

## ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Coolia malayensis* (DINOPHYCEAE) Y EFECTOS DE EXTRACTOS DE LA MACROALGA *Dictyota dichotoma* (PHAEOPHYCEAE) EN SU CRECIMIENTO

Ramos-Santiago Ana Emilia<sup>1,2\*</sup>, Band-Schmidt, Christine Johanna<sup>2\*</sup>, Leyva-Valencia Ignacio<sup>3</sup>, Muñoz-Ochoa Mauricio<sup>2</sup>, Okolodkov, Yuri B.<sup>4</sup>, Santiago-Morales, Ivone Sandra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, Av. Universidad, Puerto Ángel, Oaxaca, 70902, México. <sup>2</sup>Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23079, México. <sup>3</sup>CONACyT, IPN-CICIMAR, Av. Instituto Politécnico s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23079, México. <sup>4</sup>Universidad Veracruzana, Mar Mediterráneo 314, Fracc. Costa Verde, Boca del Río, Veracruz, 94294, México. \*Autores de correspondencia. emails: cbands@ipn.mx; ramosantiago.a.e.22umar@gmail.com

**RESUMEN.** *Coolia* es un género que actualmente incluye ocho especies de dinoflagelados epibentónicos, siendo un grupo de interés debido a las toxinas que producen algunas especies del género (por ejemplo, cooliatoxina) y por las asociaciones que presentan con otros géneros de dinoflagelados epibentónicos tóxicos (*Ostreopsis*, *Amphidinium*, *Prorocentrum* y *Gambierdiscus*). Existe poca información sobre la diversidad y ecología de este género en México. Los objetivos de este estudio fueron identificar mediante taxonomía integrativa (morfológica y molecular) dos aislados de *Coolia* (CMBAPAZ-1 y s/i 72) de la Bahía de La Paz, Golfo de California, y determinar los efectos de extractos de la macroalga *Dictyota dichotoma* sobre su crecimiento. Ambos aislados se cultivaron en medio GSe, con y sin extractos de macroalga: 1) medio GSe, 2) medio GSe con extracto crudo de *D. dichotoma*, 3) GSe con la fracción de carbohidratos de *D. dichotoma*, y 4) GSe con la fracción no precipitable de *D. dichotoma*. Los análisis morfológicos y moleculares de la región 28S del ADN ribosómico (valores *bootstrap* > 95%) permitieron la identificación de ambos aislados como *Coolia malayensis*. No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las abundancias celulares promedio de los aislados (CMBAPAZ-1 y s/i 72) cultivados en el medio GSe en comparación con los otros tratamientos. Las abundancias máximas registradas en las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 hasta el día 28 fueron de  $40,271 \pm 3,018$  y  $43,428 \pm 4,560$  cél mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Las tasas de crecimiento variaron en un rango de 0.129 a 0.139 div día<sup>-1</sup> en ambas cepas. El extracto y las fracciones de *D. dichotoma* no favorecieron ni inhibieron el crecimiento de *C. malayensis*, por lo que no se excluye la posibilidad de que la macroalga pueda favorecer el crecimiento de este dinoflagelado en su medio natural.

**Palabras claves:** curvas de crecimiento, dinoflagelados epibentónicos, taxonomía molecular.

### Morphological and molecular analyses of *Coolia malayensis* (Dinophyceae) and effects of extracts of the macroalga *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae) on its growth

**ABSTRACT.** *Coolia* is a genus that at present includes eight species of epibenthic dinoflagellates of interest due to the toxins produced (e.g., cooliatoxin) by species of the genus and their associations with other toxic epibenthic dinoflagellate genera (*Ostreopsis*, *Amphidinium*, *Prorocentrum*, *Fukuyoa* and *Gambierdiscus*). There is limited information on the diversity and ecology of this genus along the coasts of Mexico. The objectives of this study were to identify by the use of integrative taxonomy (morphological and molecular) two isolates of *Coolia* (CMBAPAZ-1 and s/i 72) from Bahía de la Paz, Gulf of California and to determine the effects of the extracts from the macroalga *Dictyota dichotoma* on their growth. Both isolates were cultured in GSe medium with and without macroalgal extracts: 1) GSe medium, 2) GSe with the addition of the crude extract of *D. dichotoma*, 3) GSe with the addition of the carbohydrate fraction of *D. dichotoma*, and 4) GSe with the addition of the non-precipitable fraction of *D. dichotoma*. Morphological and molecular analyses of the 28S region of rDNA (*bootstrap* values > 95%) confirmed the identification of the isolates as *Coolia malayensis*. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) in the cell abundances of two strains in GSe medium compared with the other treatments. The maximum abundances found in strains CMBAPAZ-1 and s/i 72 at 28 days of culture were  $40,271 \pm 3,018$  and  $43,428 \pm 4,560$  cells mL<sup>-1</sup>, respectively. The growth rate ranged from 0.129 to 0.139 div day<sup>-1</sup> in both strains. The extract and fractions of *D. dichotoma* neither favored nor inhibited the growth of *C. malayensis*; therefore, the possibility that the macroalga may favor the growth of this dinoflagellate in its natural environment is not excluded.

**Keywords:** epibenthic dinoflagellates, growth curves, molecular taxonomy.

Ramos-Santiago A.E., Band-Schmidt C.J., Leyva-Valencia I., Muñoz-Ochoa M., Okolodkov Y.B. & Santiago-Morales I.S. (2022). Análisis morfológico y molecular de *Coolia malayensis* (Dinophyceae) y efectos de extractos de la macroalga *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae) en su crecimiento. *CICIMAR Océánides*, 37(1-2): 1-20.

### INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados epibentónicos son un grupo de eucariotas asociados al fondo marino. Se ha estimado que del total de dinoflagelados marinos reportados (aprox. 2000 especies), solo un 10% se consideran bentónicas (Hoppenrath *et al.*, 2014). Son un componente importante en los ecosistemas someros donde habitan sobre sustratos duros como roca y arena (epipsámicos), sustratos finos (epipélicos), formando asociaciones con macroalgas y pastos mari-

Fecha de recepción: 13 de abril de 2022

nos (epifíticos), y también se pueden encontrar sobre animales (epizóicos) (Almazán-Becerril *et al.*, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014; Marchan-Álvarez *et al.*, 2017). Además, presentan asociaciones microbianas con proteobacterias y actinobacterias, entre otras, por lo que son importantes en las redes tróficas de estos microorganismos (Ruh *et al.*, 2009; Tarazona-Janampa *et al.*, 2020). Por lo anterior, participan en la transferencia de materia y energía entre el fondo marino y la columna de agua (Barranguet, 1997).

Fecha de aceptación: 15 de septiembre de 2022

Existe un interés general por los dinoflagelados debido a su capacidad de formar florecimientos algales nocivos (FAN), eventos que ocurren cuando las condiciones fisicoquímicas y biológicas favorecen su reproducción masiva. Los dinoflagelados epibentónicos también tienen la capacidad de formar florecimientos algales nocivos bentónicos (FANb). Varias especies de dinoflagelados epibentónicos producen toxinas, entre los más comunes están los pertenecientes a los géneros: *Prorocentrum* Ehrenberg, *Amphidinium* Claperède et Lachmann, *Ostreopsis* Schmidt, *Coolia* Meunier, *Gambierdiscus* Adachi et Fukuyo, y *Fukuyoa* Gómez, Lopes et Lin (Momigliano *et al.*, 2013; Rahman-Shah *et al.*, 2014; Chinain *et al.*, 2020).

Las especies del género *Coolia* se caracterizan por ser unicelulares, biflageladas, redondeadas, ligeramente comprimidas antero-posteriormente, con el eje longitudinal oblicuo en relación con el plano del cíngulo, con la epiteca ligeramente menor que la hipoteca. Presentan ápice excéntrico, localizado en la parte izquierda-dorsal de la epiteca, y el antápice desplazado al lado ventral de la célula, con el surco excavado, bordeado con alas de dos lados, con tamaño de 25 a 50  $\mu\text{m}$  de largo (Faust, 1995; Laza-Martínez *et al.*, 2011; Hoppenrath *et al.*, 2014; Guiry y Guiry, 2022). El cíngulo es descendente, aproximadamente una anchura de este, excavado y con sus extremos no entrecruzados. La placa del poro apical (Po) en forma de ranura, con una fórmula tecal: Po, 3', 7'', 6c, 6 (?) s, 5''', 2'''' (Hoppenrath *et al.*, 2014). Tienen un núcleo subsférico y cloroplastos discoideos o redondeados de color verde-marrón (Tomas, 1997).

Actualmente, el género incluye a las especies: *C. monotis* Meunier, *C. tropicalis* Faust, *C. areolata* Ten-Hage, Turquet, Quod et Couté, *C. canariensis* Fraga, *C. malayensis* Leaw, P.-T. Lim et Usup, *C. palmyrensis* Karafas, Tomas et York, *C. santacroce* Karafas, Tomas et York y *C. guanchica* H. David, Laza-Martínez, F. Rodríguez et S. Fraga. Las fórmulas de la teca, tamaño y formas de la célula son los criterios morfológicos diagnósticos para identificar especies de *Coolia* (Hoppenrath *et al.*, 2014). Como características diagnósticas para la identificación a nivel de especie se han utilizado la forma y tamaño de las placas: 1' (primera placa apical), 6'' (sexta placa precingular) y 7'' (séptima placa precingular) (Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010; Laza-Martínez *et al.*, 2011; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Momigliano *et al.*, 2013; Hoppenrath *et al.*, 2014). Sin embargo, el uso de la proporción de la longitud al ancho de las placas es debatible, y está establecido que su forma varía mucho en cultivo (Hoppenrath *et al.*, 2014).

Algunas especies que conforman el género *Coolia* presentan morfología críptica y alta plasticidad fenotípica. Tal es el caso de *C. canariensis*, *C. monotis* y *C. malayensis*; por esto, a menudo se requiere de análisis de la variación morfológica con tecnología de microscopía electrónica de barrido, acompañado

de análisis molecular con el fin de comprender más sobre estos complejos de especies crípticas o pseudocrípticas (Momigliano *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2019). Las reconstrucciones filogenéticas en *Coolia* se han realizado con base en secuencias de las regiones 18S, 28S y 5.8S del ADN ribosomal (ADNr) (Laza-Martínez *et al.*, 2011; Momigliano *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2017; Sepúlveda-Villarraga, 2017).

Las condiciones para cultivar especies de *Coolia* son diversas. Se han empleado los medios L1 (Li *et al.*, 2020), ES-DK (Leaw *et al.*, 2010), IMK (Rahman-Shah *et al.*, 2014), K (Karafas *et al.*, 2015); f/2 (Aquino-Cruz y Okolodkov, 2016) y ESNW (Ben Gharbia *et al.*, 2017). Li *et al.* (2020) probaron temperaturas de 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 °C, otras temperaturas empleadas han sido de 20 °C (Rahman-Shah *et al.*, 2014), 24 °C (Fraga *et al.*, 2008), 25 °C (Karafas *et al.*, 2015) y 26 °C (Leaw *et al.*, 2010). Las irradiancias van de 47 a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Li *et al.*, 2020), 35 a 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Aquino-Cruz y Okolodkov, 2016), 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fraga *et al.*, 2008), 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Mohammad-Noor *et al.*, 2019) y 180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rahman-Shah *et al.*, 2014). Las salinidades probadas han sido amplias, desde 28 a 30 (Aquino-Cruz y Okolodkov, 2016), 31-32 (Leung *et al.*, 2017), 34 (Fraga *et al.*, 2008) y 36 (Ben-Gharbia *et al.*, 2017). Los ciclos de luz: oscuridad empleados han sido 12:12 h (Mohammad-Noor *et al.*, 2013, 2019; Rahman-Shah *et al.*, 2014; Aquino-Cruz y Okolodkov, 2016; Ben Gharbia *et al.*, 2017; Leung *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020) y 14:10 h (Fraga *et al.*, 2008; Leaw *et al.*, 2010; Karafas *et al.*, 2015).

Especies de *Coolia* están asociadas a macroalgas pardas de los géneros *Dictyota* J.V. Lamouroux, *Padina* Adanson, *Sargassum* C. Agardh, *Turbinaria* J.V. Lamouroux, entre otras (Rahman-Shah *et al.*, 2014; Wakeman *et al.*, 2015; Arbelaez *et al.*, 2017; Leung *et al.*, 2017; Boisnoir *et al.*, 2019). La posible preferencia de macroalgas por parte de los dinoflagelados se puede deber a su morfología, e incluso se ha considerado que pueden proveerle nutrientes para su crecimiento (Tindall y Morton, 1998; Mohammad-Noor *et al.*, 2019). Grzebyk *et al.* (1994), Accoroni *et al.* (2015), Ternon *et al.* (2020) y Ataka *et al.* (2021) han empleado dinoflagelados epibentónicos como modelos biológicos, encontrando que las macroalgas producen sustancias que pueden favorecer o inhibir su crecimiento.

Dado los pocos trabajos sobre el efecto de extractos de macroalgas en el crecimiento de dinoflagelados epibentónicos, en el presente estudio se analizó el efecto del extracto acuoso crudo y dos fracciones (no precipitable y de carbohidratos) de *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux (Phaeophyceae: Dictyotales: Dictyotaceae) en el crecimiento de *C. malayensis*. La macroalga *D. dichotoma* es una de las especies más comunes en la zona de estudio, además, es de fácil acceso debido a las zonas someras donde habita (Mateo-Cid *et al.*, 2000).

Las extracciones acuosas de macroalgas pueden contener diversos compuestos, por ejemplo: polifenoles, carbohidratos, vitaminas, macro y micronutrientes, que pueden favorecer el crecimiento de dinoflagelados (González-Giro *et al.*, 2015; El-Katony *et al.*, 2020). Empleando una mezcla de disolventes agua-etanol (extracción hidroalcohólica) se pueden extraer principalmente fenoles, taninos, cumarinas, entre otros compuestos en menor cantidad. La fracción precipitable, entre los principales productos se encuentran el laminaran, el fucoidan y algunas sales solubles del ácido algínico (González-Giro *et al.*, 2015). La fracción no precipitable puede contener principalmente sales minerales (González-Giro *et al.*, 2015). Por lo anterior, se espera que el extracto crudo y la fracción precipitable puedan beneficiar el crecimiento de *C. malayensis* debido a los compuestos que pudieran estar presentes, contrario a la fracción no precipitable que podría provocar un estrés salino en las células y verse reflejado en una disminución de la abundancia celular.

En general, las especies de Dictyotaceae se caracterizan por producir metabolitos con actividad antiincrustante que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos y especies macrobentónicas (Salvador *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 2008; Ternon *et al.*, 2020). Las interacciones alelopáticas entre los dinoflagelados epibentónicos y *D. dichotoma* han sido estudiadas en especies de *Ostreopsis*. Accoroni *et al.* (2015) mostraron que los tejidos frescos y secos de *D. dichotoma* inhibieron el crecimiento de *O. cf. ovata*. Ternon *et al.* (2020) estudiaron los metabolitos en extractos superficiales de cuatro especies de la familia Dictyotaceae, incluyendo a *D. dichotoma*, siendo esta última especie la que presentó una mayor cantidad de metabolitos bioactivos, actividad en los bioensayos de exposición del dinoflagelado a los extractos y una

mayor abundancia de *O. cf. ovata* en las muestras de campo. Se ha propuesto que estos metabolitos contribuyen en el asentamiento, crecimiento y producción de toxinas de los dinoflagelados epibentónicos (Blanchard *et al.*, 2015; Gémin *et al.*, 2020).

El objetivo de este estudio fue realizar la identificación morfológica y molecular a través de secuencias de la región 28S del ADNr de *C. malayensis*, ayudando a resolver la problemática taxonómica existente entre *C. monotis* y *C. malayensis* de la Bahía de La Paz, B.C.S., además de conocer la interacción de esta especie en cultivo con fracciones de la macroalga *D. dichotoma*. De influir los extractos de manera positiva en su crecimiento podrían ser útiles para establecer medios específicos para el crecimiento en laboratorio de dinoflagelados epibentónicos, los cuales actualmente son poco estudiados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron dos cepas de *Coolia* del IPN-CICIMAR (CMBAPAZ-1 y s/i 72) aislados de la Bahía de La Paz, en el sur del Golfo de California (Fig. 1, Tabla 2). Las cepas se mantuvieron en laboratorio en medio GSe, a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C, salinidad de 34, intensidad luminosa de 120 a 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y un ciclo de luz y oscuridad 12:12 h.

### Microfotografías

Se obtuvieron fotografías de ambos aislados con microscopio de luz, utilizando un microscopio compuesto Carl Zeiss Axio Imager.A2 y en un microscopio invertido Carl Zeiss Axio Vert.A1 equipado con una cámara digital Carl Zeiss AxioCam ICc 5 de 5 megapíxeles. Una vez obtenidas las microfotografías se midieron las células con el programa Photoshop CS6 Portable® (v. 13.1.2).

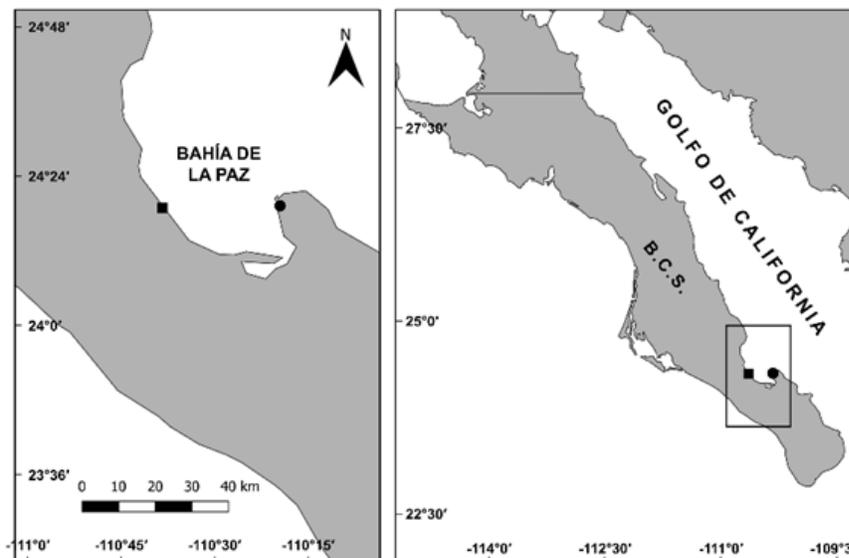


Figura 1. Área de muestreo en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Cuadro: El Sauzoso, localidad de aislamiento de la cepa CMBAPAZ-1; círculo: Balandra, localidad de aislamiento de la cepa s/i 72.

Tabla 1. Datos de los aislados de *Coolia* de la Bahía de La Paz, en el sur del Golfo de California, México.

Código de cepa	Fecha de aislamiento	Estación	Ubicación geográfica	Aislador
CMBAPAZ-1	14/07/2016	El Sauzoso	24° 31.093' N, 110° 64.116' O	M. Sepúlveda-Villaraga
s/i 72	02/06/2017	Balandra	24° 19.510' N, 110° 19.550' O	I. Leyva-Valencia

Para la observación de las tecas se realizó una tinción de estas con Calcofluor White M2R al 0.1% (p/v), se tomaron muestras de cultivos viejos (de 20 a 25 días) para asegurar la presencia de tecas vacías. A 20  $\mu$ L de muestra se le agregó 2  $\mu$ L de Calcofluor. Para la tinción con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) a 20  $\mu$ L de las muestras vivas se les agregó 1  $\mu$ L de glutaraldehído y 1  $\mu$ L de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol). La observación de las muestras teñidas se llevó a cabo en un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager.A2), equipado con un set de filtros para DAPI (EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50) y para fluoresceína (FITC, EX 450-490, BS FT 510, EM BP 515-565). Las microfotografías se obtuvieron con una cámara Carl Zeiss AxioCam 506 color de 6 megapíxeles.

Para la observación de células por microscopía electrónica de barrido, alícuotas de cultivos fijados con formol al 4% se lavaron de 5 a 7 veces en agua destilada en viales Eppendorf de 2 mL. Las células se deshidrataron progresivamente con etanol al 30, 50, 70, 90 y 100% durante 6 min en cada concentración. Las muestras se secaron al aire después de montarlas en forma de suspensión sobre un portamuestras de aluminio de 0.5' durante 4–5 h en una cápsula semicerrada. Usando una metalizadora Polaron SC7640 High Resolution Sputter Coater (Quarum Technologies, Newhaven, SXE, Reino Unido) las células se cubrieron con una capa de 20 nm de oro-paladio. Las células se observaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F (JEOL, Ltd., Tokio, Japón) a distancia de trabajo de 17.2-17.5 mm al voltaje de 2.0 kV en el régimen con detector de electrones secundarios inferiores (LEI: lower secondary electron detector, por sus siglas en inglés).

#### Extracción de ADN y PCR

Se realizó la extracción de ADN de ambas cepas, tomando 1 mL con ~ 3500 células del cultivo, centrifugándolas a 7,000 rpm en una centrifuga Sorvall Legend XTR (ThermoScientific, E.U.A.). El ADN se extrajo de la biomasa recuperada, utilizando el kit Quick-ADN™ Miniprep plus universal (Zymo Research). Para la amplificación se utilizó el kit Dream Taq ADN Polymerase e iniciadores específicos para la región 28S del ADNr (Hosoi-Tanabe *et al.*, 2006). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (BioRad modelo MJ MINI personal thermal cycler; California, E.U.A.) y se programó de la siguiente manera: se inició con un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 4 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 30 ciclos de 52 °C por 1:10 min y a 72 °C por 1:10 min, siguiendo

un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min y un ciclo a 10 °C por 10 min. Los resultados de extracción de ADN y PCR se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con Buffer TBE 1X. Los productos de PCR se enviaron para su purificación y secuenciación a la compañía de MacroGen (Seúl, Corea del Sur).

#### Análisis molecular

Las secuencias se editaron con el programa Sequencher® (v.4.1.4; Gene Codes Corporation), con las secuencias consenso se realizaron análisis BLAST con las bases de datos de GenBank. De esta base de datos se seleccionaron secuencias de las regiones genéticas correspondientes para la reconstrucción de los árboles filogenéticos, adicionalmente se seleccionaron secuencias para ser usadas como grupos externos (Anexo I). El análisis filogenético se realizó con el programa Mega (v.10.0.5) para el algoritmo de máxima verosimilitud (ML) y el programa MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) para el algoritmo de Inferencia Bayesiana (IB). El modelo de sustitución nucleotídica seleccionado con el programa jModelTest v.0.1.1 (Darriba *et al.*, 2012) fue el general de tiempo reversible (GTR). La construcción de los árboles se realizó con un *bootstrap* de 1,000 réplicas para ML y 3 x 10<sup>6</sup> generaciones para IB.

#### Elaboración de extracto crudo y fracciones de macroalga

Se llevó a cabo la recolecta de ejemplares de *D. dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux (M. Muñoz-Ochoa, com. pers.) en la localidad de El Sauzoso en la Bahía de La Paz. Los ejemplares de la macroalga fueron obtenidos mediante buceo libre a una profundidad máxima de 1 m y fueron colocados en bolsas de red y enjuagados con agua de mar para eliminar organismos epibiontes. Durante este proceso se evitó exponer las muestras a la luz solar hasta su transporte al laboratorio.

En el laboratorio se secó la macroalga a temperatura ambiente durante un día, después se molió utilizando un molino manual. Para la obtención del extracto crudo se modificó la técnica empleada por Villegas-Silva (2014). Se pesaron 50 g de macroalga (seca y molida), se agregó a un matraz un litro de agua destilada, y se hirvió por 30 min en una placa de calentamiento con agitación y control de temperatura (Thermo Scientific Cimarec™). La infusión se filtró colocando en un embudo un filtro de café y una capa de tierra de diatomeas (diatomita). Se obtuvieron aproximadamente 850 mL de extracto crudo. Dicho

volumen se esterilizó (15 min a 121 °C) y se guardó en refrigeración a 4 °C.

Del extracto crudo obtenido se separó la fracción no precipitable y la fracción de carbohidratos. Para la fracción no precipitable, 350 mL de extracto crudo fueron precipitados con un litro de etanol al 50%, se centrifugó a 3,000 rpm a 23 °C por cinco minutos; el sobrenadante fue separado por decantación (fracción no precipitable) y posteriormente se hirvió hasta eliminar residuos de etanol. El sólido precipitado se sometió a un proceso de secado a 55 °C por 15 h. Para la fracción de carbohidratos a 0.805 g del sólido precipitado seco se le adicionaron 40 mL de agua de mar estéril, y se colocó en un baño ultrasónico (Branson 1210 1210R-DTH; Branson Ultrasonics Corp., Brookfield, CT, E.U.A.) de agua caliente para su homogenización.

#### Cultivo de *C. malayensis* en extractos de *D. dichotoma*

Se obtuvieron cultivos de *C. malayensis* en medio GSe modificado (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015) con agua de mar esterilizada por filtración. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial (entre los días 6 a 12), se inició el experimento que consistió en un control y tres tratamientos: 1) GSe (control), 2) GSe con 0.25% del extracto crudo de *D. dichotoma* (ECR), 3) medio GSe con 0.25% de la fracción de carbohidratos de *D. dichotoma* (FDCR), y 4) GSe con 0.25% de la fracción no precipitable de *D. dichotoma* (FRNP).

Los tratamientos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de medio de 150 mL. Todos los tratamientos se iniciaron con una abundancia de 500 células por mililitro (cél mL<sup>-1</sup>). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 24 ± 1 °C, salinidad de 34, intensidad luminosa entre 120 y 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en un ciclo de luz y oscuridad 12:12 h.

Cada tercer día se tomaron 2 mL de muestra de cada unidad experimental, y se fijaron con Lugol ácido al 5% (Thronsdén, 1979). Los conteos se realizaron en una cámara Sedgwick-Rafter de 1 mL de capacidad, en un microscopio invertido Axio Vert.A1. Las tasas de crecimiento exponencial se determinaron para cada uno de los tratamientos utilizando la fórmula propuesta por Guillard (1973), donde: N<sub>1</sub> y N<sub>0</sub> son las abundancias celulares tomadas en el tiempo inicial (t<sub>0</sub>) y final (t<sub>1</sub>), tiempo transcurrido entre la inoculación y la obtención de la máxima abundancia celular.

$$\mu_e = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$$

#### Análisis estadístico

Debido a que el supuesto de homocedasticidad en los datos no se cumplió, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un valor de significancia de 0.05 (α). El análisis estadístico se realizó en el programa Statistica® (v.8; StatSoft, 2017).

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica

Las características morfológicas y morfométricas de las células de la cepa CMBAPAZ-1 permitieron identificarlas como *Coolia malayensis*. Los resultados morfométricos de la cepa s/i 72 no permitieron asignarle con seguridad el epíteto específico de *C. malayensis*, por lo que se identificó como *Coolia cf. malayensis*. Ambas cepas presentaron células individuales, redondeadas, comprimidas antero-posteriormente, de 19 a 30 μm de largo (Figs. 2A, B y D). La hipoteca en algunas células es más grande que la epitoca, el cingulo es profundo, ligeramente desplazado una anchura de este, descendente, y el sulcus es corto y hondo (Fig. 2D). El núcleo generalmente es esférico y se localiza en la zona antapical (Fig. 2F). Los cloroplastos son semicirculares y de color verde-dorado (Fig. 2C).

*Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1): El tamaño de las células tuvo un promedio de 25.38 ± 1.78 μm de largo (n=30, media ± DE – desviación estándar) y 24.21 ± 1.40 μm de ancho (n=15, media ± DE). Presentaron placas lisas, con poros distribuidos de manera casi homogénea, redondos en su mayoría y con un diámetro promedio de 0.23 ± 0.07 μm (n=20, media ± DE). La placa del poro apical (Po) presentó una ligera curvatura, con una longitud de 6.33 ± 0.36 μm (n=6, media ± DE) y 1.06 ± 0.3 μm de ancho (n=6, media ± DE); la Po estuvo rodeada de las placas apicales 1', 2' y 3' (Figs. 3, 4F, 5A y 6). Se observaron cuatro poros del complejo del poro apical (Figs. 4F y 5A). La placa apical 1' es estrecha, alargada y hexagonal, y está en contacto con las placas 6'', 7'', 1'', 2'', 2', Po y 3' (Figs. 4D y 6). La placa 2' es pentagonal, alberga el Po y se encuentra adyacente a las placas 2'', 3'', 4'' y 3' (Figs. 4F y 6). La placa 1'' es cuadrangular y está conectada a las placas 7'', 1' y 2'' (Figs. 4D y 5E). La placa 3' tiene forma de cuña y pentagonal, en contacto con las placas 1', Po, 2', 4'', 5'' y 6'' (Figs. 5A-B).

En la zona antapical la placa 1'''' es pequeña, en forma de una aleta, que también se le denomina aleta sulcal (AS), y está en contacto con las placas 2'''' y 1'''' (Figs. 4C y E). La placa antapical 2'''' también es pequeña, cuadrangular, con 5 a 7 poros, y está en contacto con las placas postcingulares (3''', 4'''' y 5''') y la placa antapical 1'''' (Figs. 4C y E). Placa 4'' está conectada a las placas 3'', 2' y 3' (Fig. 6). En la hipoteca la placa más ancha y grande es la tercera placa postcingular 3''', la cual ocupa casi la mitad de la hipoteca (Figs. 4B y 5C). La placa 6'' es la más ancha y grande de la epitoca (Fig. 4A). La placa 7'' es pentagonal, con 7 a 8 poros, y la relación de largo a ancho es de ca. 1.05, estando rodeado de las placas 6'', 1' y 1'' (Figs. 3B, 4A y 5D). La fórmula tecal es: Po, 3', 7'', 6c, 6(?) s, 5''', 2''''.

*Coolia cf. malayensis* (cepa s/i 72): Las células midieron en promedio 26.48 ± 2.08 μm de largo (n=30, media ± DE) y 23.76 ± 1.69 μm de ancho (n=8,

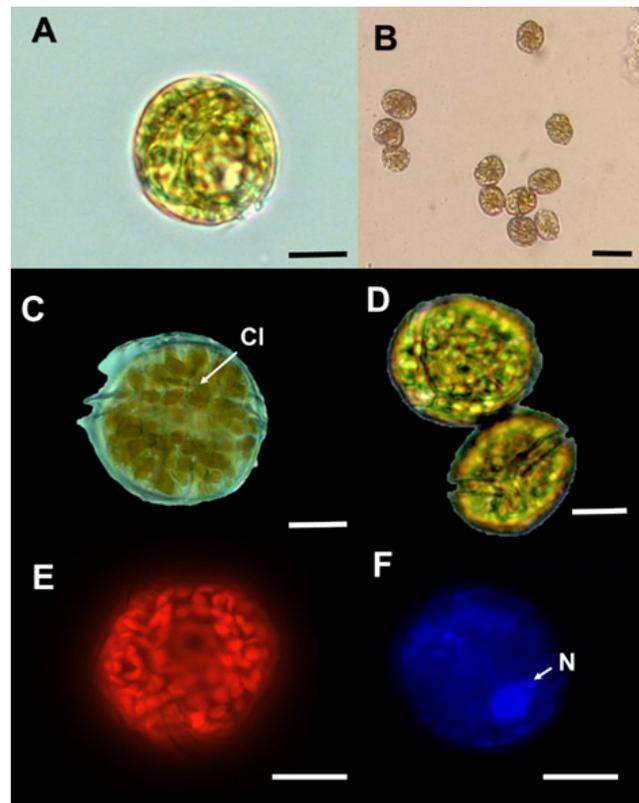


Figura 2. Morfología de células de *Coolia* en microscopio de luz: (A) vista antapical; (B) células en cultivo; (C y E) vista dorsal, mostrando detalles de cloroplastos (Cl) ovalados de color verde-dorado (E); (D) células mostrando la posición del cíngulo y sulcus, vista apical-ventral (arriba) y ventral (abajo); (F) célula mostrando la posición del núcleo (N) semicircular, vista ventral (tinción DAPI). A-D – campo claro, E y F – epifluorescencia. Escala: A, C, D, E y F = 10  $\mu$ m, B = 30  $\mu$ m.

media  $\pm$  DE). Las placas tecaes presentaron poros redondos con un diámetro de  $0.31 \pm 0.05 \mu\text{m}$  ( $n=17$ , media  $\pm$  DE). La placa poro apical (Po) está rodeada de las placas apicales 1', 2' y 3' (Figs. 8A y D); con un tamaño de  $5.49 \pm 0.26 \mu\text{m}$  de largo ( $n=6$ , media  $\pm$  DE) y  $0.92 \pm 0.25$  de ancho ( $n=6$ , media  $\pm$  DE). La placa apical 1' es estrecha, alargada y aparentemente hexagonal (Fig. 8C). La placa 2' es pentagonal, alberga el Po, y adyacente a ella se encuentran las placas 2'', 3'', 4'' y 3' (Figs. 7A y C). La placa 3' es pentagonal, en contacto con las placas 1', Po, 2', 4'', 5'' y 6'' (Fig. 8A). En la zona antapical la placa 1''' es pequeña y está en contacto con las placas 2''', 3''' y 2''' (Fig. 8B). Placa 4'' está conectada a las placas 3'', 2' y 3' (Figs. 7F y 8A). En la hipoteca la placa más ancha y grande es la placa 3''' (Fig. 8B). La placa 6'' es la más ancha con respecto al resto de las placas de la epiteca (Fig. 8A), y la placa precingular 7'' es pentagonal (Fig. 7E).

#### Identificación molecular

La reconstrucción filogenética basada en secuencias de la región 28S del ADNr involucró un total de 24 secuencias. No se incluyeron secuencias de las especies *Coolia areolata* y *Coolia guanchica* debido a que no existen secuencias de la región 28S de ADNr en las bases de datos del GenBank. El análisis filogenético reveló un total de cinco clados. Las secuen-

cias obtenidas de las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 se agruparon dentro del clado de *C. malayensis* con un soporte de *bootstrap* de 95% y probabilidad *posteriori* de 0.99 (Fig. 9, clado A). Las secuencias de las dos cepas de *Coolia* de Bahía de La Paz mostraron la presencia de dos haplotipos, revelando dos sub-clados dentro del clado de *C. malayensis*. La secuencia de la cepa CMBAPAZ-1 tiene mayor afinidad filogenética con secuencias provenientes de aislados de Malasia, Australia y Nueva Zelanda, mientras que el haplotipo de la cepa s/i 72 es compartido con secuencias de un aislado de las Islas Fiji (Fig. 9, clado A). Las secuencias de *C. malayensis* de Japón se separaron de sus conespecíficas (clado C) con un soporte del *bootstrap* del 100%. *Coolia monotis*, *C. palmyrensis* y *C. santacroce* formaron el clado B con subclados bien definidos, mientras que *C. tropicalis* y *C. canariensis* fueron agrupadas en sub-clados dentro del clado D, con un soporte mayor al 96% (Fig. 9). Las dos secuencias del grupo externo *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo se agruparon en un clado distinto (Fig. 9, clado E).

#### Curvas de crecimiento

##### *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1)

Las curvas de crecimiento para la cepa CMBAPAZ-1 mostraron una fase de aclimatación que abar-

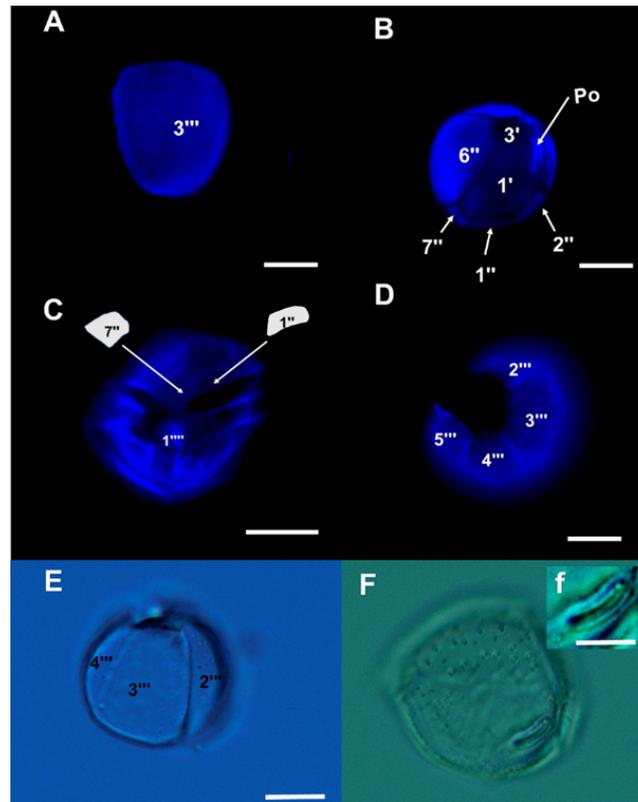


Figura 3. Placas tcales de *Coolia malayensis* en microscopio de luz: (A) placa 3''', en vista dorsal; (B, F-f) placa del poro apical, placas apicales (1'–3') y precingulares (1'', 2'', 6'' y 7''), vista apical; (C) placas precingulares (1'' y 7''), vista ventral; (D y E) células en vista antapical, mostrando el arreglo de placas postcingulares (2'''–5'''). A-D – epifluorescencia, E y F – campo claro. Escala: A-F = 10  $\mu\text{m}$ , f = 6  $\mu\text{m}$ .

có del día cero al día cuatro de cultivo, seguido de una fase de crecimiento exponencial que inició el día seis (Fig. 10). No se identificaron las fases estacionarias y de decaimiento en ninguno de los tratamientos. La abundancia celular promedio más alta en la cepa CMBAPAZ-1 a los 28 días fue de  $40,271 \pm 3,018$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que la menor fue de  $32,098 \pm 2,393$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para el mismo día (Fig. 10). El análisis de Kruskal-Wallis arrojó que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos con respecto al control.

#### *Coolia cf. malayensis* (cepa s/i 72)

El período de aclimatación duró dos días, seguido de una fase exponencial que inició al día cuatro de cultivo. A partir del día cinco las abundancias promedio oscilaron (aumentaron y disminuyeron) en todos los tratamientos (Fig. 11). La abundancia máxima en *C. cf. malayensis* se registró en el día 28 de cultivo con una abundancia promedio de  $43,428 \pm 4,560$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 11). Las tasas de crecimiento más altas en las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 fueron de  $0.135 \pm 0.007$  y  $0.139 \pm 0.003$  divisiones por día ( $\text{div día}^{-1}$ ), respectivamente (Tabla 2). El análisis de Kruskal-Wallis mostró que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en las abundancias máximas obtenidas entre los tratamientos con respecto al control.

## DISCUSIÓN

### Caracterización morfológica

El largo de la placa del poro apical (Po) de células de *Coolia* aisladas de la Bahía de La Paz (cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72) concuerdan con los tamaños reportados por Leaw *et al.* (2010), Karafas *et al.* (2015) y Tibiriçá *et al.* (2020) para *C. malayensis*. Gómez *et al.* (2016) ampliaron el rango del largo del Po (6–9  $\mu\text{m}$ ) para esta especie. En el presente estudio no se reportaron tamaños mayores a 6.5  $\mu\text{m}$ . Un tamaño del Po mayor a 7  $\mu\text{m}$  se ha reportado en *C. monotis* (E.U.A. y España), *C. tropicalis* (Malasia e Indonesia), *C. guanchica* (Tenerife, Islas Canarias) y *C. areolata* (Océano Índico occidental) (Ten-Hage *et al.*, 2000; Laza-Martínez *et al.*, 2011; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; David *et al.*, 2019).

Otra característica diagnóstica para identificar especies del género *Coolia* es la forma de la placa apical 3'. Esta placa en células de las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 se observó en forma de cuña y pentagonal, que está en contacto a las placas Po, 1', 2', 4'', 5'' y 6'', coincidiendo con lo reportado y observado de las ilustraciones de varios autores para *C. malayensis* (Jeong *et al.*, 2012; Karafas *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2019;

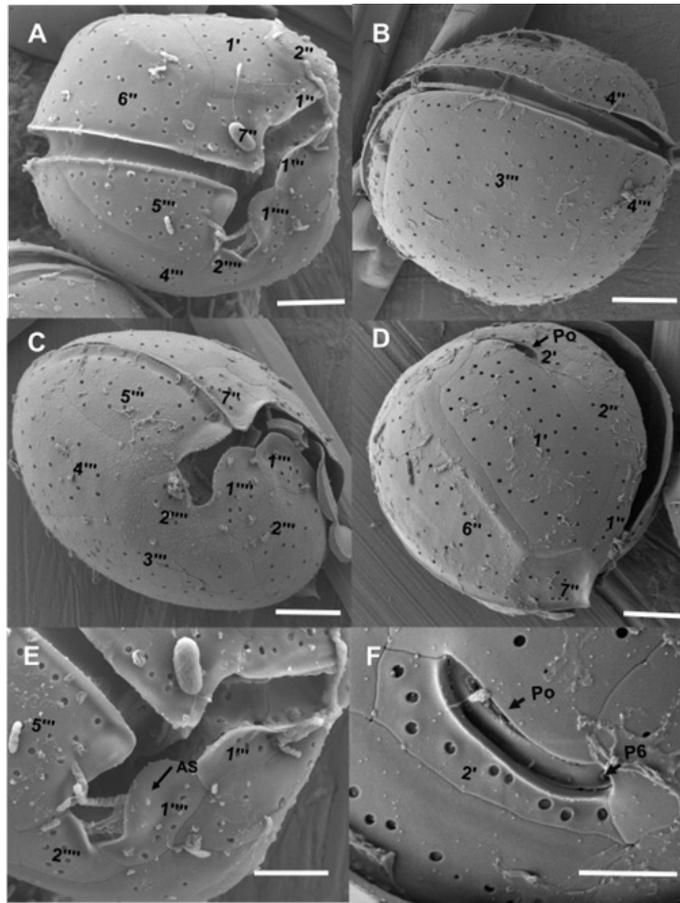


Figura 4. Placas tecales de *Coolia malayensis* en microscopio electrónico de barrido: (A y E) placas apicales (1', 2'', 6'' y 7''), postcingulares (1''' y 5'''), y la aleta sulcal (AS), vista ventral; (B) placas postcingulares (3''' y 4'''), vista dorsal; (C) placas antapicales (1'''' y 2''') y postcingulares (1'''–5'''), vista ventral-apical; (D) placas apicales (1' y 2') y precingulares (1'', 2'', 6'' y 7''), vista apical; (F) placa del poro apical (Po) y placas adyacentes. Escala: A–D = 5  $\mu$ m, E = 4  $\mu$ m y F = 3  $\mu$ m.

Tibiricá *et al.*, 2020). Contrario a lo anterior, Leaw *et al.* (2010) mencionan que la placa 3' en *C. malayensis* es cuadrangular y no está en contacto con la placa 5'', pero en sus imágenes de microscopía electrónica no se puede observar a detalle dicha placa, aun así, los autores realizaron una ilustración del arreglo tecal para esta especie, la cual podría ser incorrecta y requiere corroborarse.

Tabla 2. Tasas de crecimiento exponencial (div día<sup>-1</sup>) de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1) y *C. cf. malayensis* (cepa s/i 72) en cuatro condiciones de cultivo. Control: GSe sin extracto de macroalga; FDCR: GSe con fracción de carbohidratos; ECR: GSe con extracto crudo; FRNP: GSE con fracción no precipitable.

Tratamientos	CMBAPAZ-1 (div día <sup>-1</sup> )	s/i 72 (div día <sup>-1</sup> )
Control	0.130 ± 0.013	0.120 ± 0.006
FDCR	0.125 ± 0.005	0.126 ± 0.007
ECR	0.135 ± 0.007	0.134 ± 0.012
FRNP	0.135 ± 0.002	0.139 ± 0.003

En este estudio, la placa antapical 2'''' es pequeña y cuadrangular, conectada con las placas 3''', 4''', 5''' y 1''', igual a lo observado por Jeong *et al.* (2012) y Gómez *et al.* (2016). A pesar de ser un carácter descriptivo, es importante mencionar que Tibiricá *et al.* (2020) indican que dicha placa es triangular; del mismo modo, en las imágenes de Leung *et al.* (2017) se puede observar que esta placa no está en contacto con la placa postcingular 5''''.

Es importante la obtención de imágenes de alta resolución para observar los poros que contiene la placa Po. En este estudio las fotografías de microscopía electrónica de barrido no mostraron con claridad dichos poros por el ángulo de la imagen, presencia de partículas no vivas y bacterias. Se ha reportado que *C. malayensis* tiene alrededor de 10 poros (Jeong *et al.*, 2012). En el presente estudio se pudieron observar solo cuatro poros, este podría ser un carácter de importancia taxonómica debido a que es variable entre especies de *Coolia* (por ejemplo, *C. canariensis*, cuya placa Po contiene alrededor de 13 poros).

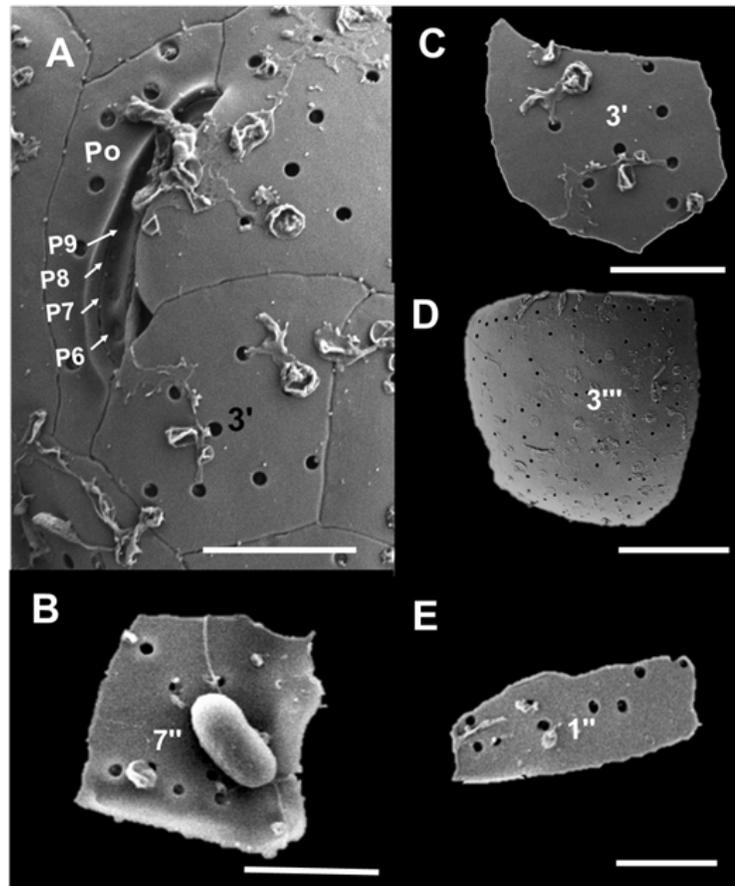


Figura 5. Poro apical, placas adyacentes y algunas placas de importancia taxonómica de *Coolia malayensis* en microscopio electrónico de barrido: (A) placa del poro apical (Po) y poros que lo componen (P6–P9); (B–E) placas de importancia taxonómica. Escala: A y B = 3  $\mu\text{m}$ , C = 10  $\mu\text{m}$ , D y E = 3  $\mu\text{m}$ .

*Coolia malayensis* presentó células de 25.38–28.58  $\mu\text{m}$  de largo y de 23.76–25.61  $\mu\text{m}$  de ancho. Estos rangos de tamaño coinciden con los reportados por Gómez *et al.* (2016), Nascimento *et al.* (2019) y Tibiriçá *et al.* (2020) para cepas de *C. malayensis* aisladas de Brasil y Puerto Rico (16.6–33  $\mu\text{m}$  de largo y 19–33  $\mu\text{m}$  de ancho). Karafas *et al.* (2015) y Wakeman *et al.* (2015) reportan tamaños promedio de células de *C. malayensis* en cultivo de  $24.5 \pm 2.7$   $\mu\text{m}$  de largo y de  $25.7 \pm 2.4$   $\mu\text{m}$  de ancho para aislados de la República Dominicana, Islas Vírgenes y Carolina del Norte, E.U.A. Estas cepas fueron cultivadas en diferentes medios de cultivo (K, f/2 e IMK) a una salinidad de 39 y temperatura de 25°C, pudiendo deberse las diferencias de los tamaños celulares a las condiciones de cultivo. Es necesario realizar estudios comparativos de las cepas de la misma especie en las mismas condiciones para corroborar esas diferencias de tamaños.

En la Bahía de La Paz se han reportado células de *C. malayensis* de 23.4–31  $\mu\text{m}$  largo y de 25–28  $\mu\text{m}$  de ancho (Hernández-Castro, 2017; Sepúlveda-Villarraga, 2017), siendo similares a los tamaños de células de las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72. No obstante, para

aislados de *C. malayensis* de la isla Jeju, Corea del Sur, se han reportado tamaños celulares más grandes (32.2–34.3  $\mu\text{m}$  de largo y 34.8–38.3  $\mu\text{m}$  de ancho); estas células fueron cultivadas en medios MK y f/2, a una salinidad de 30 y a 20 °C (Rahman-Shah *et al.*, 2014).

Las variaciones en los tamaños pueden explicarse en parte por las condiciones de cultivo (temperatura, salinidad, luz y nutrientes/medio). Algunos dinoflagelados epibentónicos (por ejemplo, *Ostreopsis* cf. *ovata*) suelen deformarse a cambios de temperatura y salinidad; estas deformaciones pueden tener implicaciones en los reportes de los tamaños celulares (Carnicer *et al.*, 2015). Después de una revisión bibliográfica e incluyendo los datos obtenidos en este estudio en el cual las células no sufrieron deformaciones, se concluyó que *C. malayensis* puede presentar tamaños celulares en cultivo de 16.6 a 35.0  $\mu\text{m}$  de largo (Anexo I).

#### Análisis molecular

Las secuencias de las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 comparten el 98.19% de similitud, difiriendo en nueve sitios de nucleótidos, lo cual indica que en la

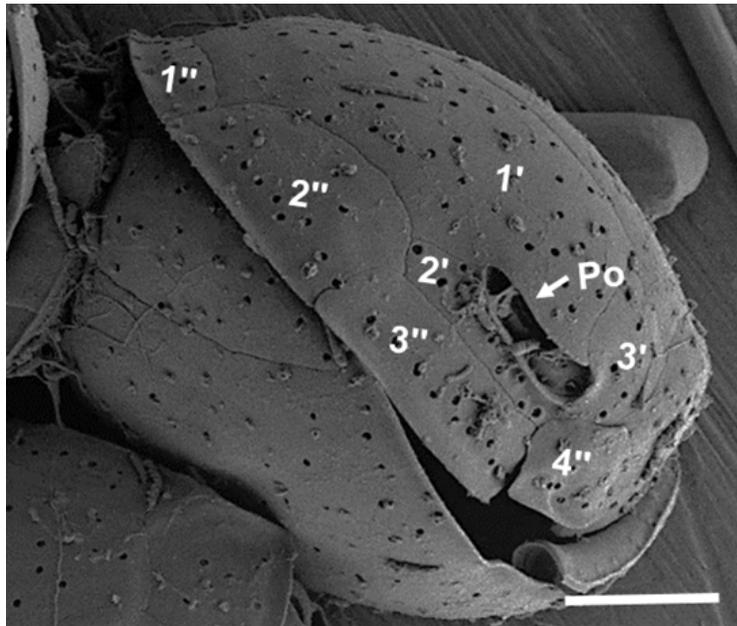


Figura 6. Placas tectales de *Coolia malayensis* en vista lateral izquierda, con énfasis en la epiteca, en microscopio electrónico de barrido: placas apicales (1' y 3'), placas precingulares (1''-4'') y placa del poro apical (Po). Escala: 6  $\mu\text{m}$ .

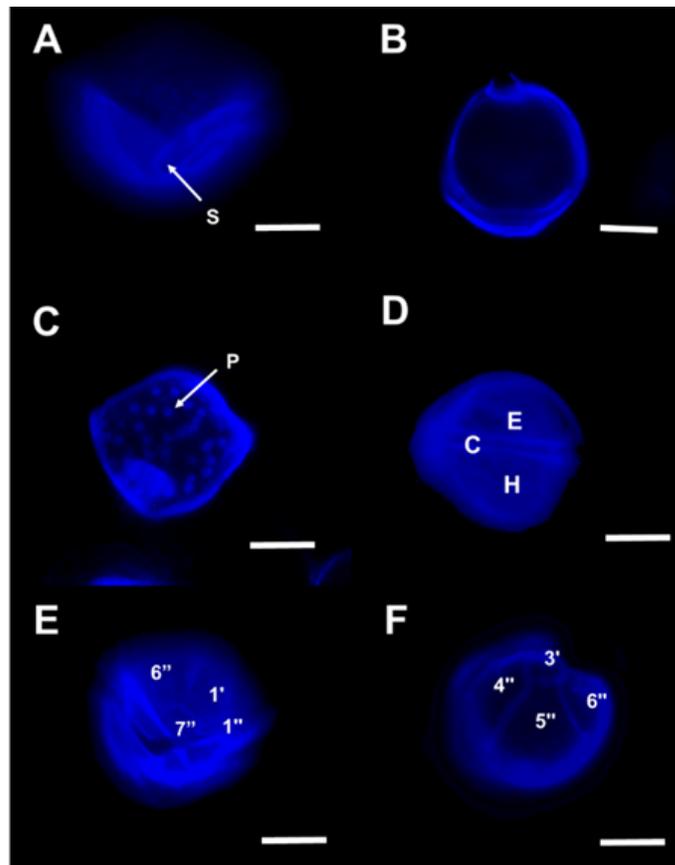


Figura 7. Placas tectales de *Coolia* cf. *malayensis* (cepa s/í 72) en microscopio de epifluorescencia: (A) sulcus, vista ventral; (B) vista antapical; (C) vista lateral izquierda, se distinguen poros tectales (P); (D) cíngulo y las porciones de la epiteca (E) e hipoteca (H), vista dorsal; (E y F) placa apical 3' y precingulares 4''-6''. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

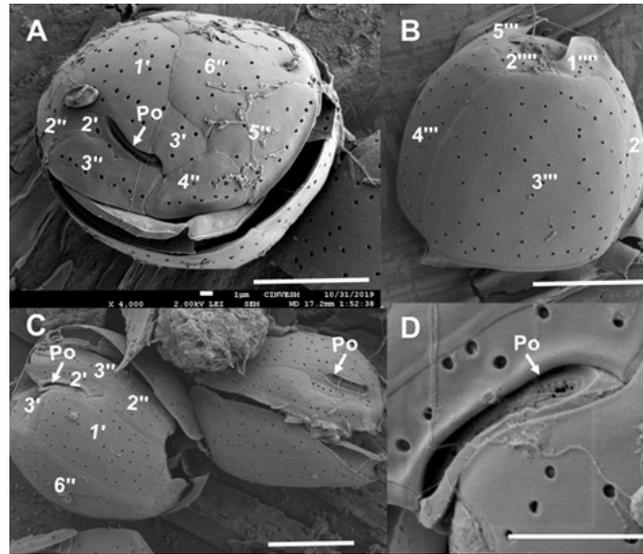


Figura 8. Placas tecales de *Coolia* cf. *malayensis* (cepa *s/i* 72) en microscopio electrónico de barrido: (A) placas apicales (1''-3''), precingulares (2''-6'') y placa del poro apical (Po), vista apical-izquierda; (B) placas antapicales (1''' y 2''') y postcingulares (2'''-4'''), vista dorsal; (C) células en vista lateral izquierda; (D) placa del poro apical. Escala: A-C = 10  $\mu$ m, D = 4  $\mu$ m.

Bahía de La Paz existen al menos dos haplotipos de *C. malayensis* para la subunidad 28S de ADNr. Estas variantes haplotípicas podrían traducirse en la especie como poblaciones con distinto grado de expresión genética e implicaciones fisiológicas. Algo similar se ha observado en *C. monotis*. Usando secuencias de la región 5.8S de ADNr-ITS, Penna *et al.* (2005) obtuvieron dos clados distintos de esta especie: un clado que agrupaba secuencias de *C. monotis* del Mediterráneo y del Atlántico Noroeste, y un segundo clado con secuencias de Malasia y de Florida, E.U.A. Estos

autores sugieren que esos clados son genéticamente distintos o que podrían ser especies distintas. A pesar de las variaciones antes mencionadas, las secuencias de este trabajo presentaron afinidad filogenética con secuencias identificadas como *C. malayensis*, con soportes de *bootstrap* mayores al 90% y probabilidad posterior mayor a 0.95. Sepúlveda-Villarraga (2017), usando el marcador 28S de ADNr obtuvo soportes de *bootstrap* del 100% para la misma cepa usada en este estudio (CMBAPAZ-1), por lo tanto, en la Bahía de La Paz se confirma la presencia *C. malayensis*.

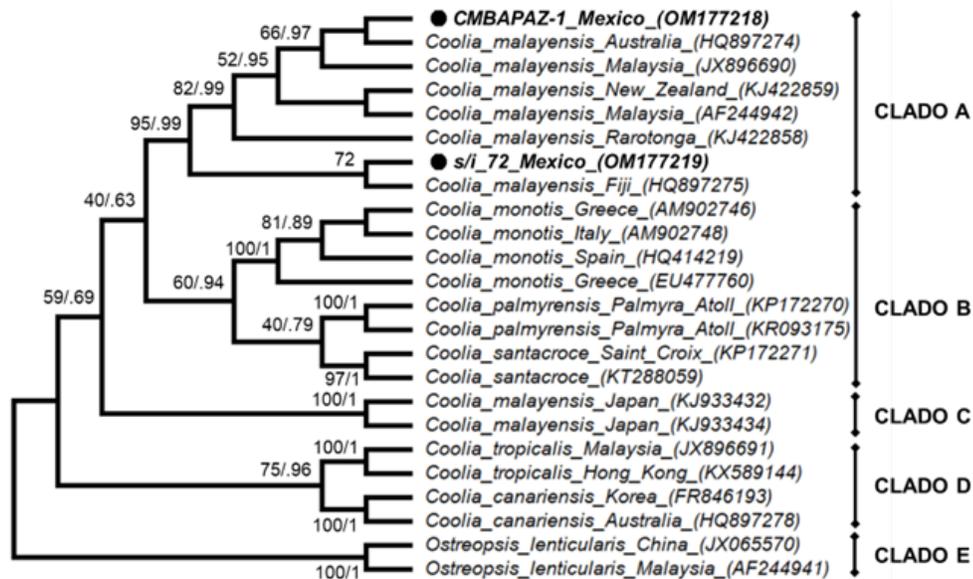


Figura 9. Análisis filogenético de la región 28S del ADNr de las cepas CMBAPAZ-1 y *s/i* 72 (círculos negros). El análisis involucró 24 secuencias de nucleótidos, con un total de 700 posiciones en el conjunto de datos final. Los valores en las ramas indican el porcentaje de soporte del *bootstrap* para máxima verosimilitud y probabilidad posterior para inferencia Bayesiana.

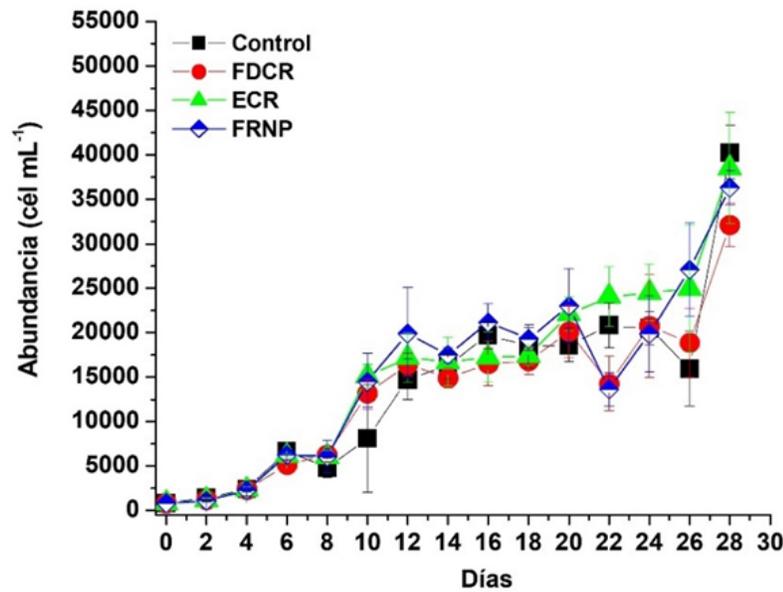


Figura 10. Curvas de crecimiento de *Coolia malayensis* (cepa CMBAPAZ-1) en cuatro condiciones de cultivo. Control: GSe sin extracto de macroalga; FDCR: GSe con fracción de carbohidratos; ECR: GSe con extracto crudo; FRNP: GSe con fracción no precipitable.

#### Crecimiento y condiciones de cultivo

El extracto y fracciones de la macroalga no le proporcionaron un beneficio en el crecimiento a *C. malayensis*. No obstante, se deben considerar posibles deficiencias en el diseño experimental o en los procedimientos, como la posible desnaturalización de alguna proteína o pérdida de vitaminas y minerales, que probablemente les proporciona la macroalga a especies de *Coolia* en su medio natural y que beneficie su crecimiento. También existe la posibilidad de que

la macroalga solo le confiera un sustrato a *Coolia*: se ha observado que *Padina* y *Sargassum* proporcionan áreas más amplias para la adhesión de dinoflagelados epifitos (Accoroni *et al.*, 2015; Mohammad-Noor *et al.*, 2019).

Accoroni *et al.* (2015) determinaron la interacción entre *Ostreopsis cf. ovata* y tres especies de macroalgas: *D. dichotoma*, *Rhodomenia pseudopalmata* (J.V. Lamouroux) P.C. Silva (Rhodophyta) y *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). Establecieron tres

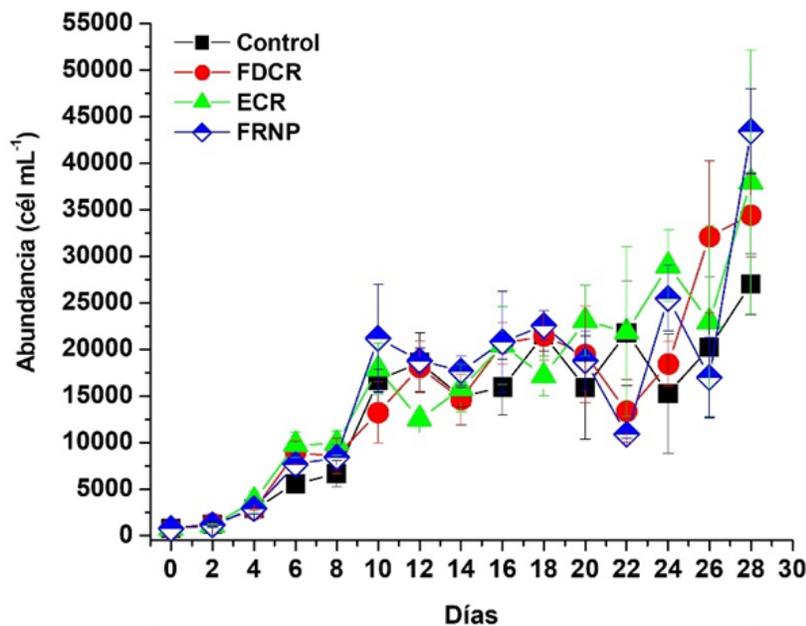


Figura 11. Curvas de crecimiento de *Coolia malayensis* (cepa s/i 72) en cuatro condiciones de cultivo. Control: GSe sin extracto de macroalga; FDCR: GSe con fracción de carbohidratos; ECR: GSe con extracto crudo; FRNP: GSe con fracción no precipitable.

experimentos: (1) *O. cf. ovata* cultivada con tejidos frescos de las macroalgas, (2) medios en los que se cultivaron previamente las macroalgas, y (3) medio f/4 modificado con la adición de polvo de macroalgas a diferentes concentraciones (0.4, 0.8 y 1.6 g L<sup>-1</sup>). *Dictyota dichotoma* inhibió el crecimiento de *O. cf. ovata* en todas las condiciones probadas. En este estudio los extractos y fracciones de *D. dichotoma* no inhibieron el crecimiento de *C. malayensis*, pero tampoco favorecieron su crecimiento. Se obtuvieron abundancias celulares mayores o similares a las reportadas en trabajos previos de *C. malayensis* cultivadas en medios: IMK, f/2, GSe diluido al 50%, ES-DK y L1 sin silicato (Rahman-Shah *et al.*, 2014; Ben-Garbia *et al.*, 2016; Sepúlveda-Villaraga, 2017; Mohammad-Noor *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

A pesar de que se ha reportado que la familia Dictyotaceae presenta compuestos bioactivos antimicrobianos que podrían tener efectos negativos en el crecimiento de los dinoflagelados epifitos, en el medio natural se debe considerar que los factores fisicoquímicos (por ejemplo, temperatura, salinidad e irradiancia) y biológicos interactúan y pueden influir en el asentamiento de estos organismos (Cohu *et al.*, 2011; Ternon *et al.*, 2020). Se ha observado que durante el verano (el tiempo de recolecta de macroalgas en el presente estudio) los extractos de tejidos sólidos y frescos de *D. dichotoma* carecen de actividad antimicrobiana, lo que pudiera favorecer el asentamiento de los dinoflagelados epifíticos en su medio natural (Salvador *et al.*, 2007), y en este caso verse reflejado en un efecto neutro de los extractos evaluados.

Para aclarar las hipótesis anteriores, es recomendable evaluar otros métodos de preparación de extractos y estandarizar los realizados en este estudio. Es necesario conocer la composición química de los extractos, determinar si contienen compuestos asimilables para *Coolia*, probar el efecto de la macroalga viva, realizar estudios anuales sobre la presencia de metabolitos en la macroalga y evaluar su influencia en el crecimiento de los dinoflagelados epifíticos en la Bahía de La Paz.

Rahman-Shah *et al.* (2014) obtuvieron abundancias celulares (de 30,000 cél mL<sup>-1</sup> a 60,000 cél mL<sup>-1</sup>) y tasas de crecimiento (de 0.19 a 0.29 div día<sup>-1</sup>) para *C. malayensis* mayores a lo reportado en este estudio (temperatura de 24 ± 1 °C, salinidad de 34, intensidad luminosa entre 120 y 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Estudios que reportan abundancias celulares menores a lo reportado en este trabajo son los de Sepúlveda-Villaraga (2017), Mohammad-Noor *et al.* (2019) y Li *et al.* (2020). Estos estudios reportan abundancias celulares para *C. malayensis* de 4,301 ± 79 cél mL<sup>-1</sup>, 1,000 cél mL<sup>-1</sup> y de 10,000 a 13,000 cél mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Cabe mencionar que en los trabajos Mohammad-Noor *et al.* (2019) y Li *et al.* (2020) la abundancia de inoculación y las condiciones de cultivo fueron diferentes, usaron medio ES-DK y L1, salinidad de 30±1 e irradiancias de 47 a 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Mohammad-Noor *et al.* (2013), Ben Gharbia *et al.* (2017) y Larsson *et al.* (2019) registraron un crecimiento óptimo para *C. malayensis* a salinidades entre 35 y 36, y temperaturas de 24 a 30 °C. Leaw *et al.* (2016) informaron que *C. malayensis* de Florida, E.U.A. no sobrevivió por debajo de 20 °C, mientras que Li *et al.* (2020) reportaron que *C. malayensis* de Hong Kong sobrevive y crece a temperaturas entre 16 y 28 °C en condiciones controladas. La temperatura empleada en este estudio estuvo dentro del rango óptimo que reportan para *C. malayensis*, sin embargo, la salinidad es menor. Estos datos sugieren que la misma especie de diferentes regiones geográficas tiene variaciones en su ventana ambiental óptima.

Varios autores mencionan que la salinidad y la temperatura influyen en el crecimiento de *Coolia* y de los dinoflagelados en general (Armi *et al.*, 2010; Ben Gharbia *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020). Algunas especies de *Coolia* responden a las condiciones fisicoquímicas de manera muy particular. *Coolia tropicalis* tiene un crecimiento óptimo a una temperatura de 27 °C, condiciones salobres (~ 25) y niveles de irradiancia moderadas (150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), y la osmorregulación es variable entre cepas de la misma especie (Larsson *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

El análisis morfológico permitió identificar a la cepa CMBAPAZ-1 como *Coolia malayensis*, mientras que en la cepa s/i 72 debido a falta de información morfológica no se determinó su identidad taxonómica. Ambas cepas fueron identificadas como *C. malayensis* con las secuencias de la región 28S del ADNr. El análisis filogenético de secuencias de la misma región mostró 98.19% de similitud entre las cepas CMBAPAZ-1 y s/i 72 con diferencias en nueve nucleótidos, lo cual indica que en la Bahía de La Paz existen dos haplotipos de *C. malayensis*. Se caracterizaron dos fases de crecimiento (fase adaptativa corta y exponencial) en ambas cepas de *C. malayensis* durante 28 días de cultivo. El extracto y las fracciones de la macroalga parda *Dictyota dichotoma* no favorecieron el crecimiento de las cepas de *C. malayensis*; sin embargo, tampoco la inhibieron por lo que no se excluye la posibilidad de que la macroalga pueda estar proporcionando un beneficio a este dinoflagelado epibentónico/epifítico en su medio natural.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dora A. Huerta-Quintanilla por su trabajo en el microscopio electrónico de barrido en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, Yucatán, México, a Patricia Quintana-Owen por el apoyo financiero para poder realizar este trabajo (proyectos FOMIX-Yucatán 108160 y CONACyT LAB-2009-01 123913) y a Cristina Landa-Cansigno (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México) por su ayuda con la literatura. Este estudio se financió con el apoyo de los proyectos de Ciencia

Básica de CONACyT A1-S-14968, CONACyT-INFR-2015, CONACyT 248468, FORDECyT 260040 y el proyecto SIP 2022-1652. Finalmente, agradecemos a los dos revisores anónimos del manuscrito por sus comentarios y observaciones.

## REFERENCIAS

- Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C., y Totti, C. (2015). Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and macroalgae. *Harmful Algae*, *49*, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.007>
- Almazán-Becerril, A., Rosiles-González, G., Escobar-Morales, S., Rodríguez-Palacios, M., y Hernández-Becerril, D.U. (2012). *Dinoflagelados bentónicos del Arrecife Mesoamericano: Caribe mexicano*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Aquino-Cruz, A., y Okolodkov, Y.B. (2016). Impact of increasing water temperature on growth, photosynthetic efficiency, nutrient consumption, and potential toxicity of *Amphidinium* cf. *carterae* and *Coolia monotis* (Dinoflagellata). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *51*(3), 565-580. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300008>
- Arbelaez, N., Mancera-Pineda, J.E., y Reguera, B. (2017). Epiphytic dinoflagellates of *Thalassia testudinum* in two coastal systems of the Colombian Caribbean. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, *46*(2), 9-40. <https://doi.org/10.25268/bimc.invenmar.2017.46.2.725>
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., y Ben-Maiz, N. (2010). First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environmental Monitoring and Assessment*, *164*, 423-433. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0903-z>
- Ataka, T., Funaki, H., Yamaguchi, H., y Adachi, M. (octubre de 2021). Effect of adding macroalgal extracts on the growth of *Gambierdiscus scabrosus* and *G. silvae* isolated from Japan. En C.J. Band-Schmidt (Presidencia). Resumen del XIX International Conference on Harmful Algae, La Paz, Baja California Sur, México.
- Barranguet, C. (1997). The role of microphytobenthic primary production in a Mediterranean mussel culture area. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, *44*, 753-765. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0153>
- Ben-Gharbia, H., KeÂfi-Daly, Y.O., Cecchi, P., Maseret, E., Amzil, Z., Herve, F., Laabir, M. (2017). New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates. *PLoS ONE*, *12*(11), e0187963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187963>
- Bianco, É. M., Rogers, R., Teixeira, V.L., y Pereira, R. (2008). Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. *Journal of Applied Phycology*, *21*(3), 341-346. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9374-9>
- Blanfuné, A., Boudouresque, C.F., Grosseil, H., y Thibaut, T. (2015). Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(16), 12332-12346. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4525-4>
- Boisnoir, A., Pascal, P.Y., Cordonnier, S., y Lemée, R. (2019). Spatio-temporal dynamics and biotic substrate preferences of benthic dinoflagellates in the Lesser Antilles, Caribbean Sea. *Harmful Algae*, *81*, 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.012>
- Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., Durán-Riveroll, L.M., Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E.J.,... 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*, *32*(3), 381-394. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1000978>
- Carnicer, O., Tunin Ley, A., Andree, K.B., Turquet, J., Diogène, J., y Fernández Tejedor, M. (2015). Contribution to the genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): molecular, morphologic and toxicity characterization. *Cryptogamie, Algologie*, *36*(1), 101-119. <https://doi.org/10.7872/crya.v36.iss1.2015.101>
- Chinain, M., Gatti, C.M., Roué, M., y Darius, T. (2020). Ciguatera-causing dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*: distribution, ecophysiology and toxicology. En D.V. Subba Rao (Ed.), *Dinoflagellates: classification, evolution, physiology and ecological significance* (pp. 405-457). Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.M., y Lemée, R. (2011). Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, *62*(12), 2681-2691. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.022>

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., y Orive, E. (2019). *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *European Journal of Phycology*, 55(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1651400>
- El-Katony, T. M., Deyab, M.A., El-Adl, M.F., y Ward, F.M.E.N. (2020). The aqueous extract and powder of the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) differentially alleviate the impact of abiotic stress on rice (*Oryza sativa* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(6), 1155-1171. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00805-2>
- Faust, M.A. (1995). Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology*, 31, 996-1003. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00996.x>
- Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., y Zapata, M. (2008). *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of Phycology*, 44, 1060-1070. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00555.x>
- Gémin, M.P., Réveillon, D., Hervé, F., Pavaux, A.S., Tharaud, M., Séchet, V.,...Amzil, Z. (2020). Toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae*, 92(101727). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>
- Gómez, F., Qiu, D., Otero-Morales, E., Lopes, R.M., y Lin, S. (2016). Circumtropical distribution of the epiphytic dinoflagellate *Coolia malayensis* (Dinophyceae): morphology and molecular phylogeny from Puerto Rico and Brazil. *Phycological Research*, 64, 194-199. <https://doi.org/10.1111/pre.12134>
- González-Giro, Z., Fuentes-Reyes, M., Batista-Corbal, P., Campos-Castro A., y Vera-Pérez, Y. (2015). Análisis fitoquímico preliminar de dos extractos del alga *Padina gymnospora*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 17(2), 26-29. <https://doi.org/10.18633/BT.V17I2.176>
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B.A., Bosi, C., y Arnoux, A. (1994). Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (SW Indian Ocean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187, 51-66. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90224-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90224-0)
- Guillard, R.R.L. (1973). Methods for microflagellates and nannoplankton. En J.R. Stein. (Ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements* (pp. 69-85). Cambridge, UK: Cambridge, University Press.
- Guiry, M.D., y Guiry, G.M. (2022). *AlgaeBase*. National University of Ireland, Galway, Republic of Ireland. Recuperado de <http://www.algaebase.org>
- Hernández-Castro, J.E. (2017). *Dinoflagelados y toxinas lipofílicas en bancos naturales de bivalvos al sur de la Bahía de La Paz, B.C.S., México* (Tesis de maestría). CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México.
- Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., y Horiguchi, T. (2014). *Marine benthic dinoflagellates unveiling their worldwide biodiversity*. Stuttgart, Germany: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermüller).
- Hosoi-Tanabe, S., Otake, I., y Sako, Y. (2006). Análisis filogenético de flagelados nocivos de la marea roja *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata* y *C. verruculosa* (Raphidophyceae) basado en la familia de genes rRNA. *Fisheries Science*, 72(6), 1200-1208. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01277.x>
- Jeong, H.J., Yih, W., Kang, N.S., Lee, S.Y., Yoon, E.Y., Yoo, Y.D.,...Kim, J.H. (2012). First report of the epiphytic benthic dinoflagellates *Coolia canariensis* and *Coolia malayensis* in the waters off Jeju Island, Korea: morphology and rADN sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 114-133. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00610.x>
- Karafas, S., York, R., y Tomas, C. (2015). Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 46, 18-33. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.002>
- Larsson M.E., Smith, K.F., y Doblin, M.A. (2019). First description of the environmental niche of the epibenthic dinoflagellate species *Coolia palmyrensis*, *C. malayensis*, and *C. tropicalis* (Dinophyceae) from eastern Australia. *Journal of Phycology*, 55, 565-577. <https://doi.org/10.1111/jpy.12833>
- Laza-Martínez, A., Orive, E., y Miguel, I. (2011). Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology*, 46(1), 45-65. <https://doi.org/10.1080/09670262.2010.550387>

- Leaw, C.P., Po-Teen, L., Kok, Wah, C., Boon-Koon, N., y Gires, U. (2010). Morphology and molecular characterization of a new species of thecate benthic dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, *46*, 162-171. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00778.x>
- Leaw, C.P., Tan, T.H., Lim, H.C., Teng, S.T., Yong, H.L., Smith, K.F.,...Lim, P.T. (2016). New scenario for speciation in the benthic dinoflagellate genus *Coolia* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, *55*, 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.010>
- Leung, P.T.Y., Yan, M., Yiu, S.K.F., Lam, V.T.T., Ip, J.C.H., Au, M.W.Y.,...Lam, P.K.S. (2017). Molecular phylogeny and toxicity of harmful benthic dinoflagellates *Coolia* (Ostreopsidaceae, Dinophyceae) in a sub-tropical marine ecosystem: the first record from Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, *124*, 878-889. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.017>
- Li, X., Yan, M., Gu, J., Lam, V.T.T., Wai, T.C., Baker, D.M.,...Leung, P.T.Y. (2020). The effect of temperature on physiology, toxicity and toxin content of the benthic dinoflagellate *Coolia malayensis* from a seasonal tropical region. *Water Research*, *185*, 116264. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116264>
- Marchan-Álvarez, J., Valerio-González, L., Troccoli-Ghinaglia, L., y López-Monroy, F. (2017). Dinoflagelados bentónicos asociados con el sedimento arenoso en dos playas de la isla de Margarita, Venezuela. *Revista Biodiversidad Neotropical*, *7*(3), 156-168. <https://doi.org/10.18636/bioneotropical.v7i3.539>
- Mateo-Cid, L.E., Mendoza-González, A.C., Huerta-Múzquiz, L., Aguilar-Rosas, R., y Aguilar-Rosas, L.E. (2000). La familia Dictyotaceae (Dictyotales, Phaeophyta) en la península de Baja California, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, *46*(2), 189-270.
- Mohammad-Noor, N., Adam, A., Saad, S., Akmal-Khodzori, F., y Muhd-Shaleh, S.R. (2019). Effects of medium and substrate preferences soil extract on growth of *Coolia* (Dinophyceae). *Journal of System Management*, *14*(2), 71-81.
- Mohammad-Noor, N., Moestrup, O., Lundholm, N., Fraga, S., Adam, A., Holmes, M.J., y Saleh, E. (2013). Autecology and phylogeny of *Coolia tropicalis* and *Coolia malayensis* (Dinophyceae), with emphasis on taxonomy of *C. tropicalis* based on light microscopy, scanning electron microscopy and LSU rADN. *Journal of Phycology*, *49*, 536-545. <https://doi.org/10.1111/jpy.12062>
- Momigliano, P., Sparrow, L., Blair, D., y Heimann, K. (2013). The diversity of *Coolia* spp. (Dinophyceae Ostreopsidaceae) in the central Great Barrier Reef Region. *PLoS ONE*, *8*(10), e79278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079278>
- Nascimento, S.M., da Silva, R.A.F., Oliveira, F., Fraga, S., y Salgueiro, F. (2019). Morphology and molecular phylogeny of *Coolia tropicalis*, *Coolia malayensis* and a new lineage of the *Coolia canariensis* species complex (Dinophyceae) isolated from Brazil. *European Journal of Phycology*, *54*, 1-13. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1599449>
- Penna, A., Battocchi, C., Capellacci, S., Fraga, S., Aligizaki, K., Lemée, R., y Vernesi, C. (2014). Mitochondrial, but not rADN, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *Ostreopsis*. *Harmful Algae*, *40*, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.004>
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobo, P., y Vernesi, C. (2005). Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rADN sequences. *Journal of Phycology*, *41*(1), 212-225. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04011.x>
- Rahman-Shah, M., Samarakoon, K.W., Ko, J., Chaminda-Lakmal, H.H., Lee, J., An, S.,...J. Lee. (2014). Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African Journal of Biotechnology*, *13*(6), 792-805. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13250>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S.,...Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ruh, W.W., Ahmad, A., Mat Isa, M.N., Mahadi, N.M., Marasan, N.A., y Usup, G. (2009). Diversity of bacteria associated with the benthic marine dinoflagellates *Coolia monotis* and *Ostreopsis ovata* from Malaysian waters. *Journal of Science and Technology in the Tropics*, *5*, 23-33.
- Salvador, N., Gómez Garreta, A., Lavelli, L., y Ribera, M.A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, *71*(1), 101-113. <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n1101>

- Sepúlveda-Villarraga, M. (2017). *Dinoflagelados potencialmente tóxicos asociados a macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S.* (Tesis de maestría). CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. Recuperado de [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Tarazona-Janampa, U.I., Cembella, A.D., Pelayo-Zárate, M.C., Pajares, S., Márquez-Valdelamar, L.M., Okolodkov, Y.B.,...Durán-Riveroll, L.M. (2020). Associated bacteria and their effects on growth and toxigenicity of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* species complex from epibenthic substrates along Mexican coasts. *Frontiers in Marine Science*, 7(569), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00569>
- Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., y Couté, A. (2000). *Coolia areolata* sp. nov. (Dinophyceae), a new sand-dwelling dinoflagellate from the southwestern Indian Ocean. *Phycology*, 39, 377-383. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-5-377.1>
- Ternon, E., Paix, B., Thomas, O.P., Briand, J.F., y Culioli, G. (2020). Exploring the role of macroalgal surface metabolites on the settlement of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Frontiers in Marine Science*, 7(683), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00683>
- Thronsen, J. (1979). Special methods-micromanipulators. En R.J. Stein. (Ed.), *Handbook of phyiological methods: culture methods and growth measurements* (pp. 139-144). London, UK: Cambridge University Press.
- Tibiriçá, C.E.J.A., Sibat, M., Fernandes, L. F., Bilién, G., Chomérat, N., Hess, P., y Mafra Jr., L.L. (2020). Diversity and toxicity of the genus *Coolia* Meunier in Brazil, and detection of 44-methyl gambierone in *Coolia tropicalis*. *Toxins*, 12(5), 327. <https://doi.org/10.3390/toxins12050327>
- Tindall, D.R., y Morton, S.L. (1998). Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. En D.M. Anderson, A.D. Cembella y G. Hallegraeff (Eds.). *Physiological ecology of harmful blooms* (pp. 293-314). Heidelberg, Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Tomas, C.R. (1997). *Identifying marine phytoplankton*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Villegas-Silva, V.A. (2014). *Evaluación del potencial de Sargassum lapazeanum Setchell y N.L. Gardner (Ochrophyta: Fucales, Phaeophyceae) como fuente de compuestos antibacterianos, antioxidantes y anticoagulantes* (Tesis de licenciatura). UABCS, La Paz, Baja California Sur, México.
- Wakeman, K.C., Yamaguchi, A., Roy, M.C., y Jenke-Kodama, H. (2015). Morphology, phylogeny and novel chemical compounds from *Coolia malayensis* (Dinophyceae) from Okinawa, Japan. *Harmful Algae*, 44, 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.02.009>

## ANEXO I

Caracteres morfológicos de *Coolia malayensis* de distintas zonas geográficas. SD = sin dato.

<i>Coolia malayensis</i>	Tamaño celular		Poros apicales (largo)	Placa 1'	Placa 3'	Placa más amplia de la epiteca
	Largo	Ancho				
Bahía de La Paz, México (cepa CMBAPAZ-1)	25.38 ± 1.78 $\mu\text{m}$	24.21 ± 1.40 $\mu\text{m}$	6.33 ± 0.36 $\mu\text{m}$	oblonga, larga y hexagonal	forma de cuña y pentagonal	6''
Bahía de La Paz, México (cepa s/i 72)	26.48 ± 2.08 $\mu\text{m}$	23.76 ± 1.69 $\mu\text{m}$	5.49 ± 0.26 $\mu\text{m}$	oblonga, larga y hexagonal	pentagonal	6''
Aislados de Malasia	28–33 $\mu\text{m}$	27–32 $\mu\text{m}$	ca. 5 $\mu\text{m}$	estrecha y oblonga	cuadrangular	6''
Aislados de República Dominicana, Santa Cruz, Islas Vírgenes y Carolina del Norte	24.5 ± 2.7 $\mu\text{m}$	25.7 ± 2.4 $\mu\text{m}$	5.89 ± 0.5 $\mu\text{m}$	estrecha, oblonga y hexagonal	pentagonal o hexagonal, en forma de cuña	6''
Bahía de La Paz, México	23.4–31 $\mu\text{m}$	25–28 $\mu\text{m}$	5.6 $\mu\text{m}$	estrecha alargada	y SD	6''
Cepas de Brasil y Puerto Rico	22–33 $\mu\text{m}$	19–33 $\mu\text{m}$	6–9 $\mu\text{m}$	oblonga hexagonal	y pentagonal	6''
Cepas de Brasil	16.6–25.3 $\mu\text{m}$	19.6–29.3 $\mu\text{m}$	6.3 ± 0.5 $\mu\text{m}$	oblonga hexagonal	y SD	6''

<i>Coolia malayensis</i>	Relación de largo y ancho de la placa 7''	Referencia
Bahía de La Paz, México (cepa CMBAPAZ-1)	ca. 1.05	Este estudio
Bahía de La Paz, México (cepa s/i 72)	SD	Este estudio
Aislados de Malasia	1.2–1.5	Leaw <i>et al.</i> (2010)
Aislados de República Dominicana, Santa Cruz, Islas Vírgenes y Carolina del Norte	1.5 ± 0.1	Karafas <i>et al.</i> (2015)
Bahía de La Paz, México	SD	Sepúlveda-Villarraga (2017) Hernández-Castro (2017)
Cepas de Brasil y Puerto Rico	SD	Gómez <i>et al.</i> (2016)
Cepas de Brasil	SD	Tibiriçá <i>et al.</i> (2020)

## ANEXO II

Secuencias de los dinoflagelados bentónicos empleadas en el árbol filogenético de la región 28S del ADNr.

Especie	GenBank ID	Aislado	Localidad	Referencia
<i>Coolia malayensis</i>	KJ933432.1	clon 1	Teniya, Okinawa, Japón	Wakeman <i>et al.</i> (2015)
<i>C. malayensis</i>	KJ422859.1	NLD12b	Bay of Islands, Nueva Zelanda	Rhodes <i>et al.</i> (2014)
<i>C. malayensis</i>	JX896690.1	K-0972	Malasia	Mohammad-Noor <i>et al.</i> (2013)
<i>C. malayensis</i>	AF244942.1	CmPL01	Kota Kinabalu, Sabah, Malasia, mar del Sur de China	Leaw <i>et al.</i> (2010)
<i>C. malayensis</i>	KJ933434.1	clon 3	Okinawa, Japón	Wakeman <i>et al.</i> (2015)
<i>C. malayensis</i>	HQ897274.1	NQAIF35	Gran Barrera de Coral, Australia	Momigliano <i>et al.</i> (2013)
<i>C. malayensis</i>	HQ897275.1	NQAIF60	Islas Fiji	Momigliano <i>et al.</i> (2013)
<i>C. malayensis</i>	KJ422858.1	NLD12	Rawhiti Point, Bay of Islands, Nueva Zelanda	Rhodes <i>et al.</i> (2014)
<i>C. monotis</i>	HQ414219.1	Dn23EHU	Vizcaya, España	Laza-Martínez <i>et al.</i> (2011)
<i>C. monotis</i>	EU477760.1	UoA-Cmon1	Grecia	Dolapsakis <i>et al.</i> (2006)
<i>C. monotis</i>	AM902746.1	VGO782	Golfo Sarónico, Grecia	Fraga <i>et al.</i> (2008)
<i>C. monotis</i>	AM902748.1	SZN268	Golfo de Nápoles, Italia	Fraga <i>et al.</i> (2008)
<i>C. tropicalis</i>	JX896691.1	K-1156	Mar de Sulu, isla Banggi, Malasia	Mohammad-Noor <i>et al.</i> (2013)
<i>C. tropicalis</i>	KX589144.1	SKLMP_S002	Tsim Chau, Hong Kong	Leung <i>et al.</i> (2017)
<i>C. canariensis</i>	FR846193.1	CMJJ1	Isla Jeju, Corea	Jeong <i>et al.</i> (2012)
<i>C. canariensis</i>	HQ897278.1	NQAIF252	Gran Barrera de Coral, Australia	Momigliano <i>et al.</i> (2013)
<i>C. palmyrensis</i>	KP172270.1	Cp1208-1	Atolón Palmyra, E.U.A.	Karafas <i>et al.</i> (2015)
<i>C. palmyrensis</i>	KR093175.1	Cp1412-1	República Dominicana	Karafas <i>et al.</i> (2015)
<i>C. santacroce</i>	KP172271.1	Cs1303-1	Santa Cruz, Islas Vírgenes, E.U.A.	Karafas <i>et al.</i> (2015)
<i>C. santacroce</i>	KT288059.1	Cos1503GA	Islas Vírgenes, E.U.A.	Karafas <i>et al.</i> (2015)
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	JX065570.1	NT013	Vietnam, mar del Sur de China, Ninh Thuan	Penna <i>et al.</i> (2014)
<i>O. lenticularis</i>	AF244941.1	OIPR01	Malasia	Leaw <i>et al.</i> (2001)

Copyright (c) 2022 Ana Emilia Ramos Santiago, Christine Johanna Band Schmidt, Ignacio Leyva-Valencia, Mauricio Muñoz-Ochoa, Yury B. Okolodkov, Ivonne Sandra Santiago-Morales.



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato- y Adaptar el documento- remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)