especie que se distribuye globalmente desde aguas templadas hasta aguas tropicales (Hallegraeff et al., 2012) y la temperatura puede determinar la biogeografía de diferentes ecotipos de la especie (Hallegraeff y Fraga 1998). Las temperaturas óptimas de crecimiento varían dependiendo si son condiciones naturales o de laboratorio (Hallegraeff et al., 2012). Las tasas de crecimiento de *G. catenatum* caracterizadas bajo distintas condiciones ambientales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tasas de crecimiento de *G. catenatum* reportadas para cepas aisladas de diferentes localidades (sitios). Luz ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), * diferentes regiones.

Sitio	Temperatura (°C)	Luz	Fotoperiodo L:O	μ (d^{-1})	Referencia
España	22 - 28	150	14:10	0.5	Bravo & Anderson (1994)
España	18	180	12:12	0.25-0.30	Flynn et al. (1996)
Tasmania	18	180	12:12	0.24	Doblin et al. (1999)
Bahía Hiroshima	18-25	180	12:12	0.25-0.34	Yamamoto et al. (2002)
Bahía Concepción, B. C. S.	21 - 29	150	12:12	0.18 - 0.21	Band-Schmidt et al. (2004)
Sur del GC*	20	150	12:12	0.7-0.82	Band-Schmidt et al. (2006)
Japón	18 y 25	100	12:12	0.25-0.34	Oh et al. (2010)
Bahía Concepción, B. C. S.	20	150	12:12	0.20 - 0.24	Bustillos-Guzmán et al. (2012)
Costa del Pacífico mexicano*	21 - 31	150	12:12	0.04 - 0.3	Band-Schmidt et al. (2014)
Bahía de La paz y Bahía de Mazatlán	21	120	12:12	0.09 – 0.32	Hernández-Sandoval et al. (2022)

Band-Schmidt et al. (2014) observaron una variación en la tolerancia a la temperatura para ocho cepas de *G. catenatum* aisladas de diferentes costas de México, cinco toleraron temperaturas bajas (16 °C) con tasas de crecimiento de 0.1 d⁻¹ y dos más toleraron hasta 33 °C (0.09 y 0.16 d⁻¹). Estos mismos autores observaron diferencias en las abundancias celulares máximas a diferentes temperaturas, a 16 °C fue menor a 2,000 células mL⁻¹ y sólo un aislado de Bahía de La Paz alcanzó una abundancia celular máxima de 2,681 células mL⁻¹. En contraste, a 21°C la abundancia fue mayor para las cepas de la Bahía de La Paz (4537 células mL⁻¹) y un aislado de Bahía de Mazatlán (5,503 células mL⁻¹). Además, se observó un efecto de la temperatura sobre la longitud de la cadena ya que a 24 °C hubo mayor porcentaje de cadenas de dos células (32 %), de cuatro células (9%) y hasta 10 células. También el perfil de toxinas varió respecto a la temperatura, pero no existió correlación entre toxicidad celular (de 0.25 a 2.31 pg STXeq cél⁻¹) y la temperatura o tasa de crecimiento.

De acuerdo con Cortes-Altamirano et al. (1999), la temperatura tiene una influencia significativa en el desarrollo de los FAN de *G. catenatum*. En el norte del Golfo de California los FAN de *G. catenatum* han sido recurrentes desde el 2015 y se presentan durante la temporada de invierno, por lo que se han implementado vedas sanitarias asociadas a la acumulación de toxinas (Medina-Elizalde et al., 2018). Morales-Blake et al. (2000) han registrado la presencia de *G. catenatum* en las costas de Colima en un rango de temperatura de 23 a 25 °C. Band-Schmidt et al. (2010) realizaron una revisión sobre los registros de *G. catenatum* en el Pacífico mexicano entre 1939 y 2007, y reportan que la temperatura a la que se distribuye la especie es entre 13 °C y 27 °C, con tasas de crecimiento 0.08-0.82 d⁻¹. Por lo tanto, esta especie presenta un rango de tolerancia a la temperatura muy amplio.

Otra variable importante que modula el metabolismo energético en las microalgas es la luz, ya sea el nivel de luz o la duración del fotoperiodo (Brand & Guillard, 1981; Burson et al., 2018; Edwards et al., 2015).

1.1.1.2 *Alexandrium affine*

A. affine es un dinoflagelado tecado formador de FAN, descrito por primera vez en Japón por Fukuyo et al. (1985). Esta especie forma cadenas de 2 a 8 células, pero se han observado cadenas de hasta 16 células (Band-Schmidt et al., 2003). Posteriormente se determinó que su área de distribución comprende aguas tropicales hasta el Ártico (Lee et al., 2021). Los florecimientos de *Alexandrium*

affine se han asociado comúnmente con florecimientos de otros dinoflagelados formadores de cadenas como *Cochlodinium sp.* y *Pheopolykrikos hartmannii* (Kim et al., 1990) y de *Gymnodinium catenatum* (Bravo, 1986; Fraga & Bakun, 1993), e incluso en Corea se observó que esta especie aparece después de la terminación de los florecimientos de diatomeas (Lee et al., 2020; Lim et al., 2019). En el GC *A. affine* y *G. catenatum* proliferan cuando inicia la estratificación y cuando las condiciones hidrográficas se caracterizan por un aumento de la temperatura del agua (Band-Schmidt et al., 2003). En países asiáticos los florecimientos de esta especie se presentan durante todo el año (Kim et al., 2019; Lee et al., 2019; Subong et al., 2017). La presencia de *A. affine* se ha asociado a florecimientos dominados por *G. catenatum* en Bahía Concepción, BCS, y se ha presentado durante la primavera y principios del verano. En esta localidad se ha reportado con una abundancia de 60 a 1000 x 10³ céls L⁻¹ (Band-Schmidt et al., 2003; Gárate-Lizárraga et al., 2001).

Se han caracterizado las tasas de crecimiento, el tamaño de las células y de cadenas, el contenido de clorofila y la fotosíntesis bajo diversas condiciones de cultivo de *A. affine* (Tabla 4) aislado de diferentes regiones del mundo (Band-Schmidt et al., 2003; Kim et al., 2023). Nguyen Ngoc et al. (2004) caracterizaron el crecimiento de *A. affine* a 30 y 35 de salinidad y a 24 y 27 °C y obtuvieron tasas de crecimiento entre 0.5 a 0.7 d⁻¹, así como valores de toxicidad muy bajos comparados con otras especies productoras de PSTs. Esta especie produce 2.28 fmol cél⁻¹ por lo que se sugiere que puede ser una especie tóxica sólo bajo ciertas condiciones. Kim et al. (2023) cultivaron tres especies de *Alexandrium* (*A. catenella*, *A. pacificum* y *A. affine*) a diferentes condiciones de temperatura y encontraron que el mayor contenido de toxinas de *A. affine* se presentó a 16 °C (0.8 fmol cél⁻¹), pero no observaron diferencias significativas en el total de STX a 20, 24 y 27 °C. En general, los niveles de PSTs de *A. affine* fueron más bajos que los de *A. catenella* y *A. pacificum*. *A. affine* presentó toxinas decarbamoilo principalmente (dcGTX2 y dcSTX) y C2 en todas las temperaturas probadas. La dcGTX2 representó el 75 % de las PSTs en muestras a 20 °C y 27 °C, y en 24 °C las dcGTX2 y dcSTX representaron el 34 % y el 29 %, respectivamente.

También se detectó GTX4 (56 %) a 16 °C, con niveles bajos de dcGTX2 (9 %) y dcSTX (6 %). Sin embargo, hasta el momento este es el único trabajo donde se ha corroborado la toxicidad de esta especie bajo condiciones ambientales, aunque los valores de toxicidad son muy bajos, por lo que es poco probable que cause incidentes de intoxicación.

Lim et al. (2007) caracterizó el crecimiento de *A. affine* aislado de Malasia y no observó crecimiento a 15°C, pero sí entre 20 a 25 °C. Sugieren que las poblaciones templadas del género *Alexandrium* toleran amplios rangos de temperatura, pero las poblaciones tropicales no crecen a temperaturas frías. En contraste, *A. affine* aislado del GC tolera temperaturas que van desde los 15 °C hasta los 35 °C, y la tasa óptima de crecimiento (0.25 a 0.34 d⁻¹) fue entre los 20 a 30 °C, mientras que la luz no influyó significativamente en su crecimiento (Band-Schmidt et al., 2003). Por otro lado, Lim et al. (2019) reportaron un crecimiento similar de *A. affine* a temperaturas entre los 15 a 30 °C y salinidades de 20 a 32, las tasas más altas de crecimiento se presentaron a 25 °C (0.43 d⁻¹) y a 30 °C (0.35 a 0.39 d⁻¹), pero no se observó crecimiento a 15 °C por lo que sugieren que *A. affine* tiene una preferencia por altas temperaturas.

La luz y su variación, es necesaria para la fotosíntesis, influye en la división celular y la formación de cadenas de los dinoflagelados. Los efectos del nivel de luz sobre la respuesta fotosintética y la tasa de crecimiento han sido investigados en varias especies del género *Alexandrium* (Sullivan et al., 2003). Lee et al. (2019) en experimentos de *A. affine* expuesto a 20 °C y 100 μmol fotones m⁻² s⁻¹ bajo dos fotoperiodos luz:oscuridad (14:10) y otro de luz continua (24:00), identificaron tasas de crecimiento similares para los dos fotoperiodos (0.425 d⁻¹ y 0.405 d⁻¹, respectivamente), así como un crecimiento rápido que pasaba de las ~ 100 cél mL⁻¹ (día cero) hasta ~ 5,000 cél mL⁻¹ (día 10) en ambas condiciones. Por otro lado, Change y McClean (1997) reportaron que *A. minutum* presentó una tasa de crecimiento de 0.5 d⁻¹ a una irradiancia de 100 μmol m⁻² s⁻¹ y con una concentración de NO₃ de 200 μM. Hui et al. (2019) observaron que la tasa de crecimiento de *A. minutum* y *A. catenella* varió con la duración del fotoperiodo (8:16, 16:8 y 24:0). *A. minutum* presentó una tasa de crecimiento de 0.37 d⁻¹ a 24:0 y esta aumenta con una exposición a luz más baja (8:16) con una tasa de crecimiento de 1.01 a 1.38 d⁻¹.

En contraste, *A. catenella* presentó de una tasa más alta (0.76 d⁻¹) con un fotoperiodo más largo (24:0). A mayor irradiancia el diámetro celular de *A. catenella* aumenta, la irradiancia óptima de crecimiento de esta especie es de 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (Laabir et al., 2011). Se ha considerado que el género *Alexandrium* está adaptado a altas irradiancias de entre 100 y 800 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (Smayda, 2008). Sin embargo, hasta el momento el único trabajo publicado sobre *A. affine* en México es el de Band-Schmidt et al. (2003).

Tabla 3. Tasas de crecimiento (μ) de cepas de *A. affine* aislado de diferentes regiones. Luz ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Sitio	Temperatura	Luz	Fotoperiodo	μ (d^{-1})	Referencia
	($^{\circ}\text{C}$)		L:O		
Corea	15–30	100	12:12	0.43	Lim et al. (2019)
Corea	20	100	14:10	0.42	Lee et al. (2019)
Corea	20	100	Luz continua	0.4	Lee et al. (2019)
-	25	-	-	0.59	Jung et al. (2010)
-	22	120	16:08	0.9	Lee et al. (2009)
Malasia	15–25	150	15:09	0.37	Lim et al. (2007)
Vietnam	21–27	25	12:12	0.49	Nguyen-Ngoc (2004)
México	5–30	230	10:14	0.34	Band-Schmidt et al. (2003)

Aunque el potencial de producir PSTs es bajo y no se han detectado afectaciones a la salud pública de *A. affine*, esta especie puede tener un impacto sobre el sector productivo y la salud de los ecosistemas (Kim et al., 2023; Nguyen-Ngoc, 2004). Se ha documentado que FAN de esta especie han afectado a otras especies. Un FAN de *A. affine* ocasionó la mortalidad del pargo japonés *Pagrus major* al afectar su respiración, y una inmunosupresión inducida e insuficiencia hepática (Haque et al., 2021). Por otro lado, Basti et al. (2015) observaron actividad lítica altamente potente sobre huevos fertilizados, embriones tempranos y en larvas trocóforas de la ostra perlera *Pinctada fucata martensii*, además de una disminución en la motilidad de las larvas. También se observó obstaculización de los movimientos de la concha del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Kim et al., 2017). Haque et al. (2021) estimularon el sistema inmunológico de la dorada *Pagrus major* al exponerla a *A. affine* e indujo citotoxicidad especialmente en los tejidos branquiales.

1.2 Justificación

El Golfo de California se caracteriza por ser una zona de alta producción primaria y es considerada la zona pesquera más importante en México (Band-Schmidt, 2016). El NGC está delimitado por las costas de Baja California, Sonora y en la parte norte por la desembocadura del Río Colorado (Lavín et al., 1998). Los registros de florecimientos algales en el GC datan de 1878 (Streets, 1878); sin

embargo, son pocos los registros y estudios de estos eventos, y no se ha caracterizado la fisiología y potencial nocivo de especies formadoras de FAN aisladas de NGC.

La distribución de especies formadoras de FAN, y específicamente las productoras de PSTs es cada vez más amplia y ha estado asociado a un aumento en la intoxicación de humanos y organismos marinos en diferentes zonas costeras del país (Band-Schmidt et al., 2019; García-Mendoza et al., 2016). Asimismo, la presencia de estas especies ha afectado drásticamente las actividades pesqueras y acuícolas.

Los estudios con cultivos de *G. catenatum* enfocados en caracterizar el crecimiento y la producción de PSTs en diferentes condiciones de temperatura, salinidad, limitación de nutrientes y efecto de la luz se han realizado con aislados de la parte centro-sur del GC (Band-Schmidt et al., 2019). *G. catenatum* es una especie que se distribuye globalmente desde aguas templadas hasta aguas tropicales (Hallegraeff et al., 2012) y la temperatura puede determinar la biogeografía de diferentes ecotipos (Hallegraeff & Fraga 1998). Algunos autores mencionan la clasificación de las poblaciones de *G. catenatum* en diferentes ecotipos de acuerdo con su tolerancia a la temperatura, Hallegraeff et al. (2012) menciona que esta especie presenta dos ecotipos, uno donde se encuentran poblaciones tropicales (México, Tailandia, Filipinas, Singapur) y un segundo ecotipo templado (España, Japón, Tasmania). En cultivo las cepas del ecotipo templado presentan un óptimo de crecimiento entre los 12-18 °C, pero las poblaciones tropicales muestran una tolerancia de temperatura entre 29-30 °C, en el caso particular de las cepas mexicanas han mostrado una amplia tolerancia en un rango entre los 11.5-30 °C (con un óptimo entre los 21-29 °C). Por otro lado, Liu et al. (2020) sugiere un ecotipo moderado ya que algunos florecimientos de *G. catenatum* en el norte del GC, el sur de Tasmania y Galicia, España (Graham, 1943; Monitoreos FICOTOX-CICESE), se han registrado con temperaturas del agua entre 12 °C y 17 °C, por lo tanto, se podría tratar de poblaciones de ecotipos de aguas frías.

Recientemente se han registrado FAN de este dinoflagelado en la región de San Felipe, B. C. principalmente durante la temporada de invierno y ha sido responsable de la acumulación de toxinas en bivalvos de esa zona (Medina-Elizalde et al., 2018; Murillo Martínez, 2015), lo que sugiere que la población pertenece al ecotipo frío.

Por ello es necesario conocer el de crecimiento poblacional de *G. catenatum* aislado del NGC, así como evaluar su potencial tóxico a diferentes temperaturas. Así mismo, se caracterizó su crecimiento y el potencial tóxico a distintas intensidades de luz para comprender los factores que influyen en la aparición de FAN en la región.

Por otro lado, el género *Alexandrium* es conocido por las diferentes afectaciones en el mundo ya que es el principal productor de saxitoxina (Band-Schmidt et al., 2019). Se aisló una especie de este género de NGC, por lo que se identificó a nivel de especie por medio de aproximaciones moleculares y se caracterizó el crecimiento, así como su potencial tóxico, en diferentes condiciones de irradiancia y la temperatura.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar el crecimiento poblacional y potencial tóxico a diferentes temperaturas e irradiancias de cepas de *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium affine* aisladas del norte del Golfo de California.

1.3.2 Objetivos específicos

Caracterizar el crecimiento poblacional de cepas de *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium affine* aisladas del norte del Golfo de California a diferentes temperaturas e irradiancias

Describir la concentración celular de toxinas PST de *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium affine* aisladas del norte del Golfo de California cultivados a diferentes temperaturas e irradiancias

Capítulo 2. Metodología

2.1 Aislamiento y mantenimiento de cultivos de *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium affine*

Ambas especies de dinoflagelado fueron aisladas del norte del Golfo de California. La cepa de *Gymnodinium catenatum* (Figura 1a) fue aislada previamente por personal del Laboratorio de Biología Algal del CICESE. Se aisló una especie del género *Alexandrium* en diciembre de 2021 la cual se identificó molecularmente (Figura 1b). Para el aislado se utilizó la técnica del capilar que consiste en tomar una célula con un filamento bajo el microscopio y transferir a medio de cultivo estéril (Andersen, 2005).

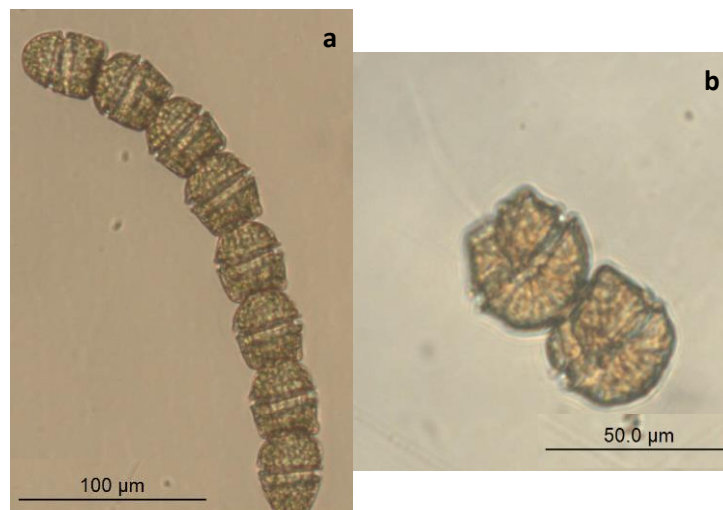


Figura 1. Células en cadenas presentes en los cultivos de a) *Gymnodinium catenatum* y b) *Alexandrium affine*, aislados del norte del golfo de California. Foto tomada con Microscopio Leica Microsystems con objetivo 20x.

Las cepas se mantuvieron en matraces de 125 mL a 20°C en medio f/2, con una irradiancia de $\sim 200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 h. El volumen de cultivo se escaló a matraces de 250 mL para realizar experimentos de evaluación del crecimiento y producción de PSTs a diferentes temperaturas y dos irradiancias. Estas variables se caracterizaron en cultivo mantenidos a 17, 20 y 25 °C, y dos irradiancias de 90 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz baja; LB) y 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

¹ (luz alta; LA) (Figura 2). Se realizaron cultivos por triplicado y las células fueron aclimatadas por al menos tres generaciones en cada condición.

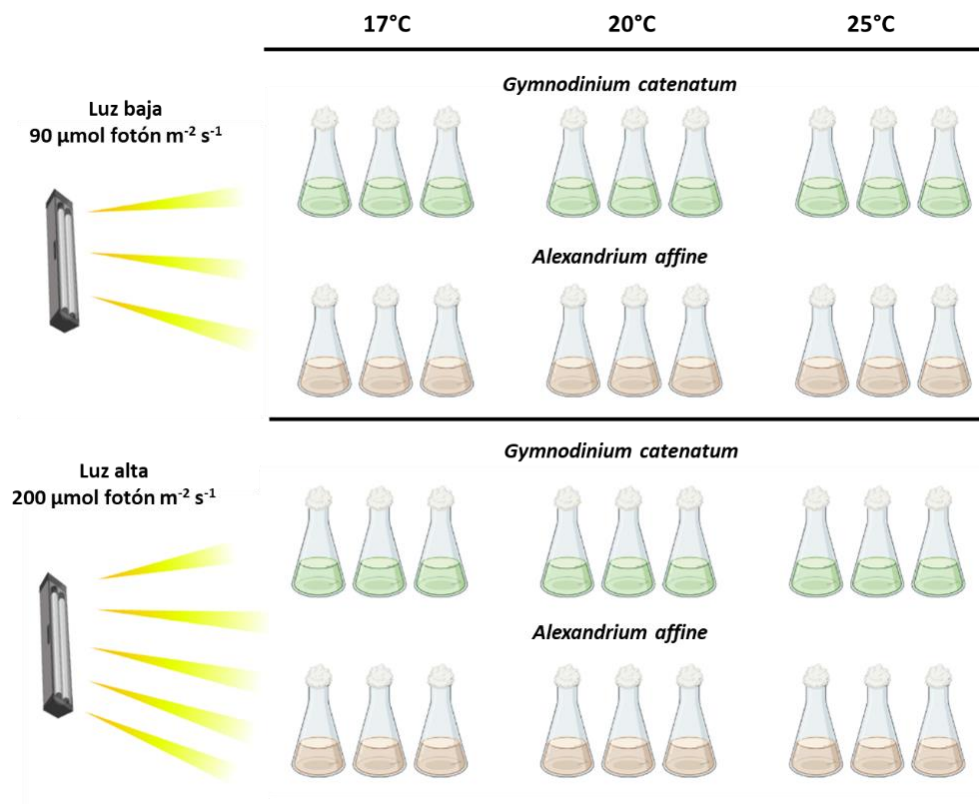


Figura 2. Diseño experimental para la caracterización del crecimiento poblacional y producción de toxinas PSTs de *G. catenatum* y *A. affine*.

2.2 Crecimiento poblacional

Se caracterizó la curva de crecimiento poblacional de cultivos mantenidos en las condiciones descritas en la sección anterior. En cada tratamiento se utilizaron matraces de 250 mL de capacidad con 180 mL de medio de cultivo f/2. Una vez aclimatadas las células se añadió 20 mL de inóculo al matraz y se mantuvo en un fotoperiodo de 12:12 hr Luz:Oscuridad. Cada dos días se tomaron alícuotas de 1.5 mL por triplicado. Estas se fijaron con Lugol-acetato para posteriormente realizar conteos celulares en una cámara de Sedwick Rafter siguiendo la técnica de Guillard & Sieracki (2005). Se utilizó un microscopio de luz invertido LEICA DM13000B 10x (Leica Microsystems, Alemania).

La tasa de crecimiento (μ) se estimó entre los periodos de muestreo durante el desarrollo de los cultivos expuestos a cada tratamiento. El cálculo se hizo utilizando la ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1},$$

en donde μ es la tasa de crecimiento específica, t es el periodo de tiempo en días entre tiempo 1 (t_1) y tiempo 2 (t_2), X_1 es la abundancia celular en el t_1 , y X_2 es la abundancia celular en el (t_2). La tasa de crecimiento máxima se calculó para el periodo de crecimiento exponencial durante cada condición de cultivo.

Para evaluar la producción de toxinas en las diferentes condiciones de cultivo para ambas especies de dinoflagelados se realizaron cultivos en los diferentes tratamientos a un volumen de 1 L de capacidad. Se agregaron 950 mL de medio f/2 y 50 mL de inoculo. De estos cultivos se tomaron dos muestras: 1) una alícuota por triplicado de 1.5 mL que se fijó con Lugol para su posterior conteo y 2) una alícuota de 50 mL para el análisis de toxinas PSTs. Las células se concentraron por filtración utilizando filtros GF/F de 25 mm de diámetro y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis (Figura 3).

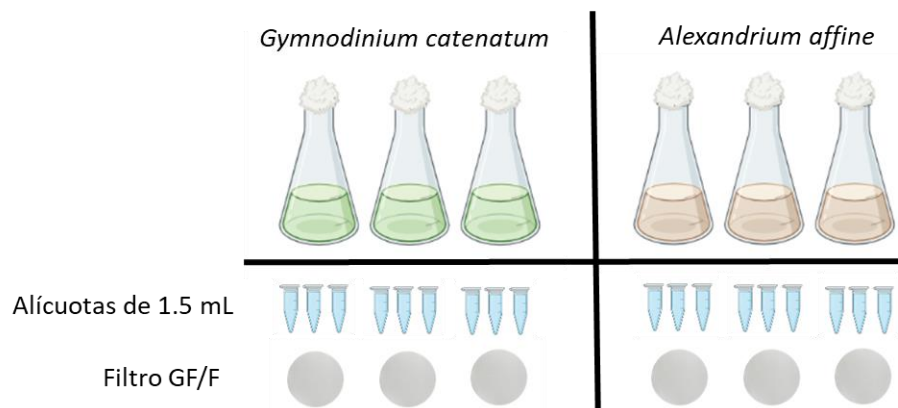


Figura 3. Muestras tomadas para la caracterización del crecimiento poblacional y producción de toxinas en las diferentes condiciones de cultivo para ambas especies de dinoflagelados. Se tomaron alícuotas por triplicado y un filtro por replica de matraz.

2.3 Identificación molecular de *Alexandrium affine*

La extracción de ADN para la identificación molecular de *A. affine* se hizo mediante la concentración de 200 mL de cultivo por centrifugación a 3,500 rpm por quince minutos.

La homogenización y lisis de las células se realizó al exponer las células a nitrógeno líquido por un minuto. Posteriormente se incubaron con el buffer AE a 65 °C por 10 min y para lisar completamente las células se agitaron con microperlas en vortex durante dos minutos. La extracción del ADN de las células se hizo con el kit DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. Finalmente, la cuantificación del ADN se realizó en NanoDrop™ 2000 de Thermo Fisher Scientific.

Las reacciones para el análisis de PCR se prepararon usando el kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustaron las reacciones a 20 µL. La reacción para el segmento ITS 1-5.8S-ITS2 del rDNA quedó con las siguientes concentraciones: 4 µL de Buffer 5x, 2.4 µL de MgCl 25 mM, 0.4 µL de dNTP's 10 mM, 0.1 µL de GoTaq®, 0.4 µL de Primers c/u, 3 µL de templado (~20 ng/µL), y 9.3 µL de agua Milli-Q®.

Para las reacciones se utilizó un termociclador T100™ BIO-RAD®. Se utilizaron las siguientes condiciones para cada reacción de PCR de amplificación: la región de los ITS (ITS 1-5.8S-ITS2) se amplificaron a 95 °C durante 2 min, 10 ciclos de 95 °C por 50 s, 58 °C por 40 s, 72 °C por 30 s, luego 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 50 °C por 45 s, 72 °C por 60 s, con una extensión final a 72 °C durante 5 min, utilizando los cebadores (*primers*) ITSa: CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGG(ACT)TCCGTAGGT, e ITSb: CCTGCAGTCGACA(GT)ATGCTTAA(AG)TTCAGC(AC)GG descritos por John et al. (2014). Finalmente, los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1% con buffer TBE y 3 µL de HyperLadder™ como DNA Ladder. El gel se visualizó en ChemicDoc™ de BIO-RAD®. Los productos de PCR obtenidos se purificaron y secuenciaron mediante tecnología Sanger, en la compañía Retrogen, Inc., San Diego, California, EEUU.

Con la finalidad de identificar taxonómicamente la cepa aislada del NGC, se editó y realizó una matriz de distancias en MEGA11 (Tamura et al., 2021), junto a las secuencias recuperadas del GenBank por medio de Blastn (NCBI Resource Coordinators, 2018). Ello con la finalidad de determinar las diferencias en los nucleótidos. El análisis involucró 15 secuencias de diferentes géneros de

Alexandrium (Tabla 4). La estimación de distancia se realizó con el modelo de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura et al., 2004). Hubo un total de 636 posiciones en el conjunto de datos final.

2.4 Análisis de toxinas de tipo paralizante (PSTs) en *G. catenatum* y *A. affine*

Para la extracción de toxinas de tipo paralizante los filtros obtenidos de cada tratamiento de ambas especies fueron procesados en el Laboratorio de FICOTOX del CICESE. La disrupción mecánica de cada filtro se realizó con perlas de zirconia en microtubos tipo Eppendorf de 2 mL y se adicionaron 2 mL de ácido acético al 0.03 N. Las muestras se homogeneizaron dos veces en el Bead beater (Bead beater, Biospec Inc) por 20 segundos a 5000 rpm, entre cada repetición se mantuvieron en enfriamiento. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a 4 °C, finalmente el sobrenadante se recuperó para la determinación de PST.

Este extracto fue analizado en el Laboratorio Microalgas nocivas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. en la ciudad de La Paz, BCS, siguiendo el protocolo utilizado en Hernández-Sandoval et al. (2022). Este protocolo consiste en pasar el sobrenadante a través de una jeringa (25 mm de diámetro) con filtros de fibra de vidrio (0.45 µm de tamaño de poro). Para hidrólisis, cada extracto se mezcló con HCl 1N y se calentó con un bloque de cabeza durante 15 min a 90 °C para convertir el N-sulfocarbamoilo toxinas a sus correspondientes toxinas carbamatadas. Después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras se neutralizaron CH₃COONa 1N. Los extractos hidrolizados y no hidrolizados fueron inyectados en un cromatógrafo de líquidos HPLC en corridas independientes para identificar y cuantificar PSTs.

2.5 Análisis estadístico

La variación de la abundancia celular de *G. catenatum* y *A. affine* se graficó con respecto al tiempo de cultivo. Posteriormente, mediante una regresión lineal se calculó la tasa máxima de crecimiento utilizando solo los datos de la fase del crecimiento exponencial.

Para evaluar si hubo diferencias significativas en el efecto de la temperatura e irradiancia sobre las tasas de crecimiento en cada uno de los tratamientos por especie se aplicó un análisis de varianza

de dos vías (ANOVA). Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA v.7.1 (StatSoft, Inc.) y Sigma Plot 13. En todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Tabla 4. Secuencias del género *Alexandrium* utilizadas para el análisis de estimaciones de diferencias en los nucleótidos.

Clave	Cepa	Sitio
MN752257	JP88-2	Corea
AB565485	KAGAWA-37	Japón
JF906996	AC-1	China
JF906997	AS-1	China
OM850688	ZW3	China
OM850685	ZW8	China
JF521618	CCMP112	España
AY831409	CCMP_112	España
KX599340	CCMP_112_subclone_2	España
JF521616	AABB01/01	Australia
MW443022	AABG01	China
MW443023	AABG02	China
DQ444290	CCMP1719	E. U. A.
MN752259	JP55-1-10	-

Capítulo 3. Resultados

3.1 Identificación molecular de *A. affine*

Los resultados obtenidos de la estimación de distancia entre secuencias del género *Alexandrium* (Tabla 5), corroboraron la identidad de la cepa del dinoflagelado aislado del NGC como *A. affine*. Al compararla con cepas de Corea (MN752257), Japón (AB565485) y China (JF906996, JF906997, OM850688, OM850685) la diferencia entre ellas fue mínima (<0.0098), pero resulta ligeramente mayor (>0.0114) con cepas de España, Australia y China.

Tabla 5. Estimaciones de diferencias entre secuencias del género *Alexandrium*.

Especie	Clave	Sitio	Diferencia
<i>A. affine</i>	MN752257	Corea	0.00490
	AB565485	Japón	0.00000
	JF906996	China	0.00490
	JF906997	China	0.00653
	OM850688	China	0.00816
	OM850685	China	0.00978
	JF521618	España	0.01149
	AY831409	España	0.01149
	KX599340	España	0.01314
	JF521616	Australia	0.01314
	MW443022	China	0.01487
	MW443023	China	0.01157
<i>A. fundyense</i>	DQ444290	E. U. A.	0.41713
<i>A. catenella</i>	MN752259	-	0.47985

Por último, al compararla con otras dos especies del mismo género, *A. fundyense* y *A. catenella*, la diferencia fue considerablemente mayor (0.417 y 0.479, respectivamente), se ha propuesto un valor de > 0.04 para diferenciar entre especies de dinoflagelados de vida libre (Litaker et al., 2007). Por lo que estas diferencias en los nucleótidos superan significativamente a los diferentes géneros de *Alexandrium*.

3.2 Crecimiento poblacional de *A. affine* y *G. catenatum*

A. affine creció en todas las condiciones de cultivo probadas. La especie presentó un tiempo de

acondicionamiento relativamente corto de aproximadamente cuatro días. La abundancia celular se duplicó entre el día dos y cuatro en todos los tratamientos. En el tratamiento de LA en 17 °C se presentó la mayor abundancia celular (8,036 cél mL⁻¹) e incluso la abundancia fue mayor a 4,500 cél mL⁻¹ hasta el día 30 (Figura 4a). Esto fue una duración mucho mayor comparado con las otras dos temperaturas del mismo tratamiento donde las curvas sólo se mantuvieron hasta el día 20. La fase de crecimiento exponencial a 17 °C (LA) fue del día dos (644 cél mL⁻¹) hasta el día 20 (8,036 cél mL⁻¹). A los 20 °C y 25 °C el crecimiento exponencial se observó entre los primeros siete y cinco días, respectivamente. El crecimiento en estas dos últimas temperaturas presentó un descenso rápido de la abundancia aproximadamente en el día 14 (20 °C) y 12 (25 °C). La fase estacionaria fue muy corta o nula en estas temperaturas (Figura 4 b-c) y se detectó una abundancia máxima de 4,992 cél mL⁻¹ (20 °C) y 6,601 cél mL⁻¹ (25 °C).

Por otro lado, en los tratamientos de LB para *A. affine* a 17 °C se observó el crecimiento exponencial a partir del día cuatro y la caída del cultivo en el día 18 y no se observó una fase estacionaria. La densidad máxima en esta condición fue de 5,844 cél mL⁻¹ en el día 14. En 20 °C (Figura 4e) se registró la mayor abundancia celular (8,927 cél mL⁻¹) en el día 20 y la caída del cultivo a partir del día 24. A 25 °C se obtuvo la mayor abundancia (11,323 cél mL⁻¹) en comparación con el resto de los tratamientos (Tabla 4). En general, la fase de crecimiento exponencial se presentó entre el día dos y el 12 en los tratamientos de luz baja. En esta condición el comportamiento de los cultivos fue más estable; es decir, no se observaron descensos rápidos y abruptos en el crecimiento en comparación con los de LA y los tratamientos no disminuyeron a una abundancia menor a las 3,000 cél mL⁻¹.

El crecimiento poblacional de *G. catenatum* se evaluó en las mismas condiciones de cultivo que *A. affine*. En contraste con esta especie, *G. catenatum* no creció a 17 °C con una irradiancia de 90 µmol fotones m⁻² s⁻¹. Asimismo, se observó una mayor variabilidad entre replicas en comparación con los resultados obtenidos con *A. affine* (Figura 5 d-f). *G. catenatum* presentó un periodo de acondicionamiento de hasta seis días en los tratamientos de LB y en LA. En todos los tratamientos la abundancia celular no superó las 2,500 cél mL⁻¹, en 25 °C (LA) se obtuvo la menor densidad ~500 cél mL⁻¹ al resto de los tratamientos. La mayor abundancia celular fue en 20 °C en ambas irradiancias con aproximadamente 2,000 cél mL⁻¹ (Figura 5e). En LB la mayor abundancia fue de 2,080 cél mL⁻¹ y se observaron cadenas en su mayoría de 4-6 células desde el día seis hasta el día 18, característica que no se observó en el resto de los tratamientos. En 25 °C en ambas irradiancias los cultivos no

duraban más de 20 días y las máximas abundancias fueron de 523 cél mL⁻¹ (LA) y 1,466 cél mL⁻¹ (LB). Se evaluó la formación de cadenas en los tratamientos de ambas especies. *A. affine* formó cadenas de dos células del día cero al día 20 a 17 °C (LA), a 20 °C (LB) las cadenas se presentaron rara vez durante el crecimiento del cultivo. En el resto de los tratamientos no se observaron cadenas. Por otro lado, *G. catenatum* formó cadenas en todos los tratamientos, predominando las de dos células. A 17 °C (LA) predominaron estas cadenas durante todo el tratamiento, a 20 °C (LA) se observaron cadenas de 4 a 8 células y en LB aparecieron en el día 6 cadenas de 2 a 4 células. Finalmente, a 25 °C (LB) se registraron cadenas de 2 a 8 células y en LA se observaron cadenas de 2 a 4 células a partir del día 10. Las tasas de crecimiento de *A. affine* en todos los tratamientos fueron entre 0.20 a 0.49 d⁻¹ (Tabla 6).

Tabla 6. Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), abundancias máximas detectadas para *G. catenatum* y *A. affine* cultivados a diferentes temperaturas (17°C, 20°C y 25°C) y dos irradiancias (LA y LB). MA: Máxima abundancia, CE: crecimiento exponencial.

Especie	Tratamientos	LA			LB		
		$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	MA (cél mL ⁻¹)	CE (días)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	MA (cél mL ⁻¹)	CE (días)
<i>A. affine</i>	17 °C	0.2	8,036	2 – 20	0.31	5,844	4 – 14
	20 °C	0.28	4,992	0 – 12	0.21	8,927	6 – 20
	25 °C	0.49	6,601	0 – 8	0.38	11,323	2 – 12
<i>G. catenatum</i>	17 °C	0.21	1,200	4 – 20	--	--	--
	20 °C	0.33	2,093	12 – 20	0.38	2,080	6 – 16
	25 °C	0.39	523	2 – 10	0.29	1,466	6 – 14

Las tasas de crecimiento más altas de *A. affine* se presentaron a 25 °C en LA (0.49 d⁻¹) y LB (0.38 d⁻¹). En este último tratamiento se obtuvo la mayor abundancia celular (11,323 cél mL⁻¹). La μ más baja se detectó a 17°C en LA (0.20 d⁻¹) y en LB a 20 °C (0.21 d⁻¹). *G. catenatum* presentó las tasas de crecimiento más altas a 20°C en LB (0.38 d⁻¹) y 0.39 d⁻¹ a 25 °C en LA. Las tasas de crecimiento menores se registraron a 17 °C (LA) y a 25 °C (LB). Cabe señalar que, siempre se observaron cadenas a 20 °C en ambas irradiancias, pero en LB predominaron de cuatro y seis células. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) de las tasas de crecimiento de ambos dinoflagelados a diferentes temperaturas e irradiancias para *A. affine* (n= 6) y *G. catenatum* (n=5).

3.3 Análisis de PST en *G. catenatum* y *A. affine*

La concentración y perfil de PST se caracterizó en cultivos de *G. catenatum* y *A. affine* durante la fase de crecimiento exponencial en todos los tratamientos de LA y LB en las tres temperaturas (17 °C, 20 °C y 25 °C). Se calculó el porcentaje de cada análogo (Tabla 7), respecto a la concentración total de PSTs medida en *G. catenatum* cultivado en los diferentes tratamientos.

Tabla 7. Concentración relativa de los análogos de PSTs en células de *G. catenatum* cultivadas en diferentes condiciones.

Tratamientos	Análogos de PSTs (%)								Total	
	GTX2	GTX3	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	B 1	C 1	C 2		
LA	17 °C	0.09	0.68	0.10	0.81	2.44	0.06	2.35	93.46	100
	20 °C	0.13	1.50	0.22	1.72	3.59	0.08	2.63	90.13	100
	25 °C	0.11	0.79	0.12	0.96	2.97	0.12	1.21	93.70	100
LB	20 °C	0.06	0.70	0.19	1.48	3.69	0.24	1.43	92.20	100
	25 °C	0.41	3.55	0.16	1.22	4.49	0.09	0.51	89.57	100

Se detectaron 8 análogos, de los 16 analizados, GTX2, GTX3, dcSTX, dcNEO, dcGTX2, dcGTX3, B1, C1 y C2 en todas las condiciones de cultivo. El análogo con mayor concentración relativa fue C2 (89.57-93.70 %) en todos los tratamientos. A 25 °C (LB) los análogos con mayor porcentaje fue GTX2 (0.41 %), GTX3 (3.55 %) y dcGTX3 (4.49 %), en LA (20 °C) fueron la dcSTX (0.22 %), dcGTX2 (1.72 %) y C1 (2.63 %). Por otro lado, a 17 °C los análogos con valores más bajos fueron la GTX3 (0.68 %), dcSTX (0.10 %), dcGTX2 (0.81 %), dcGTX3 (2.44 %) y B1 (0.06 %). En el caso de *A. affine* se detectaron a ocho análogos solamente bajo las condiciones de cultivo de LA a 25 °C. La concentración relativa de cada análogo fue diferente a la concentración en *G. catenatum*. El análogo C2 fue el más abundante, pero solo representó el 34.14 % del total de PSTs y siguientes los análogos de mayor a menor concentración relativa fueron la GTX3 (27.60 %), dcGTX2 (18.87 %), dcGTX3 (12.79 %), GTX2 (3.24 %), dcSTX (2.43 %), C1 (0.70 %) y B1 (0.22 %). En general se encontraron los mismos análogos en ambas especies. De estos, los más potentes pertenecen al grupo de los carbamatos (GTX2 y GTX3), seguidos en potencial de toxicidad intermedia al grupo decarbamoilo (dcSTX y dcGTX2-3) y de los menos potentes se detectaron a los del grupo N-sulfocarbamoilo (B1, C1 y C2).

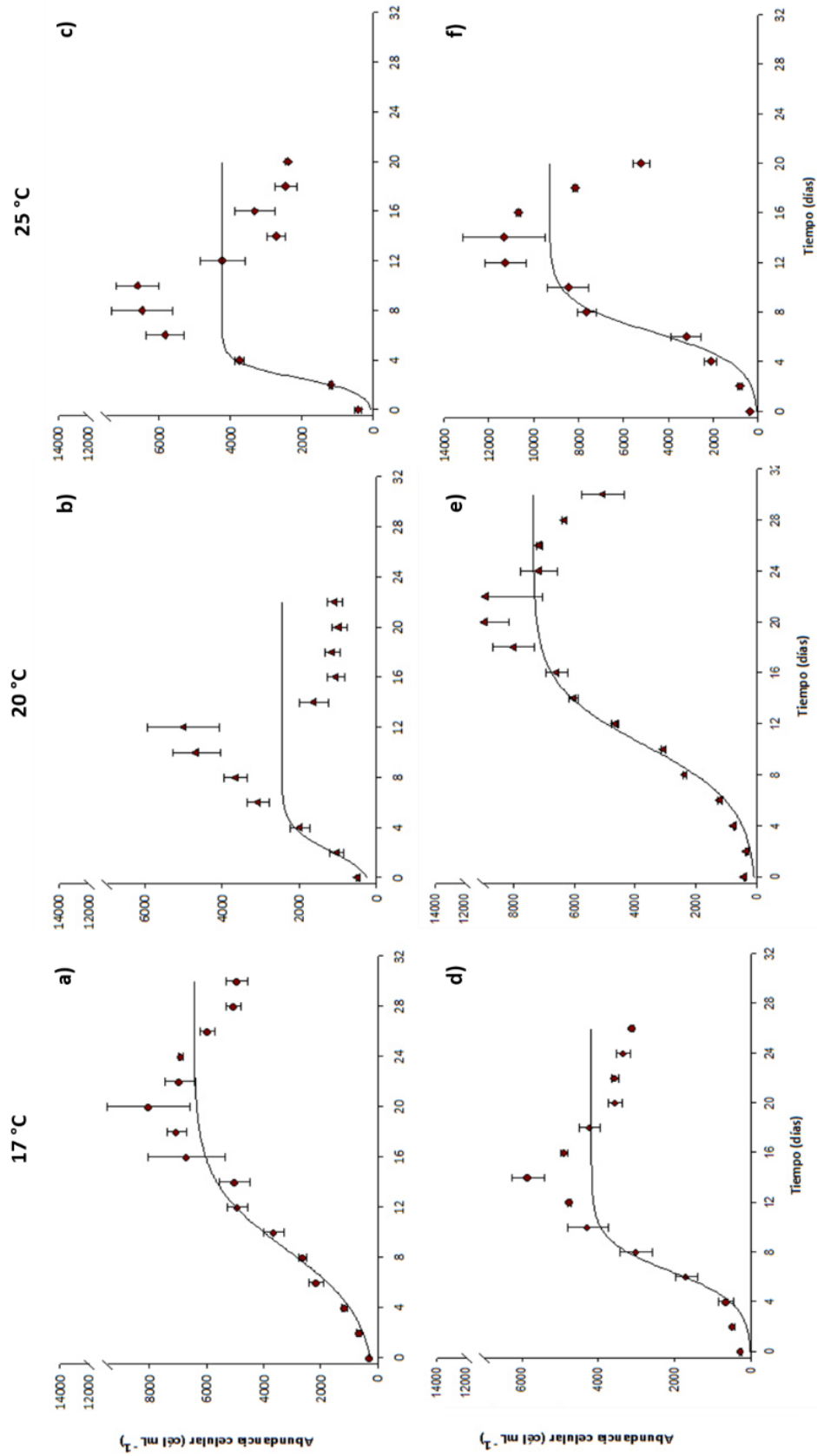


Figura 4. Variación de la abundancia celular de *A. affine* mantenido en diferentes condiciones de cultivo. Las células se mantuvieron en tres temperaturas diferentes a 200 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (LA; a-c) y 90 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (LB; d-f). Se presenta el promedio más desviación estándar de tres replicas (símbolos). La línea continua representa el ajuste al modelo de crecimiento de Gompertz.

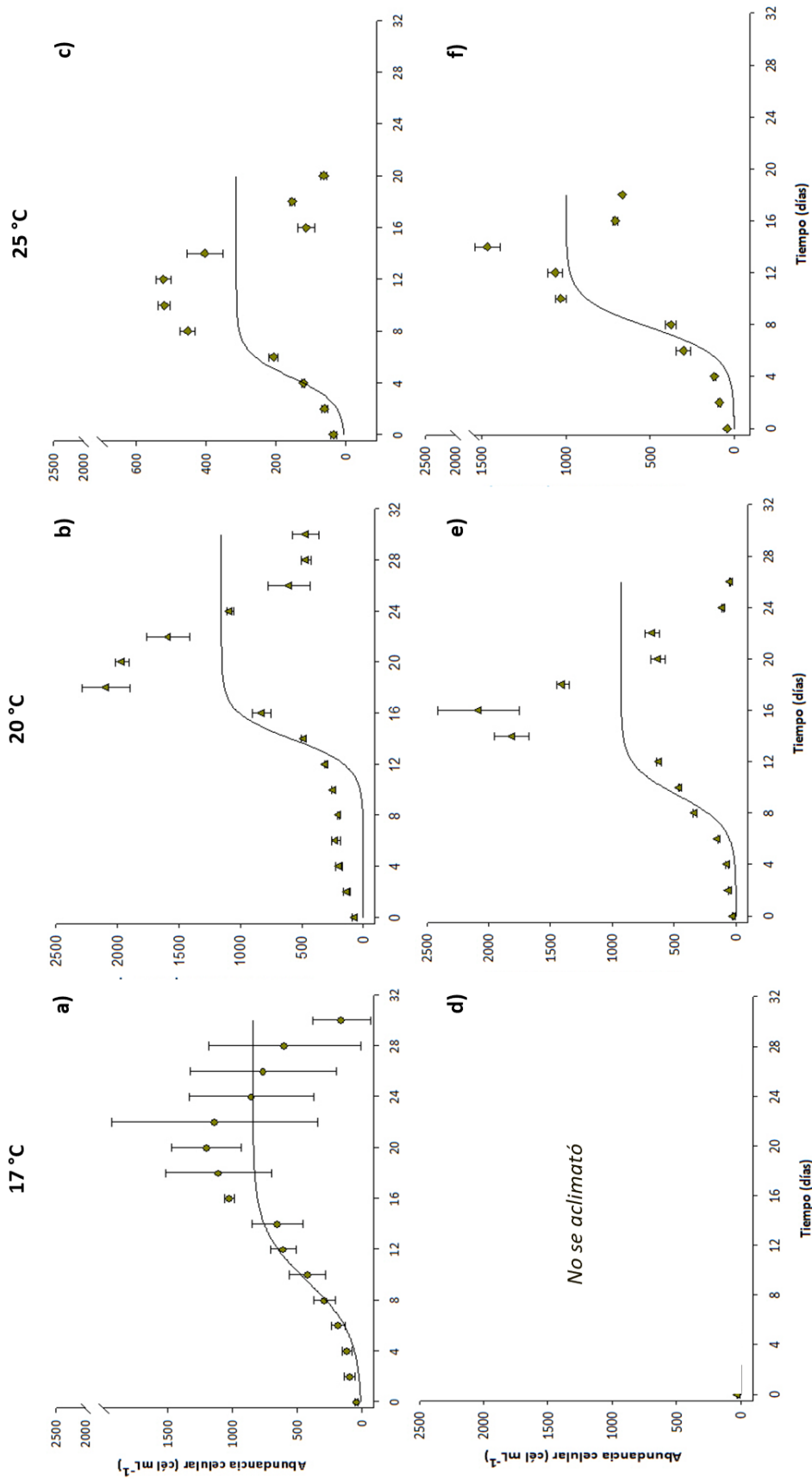


Figura 5. Variación de la abundancia celular de *G. catenatum* mantenido en diferentes condiciones de cultivo. Las células se mantuvieron en tres temperaturas diferentes a 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LA; a-c) y 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LB; d-f). Se presenta el promedio más desviación estándar de tres replicas (símbolos). La línea continua representa el ajuste al modelo de crecimiento de Gompertz.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Identificación molecular de *A. affine*

Mediante el uso de los *primers* ITS se logró identificar molecularmente al aislado del NGC del género *Alexandrium* como *A. affine*. Este es el primer registro de la presencia confirmada de un miembro de esta especie en la región. Sin embargo, como menciona Band-Schmidt et al. (2003) es posible que esta especie ya ha estado presente en el GC, pero no se había corroborado su identificación por medios moleculares. Hasta el momento las identificaciones solo se han basado en observaciones morfológicas por microscopía óptica y electrónica de barrido, lo cual ha influido en la veracidad de esta identificación ya que el tamaño y la forma de las cepas es diferente cuando crece en cultivos a las poblaciones silvestres (Hallegraeff et al., 1991). Es por lo que debe haber una identificación más fiable y precisa que no se base únicamente en la morfología (Onda et al., 2013).

Cabe señalar que el género *Alexandrium* es, entre los formadores de FAN, el más importante por su gravedad, diversidad y distribución (Anderson et al. 2012). Sin embargo, en México no se tiene registro de los florecimientos provocados por este género, salvo lo documentado en Bahía Concepción a causa de *A. affine* (Band-Schmidt et al., 2003).

El dinoflagelado tecado *A. affine* no era considerado como tóxico hasta hace poco (Kim et al., 2023), razón por la cual su estudio sobre la dinámica de sus florecimientos ha sido escaso y los estudios en cultivo de esta especie son pocos (Band-Schmidt et al., 2003). Sin embargo, es conocido por aparecer en los florecimientos de otros dinoflagelados (Anderson et al., 2012; Fraga & Bakun, 1993; Kim et al., 1990), también se sabe que los florecimientos de esta especie ocurren en zonas de hundimiento y se ha relacionado con el aumento de la temperatura superficial del agua, escorrentía de ríos y lluvias (Wagey et al., 2000). Consistente con estas observaciones Fraga et al. (1989) menciona que ser un formador de cadenas le da una ventaja en aguas caudalosas. Sin embargo, a pesar de los registros cada vez más frecuentes de esta especie en otras partes del mundo aún son necesarios análisis adicionales de diferentes cepas de *A. affine*, ya que la identificación de especies que causan los FAN es crucial para generar estrategias de mitigación, seguimiento o control de estos eventos (Onda et al., 2013).

4.2 Crecimiento poblacional de los dinoflagelados *G. catenatum* y *A. affine*

Uno de los parámetros más estudiados para conocer la dinámica poblacional de las especies formadoras de FAN es la tasa de crecimiento (Jeong et al. 2015). Esta puede variar dependiendo de los factores a los que se exponga a las especies (Barsanti y Gualtieri, 2006). Al evaluar el cambio en la abundancia celular respecto al tiempo se pueden identificar diferentes fases en el crecimiento poblacional en condiciones controladas de laboratorio, como la fase de aclimatación, fase exponencial y una fase estacionaria (Wood et al. 2005). Sin embargo, la formación de un florecimiento puede tener un comportamiento similar. Existe aún un desconocimiento de cuáles son los factores principales que promueven su crecimiento en muchas especies formadoras de FAN. Sin embargo, se ha reportado que en cultivo factores como el medio de cultivo, temperatura, salinidad, nutrientes, luz, entre otros influyen sobre este parámetro (Alonso-Rodríguez & Ochoa, 2004; Martínez-López et al., 2007). Las tasas de crecimiento de cepas aisladas del dinoflagelado desnudo *G. catenatum* de diferentes regiones de México son entre 0.08 a 0.82 d⁻¹ cultivados a temperaturas entre 13 °C a 27 °C (Band-Schmidt et al., 2010). Este trabajo evaluó el crecimiento poblacional, así como las tasas de crecimiento de dos especies de dinoflagelados productores de PST expuestos a dos condiciones de luz (LA y LB) y a tres temperaturas (17, 20 y 25 °C). La respuesta de *G. catenatum* a estas condiciones fue variable. Las tasas de crecimiento son comparables a las reportadas en rangos de temperatura similares (Tabla 2).

Recientemente en el norte del GC los FAN de *G. catenatum* han sido recurrentes principalmente durante la temporada de invierno, cuando la temperatura del agua ronda los 17 °C (Lavín et al., 1998). Por lo que se han implementado vedas sanitarias asociadas a la acumulación de toxinas (Medina-Elizalde et al., 2018; datos no publicados). Esto sugiere que la población de esta cepa pertenece al ecotipo frío como se ha reportado anteriormente en otras partes del mundo por ejemplo Tasmania, España y el GC (Hallegraeff et al., 2012), a diferencia de las poblaciones del ecotipo cálido como en Filipinas, Malasia, Japón, Taiwan y el sur del GC donde las temperaturas rondan o superan los 25 °C. Además, Liu et al. (2020) mencionan que podría existir un ecotipo moderado en el que se encuentran cepas de Bahía Concepción (18–25 °C) (Gárate-Lizárraga et al., 2004), Mazatlán, Sinaloa (22 °C) (Morey-Gaines, 1982), y China (23 °C) (Jiao et al., 2010). Se ha demostrado que las cepas mexicanas de este dinoflagelado toleran amplios rangos de temperatura entre 11.5 a 33 °C (Band-Schmidt et al., 2014). Por lo tanto, la cepa aislada del NGC pudiera

responder a la temperatura como cualquier ecotipo ya que se aclimato a las tres temperaturas. Sin embargo, se observó que las curvas de crecimiento en 20 °C y 25 °C en ambas irradiancias tuvieron una disminución importante en la abundancia celular (caídas de los cultivos). Esta característica ya ha sido reportada por Band-Schmidt et al. (2004, 2014) quienes observaron caídas repentinas de sus cultivos.

Además, las tasas de crecimiento obtenidas en la cepa expuesta a 25 °C en LA y LB fue de 0.39 y 0.29 d^{-1} , respectivamente. Estos datos al contrastar con lo reportado en otros estudios son valores similares. Band-Schmidt et al. (2014) reportó una tasa de crecimiento de 0.39 d^{-1} a 24 °C; Yamamoto et al. (2002) reporta tasas de crecimiento de 0.31 d^{-1} a 25 °C a 180 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dato similar al presente estudio a la misma temperatura en alta irradiancia (200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por otro lado, Band-Schmidt et al. (2014) reportó que cinco cepas mexicanas de *G. catenatum* toleraron temperaturas bajas (16 °C) con tasas de crecimiento de 0.1 d^{-1} y dos más toleraron hasta 33 °C (0.09 y 0.16 d^{-1}). En el presente estudio la tasa más baja (0.21 d^{-1}) se registró a 17 °C en LA, agregando que la densidad en este tratamiento fue de 1,200 células mL^{-1} , como reporta Band-Schmidt et al. (2014) quien a 16 °C registro una densidad menor a las 2,000 células mL^{-1} . También se observó en esta temperatura una curva de crecimiento más estable y el cultivo no cayó abruptamente, sino que se mantuvo constante por aproximadamente 30 días, así como se identificaron las fases en la curva de crecimiento, característica que no se logró observar en el resto de los tratamientos. Esto pudiera sugerir que efectivamente las cepas de *G. catenatum* aisladas del NGC se adaptan bien a las temperaturas frías del NGC ya que se sabe que en esta región la temperatura superficial del agua a lo largo del año varía aproximadamente de 17 °C en invierno y puede alcanzar los 30 °C en verano (Lavín et al., 1998). Cabe señalar que en el tratamiento a 17 °C (LB) no se observó crecimiento de la cepa. Se podría deber a que el crecimiento de la especie depende de la irradiancia (Murillo Martínez, 2015). El único trabajo que caracterizó el crecimiento poblacional de *G. catenatum* bajo diferentes irradiancias reporta la mayor tasa de crecimiento (0.28 d^{-1}) en cultivos expuestos a luz alta (350 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sin embargo, otro estudio menciona que la luz parece no afectar el crecimiento de este dinoflagelado (Vale, 2015). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados y como sugiere Band-Schmidt et al. (2014) *G. catenatum* podría estar presente en la columna de agua del NGC durante todo el año, si la temperatura fuera el único factor que regula su crecimiento.

Por otro lado, el crecimiento poblacional observado para el dinoflagelado tecado *A. affine* en todos los tratamientos fue $\geq 0.2 \text{ d}^{-1}$, que es similar a las tasas de crecimiento que se han reportado para esta especie cultivada en diferentes condiciones (Tabla 3). Las tasas de crecimiento más altas (0.49 y 0.38 d^{-1}) se presentaron a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en LA y LB, al compararse con la cepa aislada por Band-Schmidt et al. (2003) de Bahía Concepción al sur del GC entre los $20 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ presentó las tasas de crecimiento más altas ($0.25 - 0.34 \text{ d}^{-1}$). Asimismo, algunos autores sugieren que *A. affine* tolera más las altas temperaturas. Por ejemplo, Lim et al. (2019) reportó una tasa máxima de crecimiento a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.43 d^{-1}), y no observaron crecimiento a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Lim et al. (2007) no observó crecimiento a baja temperatura (15°C) y el óptimo crecimiento fue entre $20 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y Nguyen-Ngoc (2004) caracterizaron el crecimiento de *A. affine* a 24 y $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ con tasas de crecimiento entre $0.5 - 0.7 \text{ d}^{-1}$. En general la densidad celular en todos los tratamientos superó las $4,000 \text{ cél mL}^{-1}$ y siempre se observó un crecimiento rápido en los primeros días del cultivo, característica que ha sido reportada por Lee et al. (2019) en sus cultivos.

En los tratamientos de LB para las tres temperaturas el crecimiento de *A. affine* se observó más constante a comparación de los de LA, esto se ha observado en otros experimentos de la especie expuestos a una irradiancia de $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Lee et al., 2019). Se ha considerado que el género *Alexandrium* está adaptado a altas irradiancias de entre 100 y $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Smayda, 2008). Se sugiere que por esta razón los tratamientos de irradiancia utilizados no afectaron el crecimiento de *A. affine* ya que esta característica también se observó en la cepa aislada del sur del GC (Band-Schmidt et al., 2003). Por otro lado, la mayor abundancia celular ($11,323 \text{ cél mL}^{-1}$) obtenida en el tratamiento de LB a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, comparado con el experimento de Lee et al. (2019) a una irradiancia similar a la de este estudio obtuvieron $\sim 8,000 \text{ cél mL}^{-1}$.

Otra característica común entre organismos fitoplanctónicos móviles, como las diatomeas y dinoflagelados, es la formación de cadenas (Lee et al., 2021), la cual ocurre cuando las células hijas permanecen unidas entre sí después de la división celular formando así estructuras alargadas (Lovecchio et al., 2019). Se ha propuesto que la función de la formación de cadenas es una adaptación para contrarrestar el hundimiento, la depredación y la absorción de nutrientes (Bjærke et al., 2015; Pahlow et al., 1997; Smayda, 2010). También se ha asociado con la velocidad de nado ya que esta aumenta con la longitud de las cadenas (Lovecchio et al., 2019). Los cultivos de *G. catenatum* y *A. affine* mostraron respuestas variadas con la temperatura respecto a la formación y

longitud de las cadenas, de acuerdo con Lee et al. (2021) la longitud de la cadena podría depender de las condiciones de crecimiento.

A. affine formó cadenas únicamente a 17 °C (LA) y 20 °C (LB). Por otro lado, *G. catenatum* formó cadenas en todos los tratamientos, Band-Schmidt et al. (2006) reportan que la formación de cadenas se debe a las buenas condiciones fisiológicas de los cultivos y al envejecer el cultivo las cadenas se rompieron y quedaron en su mayoría células solitarias o cadenas más cortas. Esto también se observó en este estudio y se puede atribuir a la limitación de nutrientes (Blackburn et al., 1989).

4.3 Producción de PSTs en *G. catenatum* y *A. affine*

La presencia y proporción de los diferentes análogos de STX varía entre cepas y poblaciones, y no se ha encontrado alguna especie que contenga todos los análogos (Hallegraeff et al., 2012). En cepas mexicanas, la producción de los análogos STX, GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2 (Band-Schmidt et al., 2010) es muy característica de *G. catenatum*, el presente estudio coincide con estas observaciones ya que se obtuvieron los análogos GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2.

Las poblaciones de diferentes regiones se pueden diferenciar mediante los perfiles de toxinas que se utilizan como marcadores (Negri et al., 2007), por ello resulta útil conocer que análogos predominan o no en las diferentes cepas incluso aun siendo de la misma región. La cepa de *G. catenatum* del NGC es productor de ocho análogos de PSTs (GTX2, GTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, C1 y C2) con una mayor proporción de C2 (91.81%) en todos los tratamientos. La alta proporción de los análogos tipo C parece es una característica de *G. catenatum* en casi todo el mundo, a excepción de cepas de Singapur y Malasia las cuales no producen toxinas tipo C (Hallegraeff et al., 2012). La cepa de *G. catenatum* del NGC no dio positivo al análogo dcNEO así como otras cepas del GC, pero las cepas aisladas de La Paz, B.C.S. y Mazatlán, Sinaloa cuando fueron cultivadas en medio f/2 dieron positivo a este análogo (Hernández-Sandoval et al., 2022). Esta diferencia, de acuerdo con Bustillos-Guzmán et al. (2015) puede deberse a la identificación errónea de falsos positivos que eran debido al método de detección utilizado y por ende se daba un hallazgo recurrente de NEO en cepas del GC, pero en realidad correspondía a dcNEO, según lo confirmado por LC-MS/MS. Las cepas de Singapur no producen toxinas dcGTX2 y 3 (Holmes et al., 2002), a diferencia de la cepa de este

estudio. Cabe señalar que los análogos del tipo GC no fueron detectados en ña cepa del NGC, aunque para las cepas japonesas si se han detectado (Negri et al., 2007; Oh et al., 2010). Esto se puede deber como mencionan Liu et al. (2020) a una cuestión metodológica y por lo tanto no se debe descartar la posible presencia de toxinas tipo GC.

Sin embargo, también se ha reportado que los perfiles de toxinas varían cuando se han utilizado diferentes medios de cultivo, así como el tamaño del cultivo (Band-Schmidt et al., 2010), y otros factores como la temperatura.

Por otro lado, *A. affine* aislada del NGC en este estudio es una cepa tóxica ya que a 25 °C (LA) los análogos obtenidos fueron (GTX2, GTX3, dcSTX, dcNEO, dcGTX2, dcGTX3, B1, C1 y C2). A pesar de que hasta hace poco no era considerada una especie tóxica se han obtenido resultados similares a los del presente estudio. Por ejemplo, Nguyen-Ngoc (2004) al exponer *A. affine* a experimentos de salinidad y temperatura encontraron los análogos NeoSTX, STX, GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4. Sin embargo, presentó menor toxicidad en los análogos GTX1-GTX4, pero en el presente estudio el segundo mayor porcentaje (27.60 %) fue de GTX3. Estos mismos autores sugieren que puede ser una especie tóxica solamente bajo ciertas condiciones, quizás por esa razón únicamente en este tratamiento dio positivo a la presencia de PST. Otro estudio reciente realizado por Kim et al. (2023) reportó la presencia de toxinas decarbamoilo principalmente (dcGTX2 y dcSTX) y C2 en las temperaturas probadas, estos análogos corresponden a los encontraron en nuestro estudio. Además, los análogos con mayor porcentaje que ellos reportan fueron en temperaturas >20 °C, el análogo dcGTX2 (75 %) en muestras a 20 °C y 27 °C, y en 24 °C las dcGTX2 (34 %) y dcSTX (29 %). Estas temperaturas son similares al tratamiento (25 °C) que dio positivo nuestra cepa por lo tanto se sugiere que en temperaturas altas esta especie puede si ser productora de PST. También estos autores detectaron GTX4 (56 %) a 16 °C, con niveles bajos de dcGTX2 (9 %) y dcSTX (6 %). por lo que es poco probable que cause incidentes de intoxicación.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se identificó *Alexandrium affine* por métodos moleculares y es el primer registro de la presencia de esta especie en la zona.

Gymnodinium catenatum tolera amplios rangos de temperatura (17-25 °C). Esto puede tener relación con la presencia de sus florecimientos en temporadas invernales en el NGC, ya que a temperaturas mayores el crecimiento se acelera y abundancias bajan rápidamente. Por otro lado, la tasa máxima de crecimiento del dinoflagelado tecado *A. affine* fue a 25 °C, así como su máxima abundancia a. Sin embargo, en todos los tratamientos creció con abundancias mayores a las 4,900 cél mL⁻¹, por ello se concluye que esta especie es más tolerante a las diferentes condiciones ambientales.

Este trabajo es el primer registro de una cepa de *G. catenatum* aislada del NGC y la identifica como productora de PST, produjo ocho análogos de saxitoxina. También *A. affine*, aunque se considera una especie no tóxica, en este estudio si produjo ocho análogos de PST bajo ciertas condiciones.

Finalmente, se concluye que las condiciones ambientales como la luz y la temperatura influyen en el crecimiento poblacional y el potencial tóxico de *G. catenatum* y *A. affine*.

Literatura citada

- Alonso-Rodríguez, R., & Ochoa, J. L. (2004). Hydrology of winter–spring “red tides” in Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Harmful Algae*, 3(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.10.002>
- Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., & Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10–35. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.012>
- Anderson, D. M., Fensin, E., Gobler, C. J., Hoeglund, A. E., Hubbard, K. A., Kulis, D. M., Landsberg, J. H., Lefebvre, K. A., Provoost, P., Richlen, M. L., Smith, J. L., Solow, A. R., & Trainer, V. L. (2021). Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status and future trends. *Harmful Algae*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101975>
- Band-Schmidt, C., Bustillos-Guzmán, J., Morquecho, L., Gárate-Lizárraga, I., Alonso-Rodríguez, R., Reyes-Salinas, A., Erler, K., & Luckas, B. (2006). Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology*, 42(4), 757–768. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00234.x>
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., Hernández-Sandoval, F. E., Núñez-Vázquez, E. J., & López-Cortés, D. J. (2014). Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Pacific coast of Mexico. *Toxicon*, 90, 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.002>
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E. J., & Hernández-Sandoval, F. E. (2010). Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A review. *Marine Drugs*, 8(6), 1935–1961. <https://doi.org/10.3390/md8061935>
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E., Hernández-Sandoval, F. E., Nacional, P., Playa Palo de Santa Rita La Paz, C., J. B.-S. C., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., & Núñez-Vázquez E Hernández, E. F. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica*, 21(3), 381–413. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/770>
- Band-Schmidt, C. J., Durán-Riveroll, L. M., Bustillos-Guzmán, J. J., Leyva-Valencia, I., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. J., Hernández-Sandoval, F. E., & Ramírez-Rodríguez, D. V. (2019). Paralytic toxin producing dinoflagellates in Latin America: Ecology and physiology. *Frontiers in Marine Science*, 6 (42). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00042>
- Band-Schmidt, C. J., Lechuga-Devézea, C. H., Kulis, D. M., & Anderson, D. M. (2003). Culture Studies of *Alexandrium affine* (Dinophyceae), a Non-Toxic Cyst Forming Dinoflagellate from Bahía Concepción, Gulf of California. *Botánica Marina*, 46(1), 44–54. <https://doi.org/10.1515/BOT.2003.007>

- Band-Schmidt, C. J., Lilly L., E., & Anderson, D. M. (2003). Identification of *Alexandrium affine* and *A. margalefii* (Dinophyceae) using DNA sequencing and LSU rDNA-based RFLP-PCR assays. *Phycologia*, 42(3), 261–268. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-3-261.1>
- Band-Schmidt, C. J., Morquecho, L., Lechuga-Devéze, C. H., & Anderson, D. M. (2004). Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Journal of Plankton Research*, 26(12), 1459–1470. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh133>
- Basti, L., Nagai, S., Go, J., Okano, S., Nagai, K., Watanabe, R., Suzuki, T., & Tanaka, Y. (2015). Differential inimical effects of *Alexandrium* spp. and *Karenia* spp. on cleavage, hatching, and two larval stages of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Harmful Algae*, 43, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.12.004>
- Bjærke, O., Jonsson, P. R., Alam, A., & Selander, E. (2015). Is chain length in phytoplankton regulated to evade predation? *Journal of Plankton Research*, 37(6), 1110–1119. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbv076>
- Blackburn, S. I., Hallegraeff, G. M., & Bolch, C. J. (1989). Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *Journal of Phycology*, 25, 577–590. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00264.x>
- Botana, L. M., Alfonso, A., Rodríguez, I., Botana, A. M., Louzao, M. D. C., & Vieytes, M. R. (2016). How safe is safe for marine toxins monitoring? *Toxins*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.3390/toxins8070208>
- Brand, L. E., & Guillard, R. R. L. (1981). The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 50(2), 119–132. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(81\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(81)90045-9)
- Bravo, I. (1986). Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Investigación pesquera*, 50(3), 313–321. <http://scimar.icm.csic.es/scimar/index.php/seclD/8/IdNum/184/>
- Bravo, I., & Anderson, D. M. (1994). The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. *Journal of Plankton Research*, 16(5), 513–525. <https://doi.org/10.1093/plankt/16.5.513>
- Bravo, I., & Figueroa, R. I. (2014). Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms*, 2(1), 11–32. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2010011>
- Burson, A., Stomp, M., Greenwell, E., Grosse, J., & Huisman, J. (2018). Competition for nutrients and light: testing advances in resource competition with a natural phytoplankton community. *Ecology*, 99(5), 1108–1118. <https://doi.org/10.1002/ecy.2187>
- Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C. J., Durán-Riveroll, L. M., Hernández-Sandoval, F. E., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E. J., Cembella, A., & Krock, B. (2015). Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Mexican Pacific as

- revealed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(3), 381–394. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1000978>
- Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D. J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E. J., & Hernández-Sandoval, F. E. (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(1A), 101–117. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-38802012000100008&script=sci_abstract
- Butman, B., Aretxabaleta, A. L., Dickhudt, P. J., Dalyander, P. S., Sherwood, C. R., Anderson, D. M., Keafer, B. A., & Signell, R. P. (2014). Investigating the importance of sediment resuspension in *Alexandrium fundyense* cyst population dynamics in the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 103, 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.10.011>
- Castañeda-Quezada, R., García-Mendoza, E., Ramírez-Mendoza, R., Helenes, J., Rivas, D., Romo-Curiel, A., & Lago-Leston, A. (2021). Distribution of *Gymnodinium catenatum* Graham cysts and its relation to harmful algae blooms in the northern Gulf of California. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 101 (6), 895–909. <https://doi.org/10.1017/S0025315421000795>
- Cusick, K. D., & Sayler, G. S. (2013). An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*, 11(4), 991–1018. <https://doi.org/10.3390/md11040991>
- Delgado del Villar, S. J., Alonso Rodríguez, R., & Jiménez-Gutiérrez, L. R. (2021). Las extraordinarias formas de vida de los dinoflagelados del Pacífico mexicano. *Revista Digital Universitaria*, 22(4). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.3>
- Doblin, M. A., Blackburn, S. I., & Hallegraef, G. M. (1999). Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros cf. tenuissimus* (Bacillariophyta). *Journal of Plankton Research*, 21(6), 1153–1169. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.6.1153>
- Durán-Riveroll, L. M., Band-Schmidt, C. J., Okolodkov, Y., & Almazán-Becerril, A. (2020). Mareas rojas en las costas de México: estado actual y perspectivas. En Angulo, L. (Ed.), *efectos del cambio climático en los litorales*. UNAM EPOMEX (pp. 277–312).
- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2015). Light and growth in marine phytoplankton: Allometric, taxonomic, and environmental variation. *Limnology and Oceanography*, 60(2), 540–552. <https://doi.org/10.1002/lno.10033>
- Flynn, K. J., Flynn, K., John, E. H., Reguera, B., Reyero, M. I., & Franco, J. M. (1996). Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *Journal of Plankton Research*, 18(11), 2093–2111. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.11.2093>
- Fraga, S., & Bakun, A. (1993). Global Climate Change and Harmful Algal Blooms: The example of *Gymnodinium catenatum* on the Galician coast. En T. J. Smayda & Shimizu (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier. (pp. 59–65).

- Fraga, S., Gallager, S. M., & Anderson, D. (1989). Chain-forming Dinoflagellates: An adaptation to Red Tides. En D. M. Anderson & T. Nemoto (Eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier. (pp. 281–284).
- Gárate-Lizárraga, I., B., P.-C., JA, D.-O., Okolodkov, Y., & López-Silva, S. (2016). Florecimientos algales nocivos en las aguas costeras del estado de Guerrero, México. En *Florecimientos Algales Nocivos en México* (pp. 228–241).
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Alonso-Rodríguez, R., & Luckas, B. (2004). Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 48(3), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.10.032>
- Gárate-Lizárraga, I., M.L. H.-O., Band-Schmidt, C., & G, S.-C. (2001). Red tides along the coasts of Baja California Sur, México (1984 to 2001). *Oceanides*, 16 (2), 127–134.
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., & Núñez-Vázquez, E. J. (2016). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. RedFAN-CICESE, Ensenada, B.C. México.
- Graham, H. W. (1943). *Gymnodinium catenatum*, a New Dinoflagellate from the Gulf of California. *American Microscopical Society*, 62(3), 259–261. <https://doi.org/10.2307/3223028>
- Guillard, R., & Sieracki, M. (2005). Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. *Algal Culturing Techniques*, 239–252. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50017-2>
- Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Doblin, M. A., & Bolch, C. J. S. (2012). Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 14, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.018>
- Hallegraeff, G. M., Bolch, C. J., Blackburn, S. I., & Oshima, Y. (1991). Species of the Toxigenic Dinoflagellate Genus *Alexandrium* in Southeastern Australian Waters. *Botanica Marina*, 34(6), 575–588. <https://doi.org/doi:10.1515/botm.1991.34.6.575>
- Haque, Md. N., Nam, S.-E., Shin, Y. K., & Rhee, J.-S. (2021). The dinoflagellate *Alexandrium affine* acutely induces significant modulations on innate immunity, hepatic function, and antioxidant defense system in the gill and liver tissues of red seabream. *Aquatic Toxicology*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105985>
- Hernández-Sandoval, F. E., Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C. J., Núñez-Vázquez, E. J., López-Cortés, D. J., Fernández-Herrera, L. J., Poot-Delgado, C. A., & Moreno-Legorreta, M. (2022). Effect of Different N:P Ratios on the growth, toxicity, and toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from the Gulf of California. *Toxins*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/toxins14070501>
- 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(3), 245–256.
<https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/859>

- Holmes, M. J., Bolch, C. J. S., Green, D. H., Cembella, A. D., Lay, S., & Teo, M. (2002). Singapore isolates of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (dinophyceae) produce a unique profile of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology*, 38, 96–106. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01153.x>
- Hummert, C., Ritscher, / M, Reinhardt, / K, & Luckas, / B. (1997). Analysis of the Characteristic PSP Profiles of *Pyrodinium bahamense* and Several Strains of *Alexandrium* by HPLC Based on Ion-Pair Chromatographic Separation, Post-Column Oxidation, and Fluorescence Detection. *Chromatographia*, 45, 312–316. <https://doi.org/10.1007/BF02505576>
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F., & Azam, F. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 593–599. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>
- John, U., Litaker, R. W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M. L., & Anderson, D. M. (2014). Formal Revision of the *Alexandrium tamarensis* Species Complex (Dinophyceae) Taxonomy: The Introduction of Five Species with Emphasis on Molecular-based (rDNA) Classification. *Protist*, 165(6), 779–804. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.10.001>
- Kim, H. J., Kim, J. H., Jun, J. W., Giri, S. S., Chi, C., Yun, S., Kim, S. G., Kim, S. W., Kang, J. W., Jeong, D. G., & Park, S. C. (2017). Complete genome sequence of *Vibrio coralliilyticus*, isolated from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Genome Announcements*, 5(23). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00437-17>
- Kim, H.-G., Park, J.-S., & Lee, S.-G. (1990). Coastal Algal Blooms Caused by the Cyst-Forming Dinoflagellates. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(6), 468–474.
- Kim, H.-S., Park, H., Wang, H., Kim, T., & Ki, J.-S. (2023). Saxitoxins-producing potential of the marine dinoflagellate *Alexandrium* affine and its environmental implications revealed by toxins and transcriptome profiling. *Marine Environmental Research*, 185, 105874. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105874>
- Kim, J. H., Oh, S. J., & Kim, S.-Y. (2019). The Effect of Temperature, Salinity and Irradiance on the Growth of *Alexandrium* affine (Dinophyceae) Isolated from Southern Sea of Korea. *Journal of the Korean Society of Marine Environment and Safety*, 25(2), 229–236. <https://doi.org/10.7837/kosomes.2019.25.2.229>
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y., & Collos, Y. (2011). Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research*, 33(10), 1550–1563. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr050>
- Lavín, M. F., Godínez, V. M., & Alvarez, L. G. (1998). Inverse-estuarine Features of the Upper Gulf of California. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47, 769–795. <https://doi.org/10.1006/ecss.1998.0387>

- Lee, C. H., Min, J., Lee, H. G., & Kim, K. Y. (2021). Thermal plasticity of growth and chain formation of the dinoflagel-lates *Alexandrium* affine and *Alexandrium pacificum* with respect to ocean acidification. *Algae*, *36*(4), 285–298. <https://doi.org/10.4490/algae.2021.36.12.1>
- Lee, H.-G., Kim, H. M., Min, J., Park, C., Jeong, H. J., Lee, K., & Kim, K. Y. (2020). Quantification of the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Alexandrium* species using a digital PCR. *Harmful Algae*, *92*, 101726. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101726>
- Lee, K. H., Jeong, H. J., Kang, H. C., Ok, J. H., You, J. H., & Park, S. A. (2019). Growth rates and nitrate uptake of co-occurring red-tide dinoflagellates *Alexandrium affine* and *A. fraterculus* as a function of nitrate concentration under light-dark and continuous light conditions. *Algae*, *34*(3), 237–251. <https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.8.28>
- Lewitus, A. J., Horner, R. A., Caron, D. A., Garcia-Mendoza, E., Hickey, B. M., Hunter, M., Huppert, D. D., Kudela, R. M., Langlois, G. W., Largier, J. L., Lessard, E. J., RaLonde, R., Jack Rensel, J. E., Strutton, P. G., Trainer, V. L., & Tweddle, J. F. (2012). Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes, and impacts. *Harmful Algae*, *19*, 133–159. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.06.009>
- Lim, P.-T., Leaw, C.-P., Kaga, S., Sekiguchi, K., & Ogata, T. (2007). Growth responses of five non toxic *Alexandrium* species (dinophyceae) to temperature and salinity. *Marine Research in Indonesia*, *32*(2), 189–195. <https://doi.org/10.14203/mri.v32i2.454>
- Lim, Y. K., Baek, S. H., Lee, M., Kim, Y. O., Choi, K. H., & Kim, J. H. (2019). Phytoplankton composition associated with physical and chemical variables during summer in the southern sea of Korea: Implication of the succession of the two toxic dinoflagellates *Cochlodinium* (a.k.a. *Margalefidinium*) *polykrikoides* and *Alexandrium affine*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *516*, 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.05.006>
- Litaker, R., Vandersea, M., Kibler, S., Reece, K., Stokes, N., Lutzoni, F., Yonish, B., West, M., Black, M., & Tester, P. (2007). Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology*, *43*, 344–355. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00320.x>
- Liu, M., Gu, H., Krock, B., Luo, Z., & Zhang, Y. (2020). Toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* and their cysts in Taiwan Strait and their relationship to global populations. *Harmful Algae*, *97*. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101868>
- López Cortés, D. J., Bustillos Guzmán, J. J., Hernández Sandoval, F. E., Chávez López, S., Band Schmidt, C. J., & Núñez Vázquez, E. J. (2015). Florecimientos algales nocivos: prevención, control y mitigación. *Recursos Naturales y Sociedad*, *1*(4), 35–49. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2015.01.01.01.0004>
- Lovecchio, S., Climent, E., Stocker, R., & Durham, W. M. (2019). Chain formation can enhance the vertical migration of phytoplankton through turbulence. *Science Advances*, *5*(10). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7879>
- Martínez-López, A., Escobedo Urias, D., Reyes-Salinas, A., & Hernandez-Real, M. (2007). Phytoplankton response to nutrient runoff in a large lagoon system in the Gulf of California.

Hidrobiológica, 17(2), 101–112.
<https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/981>

- Medina-Elizalde, J., García-Mendoza, E., Turner, A. D., Sánchez-Bravo, Y. A., & Murillo-Martínez, R. (2018). Transformation and depuration of paralytic shellfish toxins in the geoduck clam *Panopea globosa* from the Northern Gulf of California. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00335>
- Moestrup, Ø., Hansen, G., Daugbjerg, N., Flaim, G., & D'Andrea, M. (2006). Studies on woloszynskioid dinoflagellates II: On *Tovellia sanguinea* sp. nov., the dinoflagellate responsible for the reddening of Lake Tovell, N. Italy. *European Journal of Phycology*, 41(1), 47–65. <https://doi.org/10.1080/09670260600556682>
- Morey-Gaines, G. (1982). *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armoured forms. *Phycologia*, 21(2), 154–163. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-21-2-154.1>
- Murillo Martínez, R. (2015). Efecto de la intensidad de la luz sobre los mecanismos de disipación no fotoquímica y producción de toxinas paralizantes en cepas de *Gymnodinium catenatum*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Negri, A., Bolch, C., Stute (née Geier), S., Green, D., Park, T. G., & Blackburn, S. I. (2007). Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 6, 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.04.001>
- Nguyen-Ngoc, L. (2004). An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium* affine isolated from Vietnamese waters. *Harmful Algae*, 3(2), 117–129. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00062-3)
- Oh, S. J., Matsuyama, Y., Yoon, Y. H., Miyamura, K., Choi, C. G., Yang, H. S., & Kang, I. J. (2010). Comparative analysis of paralytic shellfish toxin content and profile produced by dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Inokushi Bay, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 55(1), 47–54. <https://doi.org/10.5109/17799>
- Onda, D. F., Benico, G., Sulit, A. F., & Lorenzo, P. (2013). Morphological and molecular characterization of some HAB-forming dinoflagellates from Philippine waters. *Philippine Science Letters*, 6(1), 97–106.
- Pahlow, M., Riebesell, U., & Wolf-Gladrow, D. A. (1997). Impact of cell shape and chain formation on nutrient acquisition by marine diatoms. *Limnology and Oceanography*, 42(8), 1660–1672.
- Ramírez-León, M. R., Álvarez-Borrego, S., Thompson, C. T., Gaxiola Castro, G., & Dziendzielewski, G. H. (2015). El aporte de nutrientes del río Colorado al norte del golfo de California no se requiere para mantener un ecosistema pelágico productivo. *Ciencias Marinas*, 41(2), 169–188. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i2.2483>
- Smayda, T. J. (2008). Complexity in the eutrophication–harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae*, 8(1), 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.018>

- Smayda, T. J. (2010). Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellate species in upwelling systems. 2. Motility and migratory behaviour. *Progress in Oceanography*, 55(1), 71–91. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2010.02.005>
- Stafford, R. G., & Hines, H. B. (1995). Urinary elimination of saxitoxin after intravenous injection. *Toxicon*, 33(11), 1501–1510. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00081-V](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00081-V)
- Streets, Thos. H. (1878). The Discolored Waters of the Gulf of California. *The American Naturalist*, 12(2), 85–90. <http://www.jstor.org/stable/2448563>
- Subong, B. J., Benico, G., Sulit, A. K. L., Mendoza, C. O., Cruz, L. J., Azanza, R. V., & Jimenez, E. C. (2017). Toxicity and protein expression of Alexandrium species collected in the Philippine waters Harmful Algal Blooms View project Environmental Radioactivity View project. *Philippine Journal of Science*, 146(4), 425–436. <https://www.researchgate.net/publication/321608769>
- Sullivan, J. J., Wekell, M. M., & Kentala, L. L. (1985). Application of HPLC for the Determination of PSP Toxins in Shellfish. *Journal of Food Science*, 50(1), 26–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13269.x>
- Sullivan, J. M., Swift, E., Donaghay, P. L., & Rines, J. E. B. (2003). Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae*, 2(3), 183–199. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00039-8)
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS*, 101(30), 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Van Dolah, F. M., Roelke, D., & Greene, R. M. (2001). Health and Ecological Impacts of Harmful Algal Blooms: Risk Assessment Needs. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(5), 1329–1345. <https://doi.org/10.1080/20018091095032>
- Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. En *Marine Drugs* (Vol. 8, Número 7, pp. 2185–2211). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md8072185>
- Yamamoto, T., Oh, S. J., & Kataoka, Y. (2002). Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science*, 68, 356–363. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00433.x>