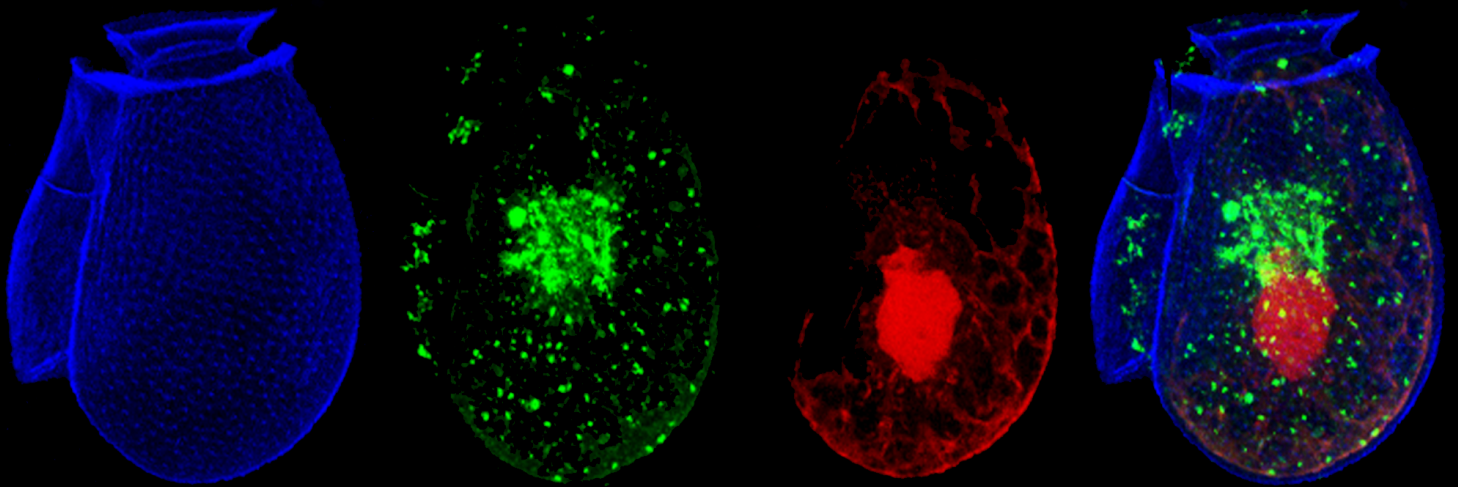


Aproximaciones moleculares a la
identificación de especies del género
Dinophysis y al análisis de las
interrelaciones tróficas de
D. acuta con sus presas.



Tesis Doctoral



TESIS DOCTORAL

APROXIMACIONES MOLECULARES A LA
IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GÉNERO
DINOPHYSIS Y AL ANÁLISIS DE LAS
INTERRELACIONES TRÓFICAS DE *D. ACUTA* CON SUS
PRESAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Nicolás Raho

Madrid, 2013



AO	Ácido okadaico
ASP	Intoxicación Amnésica por Marisco (Amnesic Shellfish Poisoning)
BTX	Brevetoxina
cob	Citocromo b mitocondrial
Cona	Lectina Concanavalina A (<i>Canavalia ensiformis</i>)
cox1	Citocromo oxidasa 1 mitocondrial
DA	Ácido domoico
DBA	Lectina <i>Dolichos biflorus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSP	Intoxicación Diarreica por Marisco (Diarrhetic Shellfish Poisoning)
DTX	Dinofisistoxinas
FAN	Floración de algas nocivas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HAB	Harmful algal Bloom. FAN
ITS	Región del rRNA comprendida entre el ITS1 e ITS2
NSP	Intoxicación Neurotóxica por Marisco (Neurotoxic Shellfish Poisoning)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa
psbA	Gen codificante para la proteína D1 del fotosistema II de plástidos
PSP	Intoxicación Paralizante por Marisco (Paralytic Shellfish Poisoning)
PTX	Pectenotoxinas
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
STX	Saxitoxina
UEA	Lectina <i>Ulex europaeus</i>
WGA	Lectina <i>Triticum vulgare</i>



Several dinoflagellate species of the genus *Dinophysis* Ehrenberg produce potent lipophilic shellfish toxins (okadaic acid, its derivatives and the pectenotoxins) and pose a major threat to shellfish aquaculture in the world, leading to large economic losses

Dinophysis species have a complicated life cycle, with several intermediate forms, with different toxic potentials, that can be confuse to identify. The identification of *Dinophysis* species is carried out by specialized personnel and is a crucial task in harmful algae monitoring programmes intended to prevent Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) syndrome.

Toxicity varies among morphologically similar species, and a precise identification is needed for early warning systems. Molecular techniques using DNA sequences offer a means to identify and detect precisely the potentially toxic species.

In this study, the potential of the rRNA operon and two mitochondrial genes (mt *cox1* and *cob*) was explored to discriminate among *Dinophysis* species associated with DSP events (field isolates and cultures) from Galicia waters, one of the bigger mussels producer in the world.

The obtained results revealed that the taxonomic assignment of *Dinophysis* species using rRNA molecular markers is a difficult task due to extremely low interspecific variability of the nuclear ribosomal genes and intergenic regions. Mitochondrial *cox1* gene has been proposed as a better specific marker for *Dinophysis* species based on its higher resolution.

Also, the carbohydrate composition of the cell surface was evaluated with FITC-conjugated lectins in several *Dinophysis* species from two geographical locations, Vigo and Huelva, as an alternative to molecular identification. The obtained result shows that this technic have the potential to discriminate between species, and provide a new tool to complement standard microscopic identification.

The toxic marine dinoflagellate species of the genus *Dinophysis* are obligate mixotrophs that require feeding on the ciliate *Mesodinium rubrum* and light to achieve growth. It is now well known that they harbor plastids of cryptophyte origin, particularly of the genus *Teleaulax*, *Plagioselmis* or *Geminigera* group (TPG clade). Nevertheless, whether these plastids are permanent, or periodically acquired from *M. rubrum* prey, is still controversial. The origin of plastids from *Dinophysis acuta* Ehrenberg, one of the main agents of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreaks in Western Europe, was investigated here. Cross feeding-starvation experiments were carried out with cultures of *D. acuta* using *M. rubrum* as prey, the latter fed with two cryptophyte species, *Teleaulax amphioxeia* Hill and *Teleaulax gracilis*, belonging to the TPG clade in addition to *Falcomonas* sp. and *Hemiselmis* sp. The fate of cryptophyte plastids transferred to *D. acuta* through its ciliate prey was investigated using the plastid *psbA* gene as a tracer.



Abreviaturas	i
Abstract	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fitoplancton	1
1.2. Floraciones de Algas Nocivas (FAN)	1
1.2.1. FAN Nocivas	2
1.2.2. FAN Tóxicas	3
1.3. Síndromes de intoxicación y toxinas asociadas	3
1.3.1. Intoxicación Paralizante por Marisco (Paralytic Shellfish Poisoning , PSP)	4
1.3.2. Intoxicación Diarreica por Marisco (Diarrhetic Shellfish Poisoning DSP)	5
1.3.3. Intoxicación Amnésica por Marisco (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)	5
1.3.4. Intoxicación Neurotóxica por Marisco (Neurotoxic Shellfish Poisoning , NSP)	5
1.4. Dinoflagelados	6
1.5. Ecología de las FAN: Factores involucrados en la proliferación de los dinoflagelados	7
1.5.1. Factores físico-químicos y nutricionales	7
1.5.2. Factores biológicos	8
1.5.2.1. Bacterias	8
1.5.2.2. Virus	10
1.5.2.3. Predadores	10
1.5.2.4. Parásitos	10
1.6. <i>Dinophysis</i> (Dinophysiales, Dinophysiaceae)	11
1.6.1. Toxicidad de <i>Dinophysis</i>	11
1.6.2. Morfología del género <i>Dinophysis</i> y problemas de caracterización	14
1.6.3. El rRNA como marcador molecular en <i>Dinophysis</i> spp.	15
1.6.4. Genes mitocondriales como marcadores moleculares	17
1.7. Lectinas	18



1.7.1. Técnicas alternativas para la identificación de <i>Dinophysis</i> spp.	18
1.7.2. Reconocimiento entre presa y predador	19
1.8. El problema de los plástidos de <i>Dinophysis</i>	20
1.8.1. Mixotrofia	20
1.8.2. Origen de los plástidos	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Reactivos	25
3.2. Microorganismos utilizados	26
3.2.1. Microalgas	27
3.2.2. Bacterias	28
3.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	28
3.3.1. Microalgas	28
3.3.2. Bacterias	29
3.3.3. Micromanipulación de las microalgas	29
3.4. Métodos de Biología Molecular	30
3.4.1. Extracción de DNA de células de microalgas aisladas para amplificación por PCR	30
3.4.2. Amplificación de regiones específicas del DNA mediante PCR	30
3.4.3. Clonación de los productos de PCR	31
3.4.4. Purificación y secuenciación de DNA	32
3.4.5. Análisis de las secuencias	33
3.4.5.1. Ensamblaje y alineamiento	33
3.4.5.2. Análisis filogenéticos	33
3.5. Estudio del origen de los cloroplastos en <i>Dinophysis acuta</i>	34
3.5.1. Adscripción filogenética de las criptofitas	34
3.5.2. Establecimiento de cultivos de <i>Mesodinium rubrum</i>	34
3.5.3. Establecimiento de cultivos de <i>Dinophysis acuta</i>	35
3.5.4. Seguimiento del origen de los plástidos por amplificación del gen <i>psbA</i>	36



3.6. Determinación de la composición de carbohidratos en la superficie de *Dinophysis* spp. **36**

- 3.6.1. Microalgas utilizadas 36
- 3.6.2. Marcaje de las células con lectinas conjugadas a FITC 37
- 3.6.3. Ensayo de la especificidad de la unión lectina-FITC 38
- 3.6.4. Microscopía Láser Confocal (CLSM; Confocal Laser Scanning Microscopy) 38
- 3.6.5. Posibles factores de reconocimiento en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica. 39

4. RESULTADOS 41

4.1. Búsqueda de marcadores moleculares específicos para *Dinophysis* spp. **41**

- 4.1.1. Análisis del gen 28S rRNA 43
- 4.1.2. Análisis del gen 18S rRNA 44
- 4.1.3. Análisis de las regiones del rRNA ITS1-5,8S rRNA-ITS2 46
- 4.1.4. Análisis de la funcionalidad de los genes mitocondriales *cox1* y *cob* como posibles marcadores moleculares en *Dinophysis* spp. 48
 - 4.1.4.1. *cox1* 48
 - 4.1.4.2. *cob* 50
- 4.1.5. Desarrollo de posibles sondas 51

4.2. Estudio del origen de los cloroplastos en *Dinophysis acuta* **52**

- 4.2.1. Análisis filogenético de las criptofitas 53
- 4.2.2. Seguimiento de los plástidos a través del gen *psbA* 54

4.3. Determinación de carbohidratos de superficie en *Dinophysis* spp. **58**

- 4.3.1. Evaluación de la especificidad de la unión de las lectinas conjugadas con FITC 58
- 4.3.2. Evaluación de la composición de carbohidratos de diferentes especies de *Dinophysis* de Huelva y Vigo mediante lectinas conjugadas con FITC en células vegetativas y pequeñas 59
 - 4.3.2.1. Células vegetativas 59
 - 4.3.2.2. Células pequeñas 62

4.4. Posible función de los carbohidratos como determinantes superficiales **64**



implicados en el reconocimiento entre presa-predador en la cadena trófica

5. DISCUSIÓN	67
5.1. Marcadores Moleculares	67
5.1.1. RNA ribosómico	67
5.1.2. Genes mitocondriales <i>cox1</i> y <i>cob</i>	69
5.1.3. Relación de <i>Phalacroma rotundatum</i> con respecto al género	72
5.2. Estudio del origen de los plástidos en <i>Dinophysis acuta</i>	72
5.3. Estudios <i>in vitro</i> de las interacciones entre los organismos involucrados en la cadena trófica de <i>Dinophysis acuta</i>	77
5.4. Estudio de posibles factores de reconocimiento en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica	79
6. CONCLUSIONES	81
7. BIBLIOGRAFÍA	83
8. MATERIAL COMPLEMENTARIO	105



1.1 Fitoplancton

El plancton está constituido por organismos microscópicos que habitan en los océanos y en los cuerpos de agua dulce. Incluye una amplia agrupación de organismos, como diatomeas, dinoflagelados, krill, copépodos y larvas microscópicas de crustáceos, erizos, estrellas de mar y la de muchos de los peces. Basados en su función trófica, el plancton se clasifica en los siguientes grupos (Garrison, 2009):

- Zooplancton: son los consumidores del mundo planctónico. Como tales, se alimentan de otro plancton para obtener la energía y los nutrientes que necesitan para sobrevivir.
- Bacterioplancton: son considerados los recicladores del mundo planctónico. Son bacterias y arqueas de vida libre que desempeñan un papel fundamental en el desglose y reciclado de materiales.
- Fitoplancton: son los productores primarios del mundo planctónico. Son organismos fotosintéticos e incluyen, entre otros, a los dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias.

El fitoplancton (de los términos griegos *phyton* de la planta y *planctos* vagabundo) es el componente fotótrofo del plancton. Comprende más de 25.000 especies y es responsable del 45% de la producción primaria neta anual en todo el planeta (Falkowski y col., 2004; Escalera y Reguera, 2008). La mayoría de las especies que lo componen son organismos unicelulares microscópicos con un tamaño que oscila entre 0,4 y 200 micras (Simon y col., 2009), siendo los representantes más importantes las diatomeas y los dinoflagelados. Debido a que necesitan luz para efectuar la fotosíntesis, el fitoplancton vive en zonas cercanas a la superficie, donde la luz solar puede penetrar lo suficiente. El espesor de esta capa de los océanos, la zona eufótica, varía dependiendo de la claridad del agua, pero suele estar limitada en los 200 metros desde la superficie (Falkowski y col., 2004).

Estos productores primarios constituyen el principal eslabón alimenticio en todos los mares y océanos del mundo, donde son consumidos tanto por el zooplancton como por organismos tales como bivalvos (mejillones, almejas, ostras, etc), crustáceos, peces o mamíferos marinos.

Además tienen el potencial de servir como indicadores de cambios hidroclimáticos como consecuencia del calentamiento global, así como de otros impactos ambientales, tales como la acidificación de los océanos debido al uso de combustibles fósiles y la eutrofización (Paerl y col., 2007).

1.2 Floraciones de Algas Nocivas (FAN)

Bajo ciertas condiciones ambientales, el fitoplancton puede experimentar altas tasas de crecimiento alcanzando elevadas densidades celulares, lo que se conoce como floración de algas. Éstas se presentan como eventos naturales, como por ejemplo la floración de diatomeas en primavera que, en latitudes templadas, sufren una explosión de crecimiento como una respuesta a la creciente



disponibilidad de luz, temperatura y estabilización de columna de agua (Hallegraeff, 2004; Mann y Lazier, 2006).

En ocasiones, la proliferación de estas microalgas, puede resultar en un beneficio, ya sea para la acuicultura o para la alimentación de los organismos naturales. Sin embargo, también puede tener un impacto negativo si las especies son productoras de toxinas, lo que se conoce con el término *Floraciones de Algas Nocivas* (FAN; en inglés *Harmful Algal Blooms*, HAB) o, comúnmente conocidas como *mareas rojas*. El término FAN fue acuñado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO en la década de los 90 para denominar cualquier proliferación de microorganismos que son percibidos como dañinos por el hombre por sus efectos adversos sobre la salud humana, la acuicultura, el turismo de las zonas costeras y la ecología en las poblaciones naturales de los organismos marinos (<http://hab.ioc-unesco.org>).



Figura 1. Marea roja ocasionada por la proliferación de microorganismos planctónicos pigmentados. Tomada del Instituto de Ciencia del Mar, Sidney. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/>

Las FAN se caracterizan por el crecimiento de microorganismos planctónicos como microalgas, bacterias y ciliados que, al alcanzar concentraciones elevadas del orden de 10^6 cel/ml, pueden producir la coloración del agua del mar (Figura. 1). Si bien en un principio este término se inspiró en las manchas producidas por la proliferación de dinoflagelados planctónicos, hoy en día se aplica a cualquier floración de microalgas aun cuando no alcancen elevadas densidades, siempre que su aparición conlleve un efecto nocivo. No se trata, por tanto, de un término científico, sino de un término operativo ampliamente aceptado por la comunidad científica, así como por los gestores sanitarios y medioambientales (Marin y Reguera, 2011).

En función de los microorganismos que constituyan las FAN se las puede clasificar como:

1.2.1. FAN Nocivas

Formadas por microalgas no tóxicas que, sin embargo pueden provocar serios problemas en la acuicultura, en organismos del bentos o incluso en la estética de las playas, repercutiendo en la economía de las regiones afectadas. Debido a que suelen alcanzar grandes densidades, provocan cambios físico-químicos en el medio, tales como cambios bruscos en el pH, problemas en la disponibilidad de oxígeno disuelto o en los niveles de nutrientes, como es el caso del dinoflagelado *Heterocapsa circularisquama* en Japón, causante de mortandad de peces (Horiguchi, 1995). También puede ocurrir que las microalgas, como *Gymnodinium impudicum* o *Gymnodinium dorsalisulcum* (Murray y col., 2007) segreguen sustancias



mucilaginosas que afectan al sistema filtrador de los peces o bien en otros casos por poseer estructuras punzantes que causan graves daños físicos en las branquias de los peces, pudiendo llegar a causarles la muerte, como es el caso de especies del género *Chaetoceros* (Ferrario y col., 2004).

1.2.2. FAN Tóxicas

Compuestas por organismos productores de potentes toxinas, como pueden ser los dinoflagelados y las diatomeas. Estas toxinas son compuestos bioactivos de distinta naturaleza química que pueden presentar efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos. Estos eventos se definen como aquellos en los que la presencia de microalgas, aún en concentraciones moderadas (no causantes de coloración del agua del mar), confieren niveles de toxicidad en moluscos tales que pueden llegar a constituir un peligro para la salud humana, obligando a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización (Garcés y col., 2002; Reguera, 2002a; Glibert y col., 2005a; Toyofuku, 2006).

La acuicultura ha experimentado un rápido crecimiento en las últimas décadas a nivel mundial, llegando a aportar en el año 2009 la mitad del consumo mundial de pescado y marisco (Naylor y col., 2009). En marzo de 2013, el Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*) publicó las estadísticas de producción acuícola global del el año 2011 (www.fao.org/fishery/topic/16140/en). Según estos datos recientemente publicados, la producción acuícola mundial de pescado para consumo alcanzó 62,7 millones de toneladas en 2011, un aumento del 6,2 % respecto al año 2010 (59 millones de toneladas), con un valor estimado de pescado de piscifactoría de 130 billones de dólares.

Dada la importancia de esta industria, muchas regiones del mundo realizan programas para el seguimiento de fitoplancton con el fin de proteger esta industria. Por ejemplo, los estados miembros de la Unión Europea (UE) se hallan legalmente obligados a vigilar sus zonas de producción de moluscos para detectar la presencia de fitoplancton productor de toxinas. Así, se han implementado una serie de directivas, como la Directiva Marco del Agua (www.directivamarco.es), que considera necesaria la supervisión del fitoplancton para controlar el estado de la calidad de los ambientes marinos y de agua dulce.

1.3 Síndromes de intoxicación y toxinas asociadas

Los tipos más frecuentes de intoxicaciones o envenenamientos tanto por su distribución, frecuencia y gravedad, son la Intoxicación Paralizante por Marisco o PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), la Intoxicación Diarreica por Marisco o DSP (*Diarrheic Shellfish Poisoning*), la Intoxicación Amnésica por Marisco o ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*) y la Intoxicación Neurológica por Marisco o NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*) (Wang, 2008). También cabe destacar otras toxinas como la ciguatoxina o CFP (*Ciguatera Fish Poisoning*), yesotoxina y azaspirácidos o AZP (*Azaspiracid Poisoning*), que, si bien son menos frecuentes, no son menos dañinas (Tabla 1).



Tabla 1. Características de intoxicaciones producidas principalmente por consumo de moluscos bivalvos contaminados (Reguera, 1991).

Síndrome	Toxina	Géneros fuente de toxina	Ruta de adquisición	Sintomatología
PSP	Saxitoxina y derivados (Neotoxina, Gonyatoxina)	<i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium</i> , <i>Pyrodinium</i>	Ingestión de mariscos contaminados	Parestesia perioral y otras manifestaciones neurológicas, pudiendo progresar rápidamente a manos y pies, parálisis, sensación de ingravidez, problemas respiratorios, parálisis muscular y muerte.
DSP	Ácido Okadaico y Dinofisitoxinas	<i>Dinopyxis</i> , <i>Prorocentrum</i>		Alteraciones digestivas que cursan con vómitos, diarreas, dolor abdominal. Promotoras de tumores. No se ha registrado ningún caso mortal.
NSP	Brevetoxinas B y C	<i>Karenia breve</i> , <i>Gymnodinium breve</i> , <i>Ptychodiscus brevis</i>		Alteraciones de tipo neurológico leve, gastroenteritis, irritación de ojos y mucosas debida a los aerosoles.
ASP	Ácido Domoico e isómeros	<i>Nitzschia</i> , <i>Pseudonitzschia</i>	Ingestión de mariscos e incluso peces contaminados	Gastroenteritis y pérdida de memoria. Puede provocar la muerte
AZP	Azaspirácidos	<i>Protoperidinium crassipes</i>	Ingestión de mariscos contaminados	Efectos neurológicos con daños severos en intestinos, hígado y bazo.
CFP	Ciguatoxinas	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Transmisión de la toxina a través de la cadena trófica. Ingestión de peces contaminados	Gastroenteritis, parestesias y otros síntomas neurológicos.

1.3.1. Intoxicación Paralizante por Marisco (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP)

Este síndrome de distribución mundial (Lawrence y col., 2011) está asociado al consumo de moluscos bivalvos filtradores como mejillones (*Mytilus* sp.), almejas (*Tapes* sp.), berberechos (*Cardium* sp.), vieiras (*Pecten* sp.) y ostras (*Ostrea* sp.) contaminados con saxitoxina (STX) y/o sus derivados (Lawrence y col., 2011), un grupo de más de 26 potentes neurotoxinas hidrosolubles y termorresistentes (Fernández y col., 2002; Kellmann y Neilan, 2007) que provocan síntomas neurológicos y gastrointestinales. Estos se presentan como un cosquilleo de los labios, boca y lengua, entumecimiento de las extremidades, problemas gastrointestinales, dificultad para respirar y una sensación de ingravidez seguida de parálisis completa y en intoxicaciones graves puede provocar la muerte (Lagos y Andrinolo, 2000).

El primer evento PSP fue reportado en 1927 cerca de San Francisco, Estados Unidos y fue causado por el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, produciendo la intoxicación de 102 personas y seis muertes (Sommer y col., 1937). Desde entonces, miembros de tres géneros de dinoflagelados se han reportado como las principales fuentes de toxinas PSP: *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* (Wang, 2008)

En su modo de acción, estas potentes neurotoxinas se unen específicamente y de forma selectiva a los canales de sodio de las células nerviosas impidiendo el paso de iones Na^+ a través de las



membranas celulares e interfiriendo con la transmisión de señales a lo largo de los nervios (Kellmann y Neilan, 2007).

1.3.2. Intoxicación Diarreica por Marisco (Diarrhetic Shellfish Poisoning DSP)

Las intoxicaciones diarreicas (DSP) se producen por ingestión de alimentos de origen marino contaminado con toxinas DSP y se caracterizan por síntomas como náuseas, diarrea, vómitos y dolor abdominal que se inician desde unos 30 minutos hasta algunas pocas horas después de la ingestión de la toxina y persisten en la mayor parte de los casos entre 1 y 3 días (Lawrence y col., 2011).

Hasta la fecha se han identificado más de 10 toxinas DSP, que son compuestos liposolubles y con estructura tipo poliéter, destacando el ácido okadaico (AO), las dinofisitoxinas (DTX) y las pectenotoxinas (PTXs), si bien estas últimas no son tóxicas ingeridas oralmente.

Entre los dinoflagelados productores de toxinas DSP se encuentran diferentes especies de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*, que constituyen los principales agentes de intoxicaciones por consumo de bivalvos en la Península Ibérica y en diversas regiones del mundo.

De este síndrome se hablará más detalladamente en el apartado 1.6.1.

1.3.3. Intoxicación Amnésica por Marisco (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)

El ácido domoico se identificó por primera vez como la toxina responsable del síndrome ASP ocurrido en Canadá en 1987 tras el consumo de mejillones (*Mytilus edulis*) contaminados, como resultado de la presencia de diatomeas *Pseudo-nitzschia pungens* (Wright y col., 1989).

El ácido domoico (DA) es termoestable e hidrosoluble. Debido a que estructuralmente es muy similar al ácido glutámico y al kaínico, actúa como agonista en la propagación de los impulsos nerviosos en mamíferos (Doucette y Tasker, 2008).

Los síntomas que la intoxicación ASP produce incluyen trastornos gastrointestinales, fuertes dolores de cabeza, pérdida de la memoria, pérdida de equilibrio, alteraciones de la visión, desorientación, convulsiones, agitación, coma y muerte (Lawrence y col., 2011). El DA ha causado muerte de aves y parece estar implicado en la muerte de leones marinos y delfines en el sur de California (Madl y col.).

1.3.4. Intoxicación Neurotóxica por Marisco (Neurotoxic Shellfish Poisoning , NSP)

La intoxicación neurotóxica por mariscos (NSP) está causada por el consumo de moluscos bivalvos que han acumulado brevetoxinas (BTXs) provenientes de los dinoflagelados marinos del género *Karenia* (Davis, 1948; Schulman y col., 1990; Watkins y col., 2008), aunque también se ha descrito la presencia de estas neurotoxinas en otros organismos, como *Chatonella marina*, *C. antiqua*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* (Imai, 1989; Cho y col., 1999b; Yan y col., 2004).

La presencia de microalgas productoras de brevetoxinas en el Golfo de México produce mortandad de peces y aves y parece estar implicada en la muerte de manatíes y delfines (Flewelling y col., 2005). Además, las toxinas pueden ser dispersadas en aerosoles producidos con el oleaje, provocando irritación de las vías respiratorias de quienes los inhalan (Fleming y col., 2004).



Las brevetoxinas provocan la apertura de canales de iones de sodio dependientes de voltaje, llevando a una entrada incontrolada en la célula de iones Na^+ . Este mecanismo de acción difiere del de las toxinas PSP, que bloquean los canales de sodio evitando que los iones pasen a través de las membranas celulares. (Kirkpatrick y col., 2004).

Geográficamente este tipo de intoxicaciones se registran y restringen básicamente a la costa este de Estados Unidos, México y Nueva Zelanda, ocasionando graves pérdidas económicas y daños sanitarios (Lawrence y col., 2011).

Debido a la virulencia y a los graves efectos que produce sobre la salud de las personas intoxicadas, la prevención contra las PSP es muy importante. Sin embargo, aunque por lo general menos graves sobre la salud, las intoxicaciones DSP y ASP suelen ser más frecuentes, duraderas y ocurren sobre extensiones más amplias, por lo que constituyen globalmente el principal problema asociado a las intoxicaciones asociadas al consumo de marisco (Lawrence y col., 2011).

1.4 Dinoflagelados

Los dinoflagelados son un grupo de organismos eucarióticos unicelulares pertenecientes a los Protistas (Adl y col., 2005). Su nombre proviene del griego *dinos*, girar y del latín, *flagellum*, látigo, haciendo referencia a su modo de locomoción impulsado por la presencia de dos flagelos.

Pueden encontrarse tanto en aguas saladas como dulces, ser bentónicos o planctónicos, existiendo también especies parásitas o simbióticas.

Pese a la diversidad de hábitats en los que se encuentran y los diferentes modos de vida y nutrición que presentan, todos los dinoflagelados comparten ciertas características:

- Todos son unicelulares, aunque algunos de ellos pueden formar cadenas, como por ejemplo *Alexandrium catenella* y *Gymnodinium catenatum*. Su tamaño celular puede oscilar entre 6 μm , como en algunas especies de *Symbiodinium*, y 2 mm, como en *Noctiluca scintillans*.
- Poseen dos flagelos que proveen de movilidad a las células. Uno está arraigado en el sulco (surco longitudinal) y dirige la célula, mientras el otro está arraigado en el cíngulo (surco transversal) e impulsa la célula (Taylor, 1987b).
- Según la naturaleza de la cobertura celular los dinoflagelados se pueden clasificar como *tecadados* y *atecadados*. En las formas *tecadados*, debajo de la membrana celular se encuentran unas vesículas aplanadas (anfiesma) que contienen placas de celulosa que están unidas en bandas intercaladas, mientras que las formas *atecadados* o desnudas carecen de ellas. La numeración de dichas placas es de gran importancia taxonómica en la clasificación de los dinoflagelados, utilizándose habitualmente el sistema de nomenclatura propuesto por Kofoid (Dodge, 1982).
- Todos poseen un único núcleo dinocariótico, en donde el DNA se encuentra en un estado líquido-cristalino (Bouligand y Norris, 2001) y los cromosomas se condensan de forma



permanente (Spector, 1984; Adl y col., 2005), mostrando una apariencia de "bandas" al observarse con microscopio electrónico.

- Son generalmente haploides y se reproducen sobre todo por fisión binaria, aunque la reproducción sexual también ocurre. Ésta tiene lugar cuando dos individuos se fusionan para formar un planozigoto, puede seguir siendo móvil o formar un quiste inmóvil, que más adelante experimentará una meiosis para producir nuevas células haploides (Mcquoid y col., 2002).
- Los dinoflagelados, a pesar de su tamaño, tienen los genomas más grandes conocidos entre todos los organismos vivos, con un contenido de DNA que oscila entre 1,5 y 200 pg por célula haploide (LaJeunesse y col., 2005). Este genoma de gran tamaño debe ser eficientemente empaquetado dentro del núcleo celular. Durante muchos años, se pensó que esta condensación cromosómica era efectuada por la acción de proteínas tipo-histona (Wong y col., 2003), ya que se creía que los dinoflagelados carecían de histonas (Rizzo, 1991). Sin embargo, esta idea fue desafiada cuando se detectaron las histonas H3 y 2A.X en *Pyrocystis lunula* y *Alexandrium tamarense* respectivamente (Okamoto y Hastings, 2003; Hackett y col., 2005). Actualmente se conocen en dinoflagelados las cuatro histonas centrales del nucleosoma (H2A.X, H2B, H3, y H4), junto a la histona deacetilasa y la proteína de ensamblaje de nucleosomas (Lin, 2011).
- Abarcan un amplia variedad de modos tróficos. Aproximadamente el 50% de ellos son fotógrafos (Taylor, 1987a) (e.g. *Prorocentrum*) y el otro 50% incluye especies heterótrofas estrictas y especies mixótrofas con comportamiento alimenticio muy diverso. Las especies fotosintéticas normalmente contienen clorofilas del tipo a y c2, así como una variedad de pigmentos entre los que destacan principalmente β -carotenos y las xantófilas peridina y diadinoxantina (Hackett y col., 2004). Estas características han hecho de los dinoflagelados un grupo de microalgas muy exitoso. La evidencia fósil muestra que emergieron en el período Silúrico (400 millones de años) o antes, y su mayor radiación ocurrió en el Triásico con la aparición de abundantes linajes (Fensome y col., 1999).

1.5 Ecología de las FAN: Factores involucrados en la proliferación de los dinoflagelados

1.5.1. Factores físico-químicos y nutricionales

El desarrollo y proliferación de las floraciones algales ocurren como una combinación de factores ambientales, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la luz solar, las perturbaciones del ecosistema (condiciones de estabilidad o mezclado de las corrientes de agua, turbidez), factores hidrológicos (caudal de los ríos y los niveles de almacenamiento de agua) y la química del agua (pH, conductividad, la salinidad, la disponibilidad de carbono).



Normalmente las FAN proliferan durante la temporada de verano o cuando las temperaturas son más cálidas de lo normal. Las temperaturas más cálidas pueden crear una ventaja competitiva para ciertos tipos de algas nocivas. Es estas situaciones las cuales crecen más rápido que otras algas no nocivas a temperaturas relativamente altas, como es el caso de la cianobacteria *Microcystis* (Imai y col., 2009).

Sin embargo, existe una creciente evidencia de que el aumento en eventos FAN y el aumento de la magnitud de estos eventos está vinculado a la disponibilidad de nutrientes (Anderson y col., 2002; Glibert y col., 2005b), los cuales están a menudo directa o indirectamente vinculados a la eutrofización de los sistemas debida a la actividad del hombre (GEOHAB, 2006; Heisler y col., 2008).

El nutriente más frecuentemente implicado en la limitación del crecimiento de fitoplancton, en particular en los sistemas de surgencia (*upwelling*) costeros es el nitrógeno (N), aunque otros elementos, como el silicio (Si) y el fósforo (P) pueden moldear la dinámica de las comunidades (Cochlan y col., 2008; Kudela y col., 2008). En ciertas situaciones, se ha implicado a los cambios en la relación de las concentraciones ambientales de Si/N y N/P en el establecimiento de floraciones de dinoflagelados y diatomeas (Anderson y col., 2002; Anderson, 2004; Bronk y col., 2004; Allen y col., 2006; Kudela y col.). Otros elementos minoritarios también pueden favorecer el desarrollo de las FAN. Por ejemplo, el hierro (Fe) parece actuar como un importante micronutriente limitante, particularmente en las regiones oceánicas de alto contenido de nutrientes y baja clorofila (Kudela y col., 2010).

1.5.2. Factores biológicos

A parte de los factores físico-químicos y nutricionales implicados en la proliferación de las FAN, hay que tener en cuenta otros mucho menos conocidos implicados en el aumento o desaparición de las proliferaciones de algas como son los factores biológicos. Entre ellos:

1.5.2.1. Bacterias

Son componentes fundamentales de los ecosistemas marinos oceánicos y costeros. Pueden encontrarse bien en forma libre o viviendo en la región inmediatamente circundante a las células del fitoplancton, que se conoce como "ficoesfera" (Blackburn y col., 1998). En esta región, las bacterias pueden asociarse débilmente a las células del fitoplancton, fijarse en su superficie (Kogure y col., 1981) o encontrarse como simbioses intracelulares (Alverca y col., 2002; Biegala y col., 2002; Palacios y col., 2006). Estas bacterias simbioses se encuentran alojadas dentro de la célula hospedadora en compartimentos ricos en metabolitos, como el citoplasma, el núcleo o el espacio perinuclear (Alverca y col., 2002).

Las interacciones entre alga y bacteria pueden ser de tipo simbiótica o parasítica (Schafer y col., 2002) y son altamente dinámicas, ya que las bacterias presentan fluctuaciones en cuanto al número, composición y localización en las diferentes fases del ciclo vital del fitoplancton (Grossart, 1999). En las interacciones parasíticas, la bacteria penetra en la célula del fitoplancton, provocando su lisis y muerte (Cole, 1982), mientras que en las interacciones simbióticas, la bacteria se beneficia del fitoplancton a través de nutrientes que éste le provee, como por ejemplo a través de exudados (Cole,



1982), mientras que el fitoplancton se beneficia de productos bacterianos, como nutrientes, vitaminas y factores de crecimiento (Paerl y Pinckney, 1996).

Existen numerosos ejemplos en la literatura que citan la presencia de bacterias en el interior de dinoflagelados como *Gonyaulax diacantha* (= *Gonyaulax verior* Sournia), *Amphidinium herdmanni*, *Katodinium galndulum*, *Gymnodinium leuborae*, *G. splendens*, *Noctiluca scintillans*, *Peridinium balticum*, *Sinophysis canaliculata*, *Gyrodinium instriatum*, *Prorocentrum micans* y en diferentes especies del género *Alexandrium* (Doucette y Powell, 1998; Kirchner y col., 2001; Lewis y col., 2001; Maki y Imai, 2001; Schweikert y Meyer, 2001; Alverca y col., 2002; Biegala y col., 2002; Töbe, 2002; Martins y col., 2003; Palacios y col., 2006; Escalera y col., 2011). También se ha detectado la presencia de bacterias endosimbióticas en el dinoflagelado productor de toxinas DSP, *Dinophysis acuminata* (Lucas y Vesk, 1990).

Existen estudios que han aportado evidencias de la interacción específica entre bacterias y fitoplancton, llevando a la conclusión de que las bacterias pueden desempeñar un papel importante en el control de la dinámica de éste (Lovejoy y col., 1998; Brinkmeyer y col., 2000). Por ejemplo, Fukami y col. (1991) encontraron que las comunidades bacterianas aisladas durante una floración del dinoflagelado *Gymnodinium nagasakiense* inhibían el desarrollo del alga *Skeletonema costatum* mientras estimulaba al dinoflagelado. Años más tarde, el mismo autor (Fukami y col., 1997) reportó que una cepa de *Flavobacterium sp.* aislada durante el período de decadencia de una floración algal tuvo un fuerte efecto alguicida sobre *Gymnodinium mikimotoi*.

Otro papel importante que podrían desempeñar las bacterias es en la producción de toxinas en dinoflagelados tóxicos, ya sea de manera directa, siendo ellas las que sintetizarían las toxinas, o de manera indirecta, influyendo en la capacidad del dinoflagelado en la producción de las toxinas. Sin embargo, existe controversia en la comunidad científica en cuanto a si los dinoflagelados verdaderamente producen las toxinas o si en cambio son de origen bacteriano (Silva y Sousa, 1981; Silva, 1982; Kodama, 1990; Hold y col., 2001; Töbe, 2002; Palacios y col., 2006). De hecho, se han detectado saxitoxinas en bacterias aisladas de cultivos de *Alexandrium sp.* (Kodama y col., 1990; Doucette y Trick, 1995; Gallacher y col., 1997) y también se ha demostrado la producción autónoma de PSP a partir de cultivos de las bacterias *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas diminuta*, aisladas respectivamente a partir de *Alexandrium lusitanicum* y *Gymnodinium catenatum* (Franca y col., 1996). Existen estudios que han señalado que cuando los cultivos de dinoflagelados son tratados con antibióticos u otros compuestos bactericidas, en algunos casos la producción de toxinas PSP por parte de las microalgas disminuye, mientras que en otros ésta se mantiene inalterada (Doucette, 1995; Dantzer y Levin, 1997; Wang y col., 2003).

Si bien las investigaciones en cuanto a la producción de toxinas relacionadas a las interacciones bacteria-dinoflagelado se han centrado especialmente en las toxinas PSP, pocas lo han hecho en la producción de toxinas DSP, como el ácido okadaico. Esta toxina se ha demostrado que es esencialmente un poliquétido, y su estructura sugiere que sería sintetizada por una poliquétido quinasa modular de tipo 1 (Wright y col., 1996; Kellmann y col., 2010). Numerosas vías sintéticas de poliquétidos se han identificado en bacterias, plantas y hongos, por lo que también se ha sugerido



que la producción de estas toxinas en dinoflagelados podría estar conducida por bacterias asociadas a ellos (Perez y col., 2008). Existe al menos un caso reportado de tres cepas bacterianas productoras de ácido okadaico, las cuales se identificaron como *Roseobacter algicola*, *Roseobacter denitrificans*, y *Roseobacter litoralis* (Lafay y col., 1995).

1.5.2.2. Virus

Aunque las bacterias asociadas a los dinoflagelados son las más conocidas, recientemente se han ampliado los estudios relacionados con el posible papel de los virus que infectan microalgas marinas en el desarrollo de proliferaciones de éstas (Nagasaki, 2008). Por ejemplo, en *Gymnodinium mikimotoi* se aislaron 2 agentes similares al virus, GM6 y GM7, que se señalaron como los responsables de la supresión del crecimiento del dinoflagelado en las aguas costeras del mar Uwa (Japón) (Onji y col., 2003). En el dinoflagelado formador de FAN que causa mortandad de bivalvos en Japón, *Heterocapsa circularisquama*, se aislaron dos virus distintos co-ocurrentes, uno grande de DNA de doble cadena, "HcV", y uno pequeño de RNA de cadena sencilla, 'HcRNAV', capaces de infectar y lisar células del dinoflagelado que afectaron la dinámica de crecimiento de *H. circularisquama* en su ambiente natural (Tomaru y col., 2009).

1.5.2.3. Predadores

Los protistas son los mayores consumidores de fitoplancton y bacterioplancton en los ambientes marinos, participando en el ciclo del carbono y la regeneración de nutrientes. Debido a que la cantidad que consumen diariamente es muy elevada, podrían constituir una forma natural de control de poblaciones en los sistemas acuáticos. Se conoce muy poco acerca de predadores específicos de dinoflagelados y los más estudiados han sido aquellos que tienen como presa *Dinophysis* spp., tales como *Fragilidium* sp en el que se encontraron células vivas de *D. acuminata* (Fukuyo en (Jacobson, 1999), *F. duplocampanaeforme* capaz de alimentarse células de *D. acuminata* y *D. caudata* (Park y Kim, 2010) o *Noctiluca scintillans* en el que se encontraron vacuolas que contenían restos de *D. caudata* (Escalera y col., 2007).

1.5.2.4. Parásitos

Diferentes especies de dinoflagelados productoras de proliferaciones pueden ser infectados por parásitos de los géneros *Amoebophrya* y *Parvilucifera*. Ambos poseen ciclos de vida muy complejos con fases de vida libre y una fase en la que necesita infectar un hospedador. El rango de especies que pueden parasitar es muy amplio y así *Parvilucifera sinerae*, utiliza como huésped especies de los géneros: *Alexandrium*, *Coolia*, *Dinophysis*, *Fragilidium*, *Gambierdiscus*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa*, *Kryptoperidinium*, *Lepidodinium*, *Ostreopsis*, *Pentapharsodinium*, *Protoceratium*, *Scrippsiella* y *Woloszynskia* (Garcés y col., 2013). Estos parásitos podrían ejercer un control biológico sobre la dinámica de las FAN y recientemente se ha descrito que *Amoebophrya* es capaz de infectar y matar poblaciones del dinoflagelado *Akashiwo sanguinea* en dos días (Mazzillo y col., 2011). Los mecanismos de parasitismo aún no están bien descritos y parece que pueden estar implicadas muchas variables, tales como factores físico-químicos y nutricionales o la composición de la comunidad planctónica.



1.6 *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophysiaceae)

El género *Dinophysis* pertenece al orden de los *Dinophysiales*, de los cuales se han descrito más de 100 especies de dinoflagelados tecados (Gómez, 2005).

Varias especies del género han sido señaladas como las principales responsables de la presencia de toxinas diarreas en bivalvos en Japón, Europa, Chile y Nueva Zelanda (Dahl y Yndestad, 1985; MacKenzie, 1991; Lagos, 1998; MacKenzie y col., 1998; Vale y col., 1998; Uribe y col., 2001; Pizarro y col., 2009). Raras veces alcanzan niveles suficientes para colorear el agua, siendo frecuente que se asocien a episodios tóxicos con concentraciones que oscilan entre 2×10^2 y 10^5 cel/ml (Moita y col., 2006; Escalera y col., 2010). A estos organismos se los pueden detectar durante todo el año, por lo que constituyen una amenaza para la explotación de los recursos relacionados con la acuicultura. Sin embargo, las especies del género *Dinophysis* no suelen observarse en altas concentraciones, pudiendo representar entre el 1 y 10 % de la población plantónica total.

Las floraciones de *Dinophysis* spp. en España pueden registrarse a lo largo de toda su costa. Las especies más abundantes del género en las rías gallegas son *D. sacculus* y *D. acuminata* en las Rías Altas y *D. acuminata* y *D. acuta* en las Rías Bajas. Otras especies frecuentes que aparecen en concentraciones mucho más moderadas son *D. rotundata*, *D. caudata* y *D. tripos*. En la costa sudatlántica (Andalucía oeste), se han detectado episodios DSP ocasionados por *D. acuminata* y *D. acuta*. En la costa catalana del Delta del Ebro son conocidas las proliferaciones de *D. sacculus* así como también las floraciones de *D. caudata*.

1.6.1. Toxicidad de *Dinophysis*

Dinophysis fue reconocido por primera vez como productor de toxinas en el año 1980, cuando se asociaron brotes de intoxicación diarreaica (DSP) con *Dinophysis fortii* en aguas de Japón (Yasumoto y col., 1978; Yasumoto y col., 1980).

Hasta el momento se han encontrado tres grupos de toxinas diarreas (DST) en *Dinophysis* spp. 1) el ácido okadaico (OA), cuyo nombre proviene de la esponja marina *Halichondria okadai* en la que se halló por primera vez, 2) las dinofisistoxinas (DTX), estructuralmente similares al OA y 3) las pectenotoxinas (PTX), que son estructuralmente muy diferentes de las otras dos toxinas (Tachibana y col., 1981; Yasumoto y col., 1985; Marcaillou y col., 2005; Fernández y col., 2006; Blanco y col., 2007; Hackett y col., 2009; Suzuki y col., 2009; Dominguez y col., 2010; Fux y col., 2010; Fux y col., 2011; Rodríguez y col., 2012; Nielsen y col., 2013).

El ácido okadaico y las dinofisistoxinas son ácidos de poliéter lipofílicos formados por sólo carbono, oxígeno e hidrógeno (Figura 2). Cuando se dedujo por vez primera la estructura molecular de la DTX-1 se la reconoció de inmediato como un derivado del OA (Murata y col., 1982). Diez años más tarde se halló una variante, la DTX-2, en mejillones de las costas irlandesas, y años después se confirmó su presencia en *Dinophysis acuta* (Hu y col., 1992; James y col., 1996).

El OA y las DTXs son toxinas muy resistentes a las altas temperaturas ($> 100^\circ \text{C}$). Se acumulan en el hepatopáncreas (glándula digestiva) de los mariscos, por lo que la cocción de éstos no elimina la



toxina en caso de estar contaminados. Estas toxinas actúan como potentes inhibidores de serina/treonina proteín fosfatasas, lo que explica su toxicidad (Takai y col., 1987; Bialojan y Takai, 1988), y el hecho de que sean fuertes promotores tumorales en mamíferos (Fujiki y col., 1991). Por otro lado, las pectenotoxinas tienen su acción en el citoesqueleto, en especial en las fibras de actina y microtúbulos, llevando a la apoptosis y muerte celular (Allingham y col., 2007).

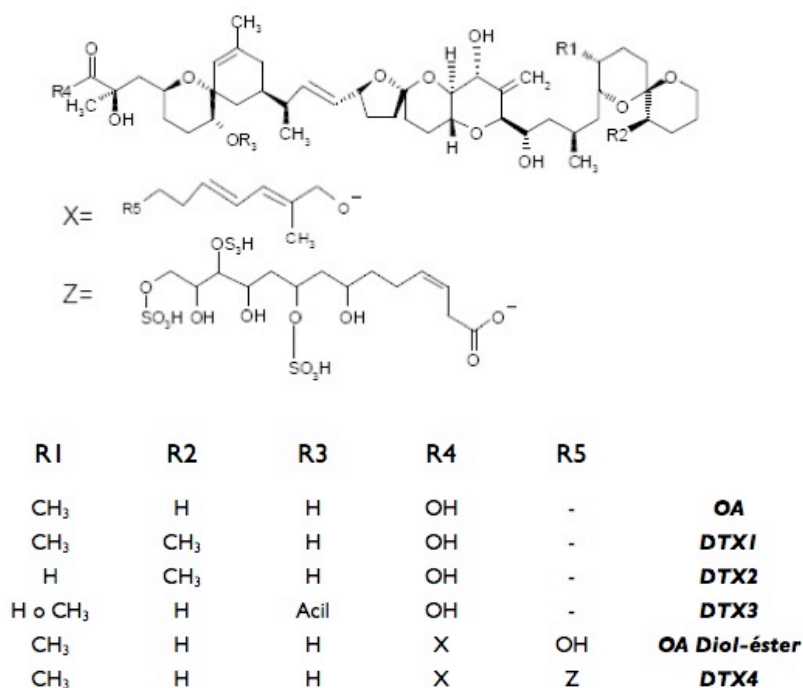


Figura 2. Estructura química del ácido okadaico (OA) y de las dinofisistoxinas (DTXs). Mientras que el OA, la DTX-1 y la DTX-2 son compuestos bien definidos, las DTX-3 no lo son debido a la variabilidad del grupo acilo, por lo que agrupa muchos acil-ésteres de AO y DTXs. Modificado de (Larsen y col., 2007; Reguera y col., 2007).

Además de OA y DTX, *Dinophysis* spp. puede también producir otro grupo de toxinas denominadas pectenotoxinas (PTX) (Figura 3). La primera molécula de PTX fue hallada en vieiras japonesas y se han descrito hasta la fecha por lo menos 15 derivados (Yasumoto y col., 1985; Miles, 2007). La mayoría de ellas, sin embargo, sólo se ha encontrado en bivalvos, y en la actualidad se cree que son los productos de depuración o de procesos de descomposición de PTX (Suzuki y col., 1998; Miles, 2007).

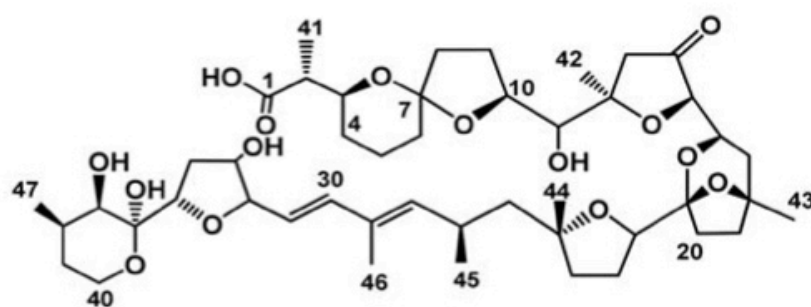
Estructuralmente las PXT, a diferencia del OA y de las DTXs, son poliéteres de lactonas y no poseen una alta actividad diarreaica cuando son ingeridas oralmente (Miles y col., 2004; Ito y col., 2008). Sin embargo, las PTXs fueron clasificadas como toxinas DSP junto al OA, las DTX y las yesotoxinas. Ésto fue debido al hecho de que a menudo se obtienen junto al OA y a las DTXs en extractos de mejillones tóxicos y por la toxicidad observada en ratones luego de administrarse intraperitonealmente (Miles, 2007).

El primer dinoflagelado en el que se hallaron PTXs, específicamente la pectenotoxina-2 (PTX2) fue *Dinophysis fortii* aislado de aguas japonesas (Lee y col., 1987). Unos años más tarde se describió un



derivado, la PTX2SA, en *D. acuta* de Irlanda (James y col., 1999). Desde entonces se ha reportado su presencia en células de varias especies de *Dinophysis* (Vale y Sampayo, 2002; Vale, 2004; MacKenzie y col., 2005; Blanco y col., 2007; Suzuki y col., 2009; Fux y col., 2011).

El contenido de toxinas en *Dinophysis* puede variar significativamente dentro y entre especies. Se ha observado que las variaciones intraespecíficas en el perfil de toxinas de diferentes cepas de una misma especie puede ser tan marcada como si de especies diferentes se tratara (Reguera y Pizarro, 2008). Los tres grupos de toxinas (OA, DTX y PTX) se han reportado completamente ausentes en algunas cepas de *Dinophysis* (Blanco y col., 2007; Raho y col., 2008; Deeds y col., 2010; Kim y col., 2010). Actualmente se ha demostrado que diez especies del género *Dinophysis* pueden contener al menos uno de los tres grupos de toxinas (ver (Reguera y col., 2012). La presencia de estas toxinas también se ha reportado en el dinoflagelado heterótrofo *Phalacroma mitra* y *P. rotundatum*, pero se ha cuestionado si son producidas *de novo* o si se adquieren a través de la presa ingerida (González-Gil y col., 2011).



Sustituyente C43	Configuración C7	
CH ₂ OH	R	PTX1
CH ₃	R	PTX2
CHO	R	PTX3
CH ₂ OH	S	PTX4
COOH	R	PTX6
COOH	S	PTX7
OH	R	PTX11

Figura 3. Estructura química de las principales pectenotoxinas (PTXs). Modificado de (Lawrence y col., 2011).

Estudios recientes han señalado la importancia del análisis de toxinas en el medio. Nagai y col. (2011) reportaron en *D. acuminata* y *D. fortii*, que tanto el OA y la DTX-1 son principalmente como toxinas excretadas (\approx 80% extracelular), mientras que PTX-2 se encuentra principalmente intracelularmente (<5% extracelular). Resultados similares fueron reportados para una cepa diferente *D. acuminata* (Smith y col., 2012).

A pesar de los avances en las técnicas de identificación de toxinas y del establecimiento de cultivos de *Dinophysis*, no existen patrones claros sobre los perfiles de toxina de poblaciones de *Dinophysis*



sp. geográficamente separados, incluso dentro de los dos más frecuentemente estudiado las especies *D. acuta* y *D. acuminata*.

1.6.2. Morfología del género *Dinophysis* y problemas de caracterización

Los individuos del género *Dinophysis* se caracterizan por poseer una fuerte compresión lateral (Figura 4). Poseen un cíngulo estrecho, delimitado por sus aletas o listas, anterior y posterior, las cuales suelen ser medianas o pequeñas, y pueden tener o no radios. Muy prominente es su aleta sulcal izquierda, que tiene 3 radios, o costillas, bien evidentes (R_1 , R_2 y R_3). Sin embargo, la aleta sulcal derecha suele ser poco evidente y no está sostenida por costillas. La forma del cíngulo y el sulco da a las células de *Dinophysis* una orientación dorso-ventral. La característica más notable es la aleta sulcal izquierda, que delimita por este lado al sulco.

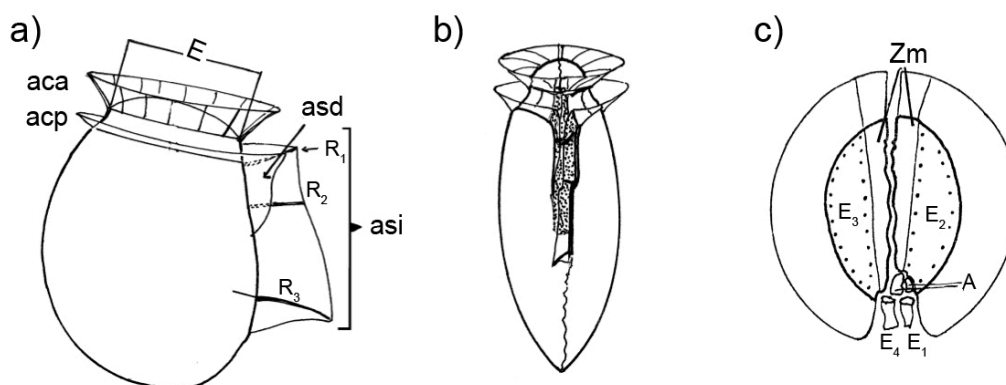


Figura 4. Esquema representativo de las distintas partes de *Dinophysis*: a) vista lateral, b) vista ventral y c) vista apical de la epiteca. **aca**, aleta cingular anterior con radios; **acp**, aleta cingular posterior; **asd**, aleta sulcal derecha; **asi**, aleta sulcal izquierda con sus 3 costillas R_1 , R_2 y R_3 anterior, media y posterior respectivamente; **E**, profundidad; **A**, placas apicales; **E1**, **E2**, **E3** y **E4**, placas epitecales; **Zm**, zona o banda megacística (Tomado de (Balech, 2002).

La identificación taxonómica de *Dinophysis* spp. se basa principalmente en el tamaño, forma y ornamentación de sus grandes placas hipotecales, que proporcionan el contorno celular y la forma de las listas sulcal izquierda y las 3 costillas que las apoyan (Larsen y Moestrup, 1992).

Sin embargo, con frecuencia se observan diferencias biogeográficas intraespecíficas en la morfología. Se ha observado que cepas de la misma especie en una localidad dada pueden presentar una variabilidad de formas, partiendo desde grandes células vegetativas a pequeñas células gametas como resultado de su ciclo de vida polimórfico (Figura 5), su modo de alimentación y división activa (Reguera y Gonzalez-Gil, 2001; Reguera y col., 2003; Escalera y Reguera, 2008; Reguera y Pizarro, 2008). Esta variabilidad agrega dificultad a la hora de identificar las especies potencialmente tóxicas que deben ser identificadas en programas de monitoreo. Esta incertidumbre añadida en la identificación y cuantificación de muestras de fitoplancton se hace evidente cuando en una misma muestra coinciden dos especies de *Dinophysis* cercanas, tales como el par de *D. acuminata* y *D. sacculus* Stein (Zingone y col., 1998), con diferente potencial toxigénico, o el par *D. tripos* y *D. caudata* (Reguera y col., 2007) (Figura 6).

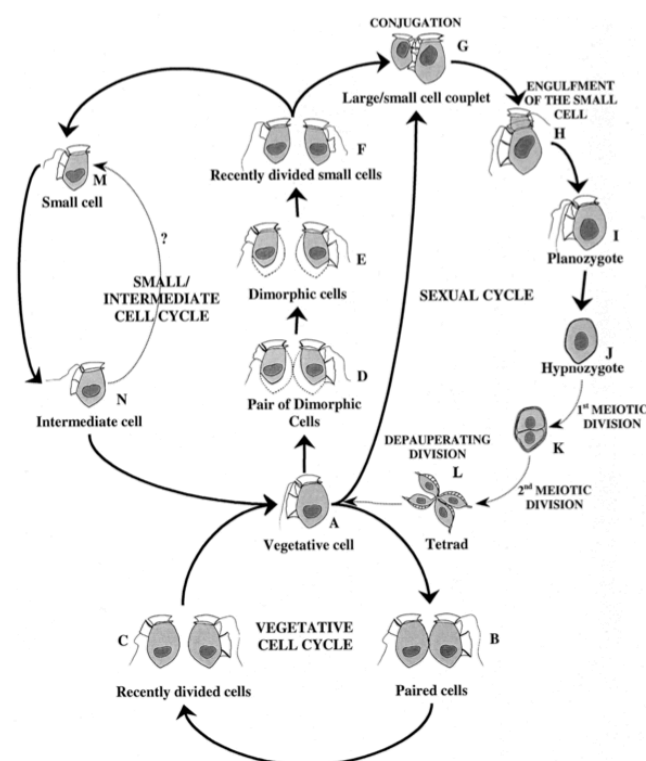


Figura 5. Diagrama resumen de los estadios del complejo ciclo de vida de *Dinophysis* spp. (A-C) ciclo de vida vegetativo (B) células en pares, (C) células recién divididas con desarrollo incompleto de la aleta sulcal derecha. (A-L) ciclo sexual: (D) par de células dimórficas producto de una división depauperante. (E) células dimórficas recién separadas. (F) células pequeñas recién divididas con desarrollo incompleto de la aleta sulcal derecha. (G) célula pequeña y vegetativa actuando como gametas anisógamas + y -. (H) atrapamiento de la célula pequeña por la vegetativa (I) planozigoto, (J) posible planozigoto de pares doble. (K) posible primera división meiótica. (L) tétrada. (N-M) ciclo celular de células pequeñas/intermedias simplificado. Extraído de (Reguera y Gonzalez-Gil, 2001).

Un claro ejemplo de este problema es lo que varios autores han llamado “complejo *Dinophysis acuminata*” (Lassus y Bardouil, 1991; Bravo y col., 1995b; Zingone y col., 1998; Koukaras, 2004; Raho y col., 2008; Fux y col., 2011; Reguera y col., 2012; Raho y col., 2013). Este es un término que se ha implementado para identificar a especies cuya morfología, similar a la de *Dinophysis acuminata*, los hace difíciles de discriminar por microscopía. Una gran variedad de morfotipos distintos de *Dinophysis* han sido etiquetados como *D. acuminata*, *D. cf acuminata*, *D. ovum*, *D. cf ovum* en base a que sus grandes placas hipotocales eran dorsal convexa y presentaban una forma más o menos ovalada en vista lateral (Reguera y col., 2012).

Dada la magnitud económica que tiene el cultivo de moluscos en España y el mundo, la identificación y cuantificación de las especies toxigénicas de *Dinophysis* es parte de la rutina de trabajo en programas de monitoreo de algas nocivas. Por ello, los esfuerzos se han volcado en el desarrollo de técnicas que permitan una clara y, de ser posible, también rápida y sencilla identificación de especies de *Dinophysis* que complementen a la identificación basada en su morfología.

1.6.3. El rRNA como marcador molecular en *Dinophysis* spp.

Las herramientas que ha desarrollado la biología molecular son de gran utilidad en estudios de filogenia, taxonomía molecular y biodiversidad del fitoplancton y su valor se ha visto probado en situaciones donde las herramientas tradicionales, como la microscopía óptica, resultan insuficientes.



La mayoría de los estudios filogenéticos realizados en dinoflagelados se basan en los genes de RNA ribosómico (rRNA) (Bhattacharya, 1997; Puel y col., 1998; Guillou y col., 2002; Ki y Han, 2005; Potvin y Lovejoy, 2009). Sin embargo, cuando estos genes son utilizados para esclarecer relaciones

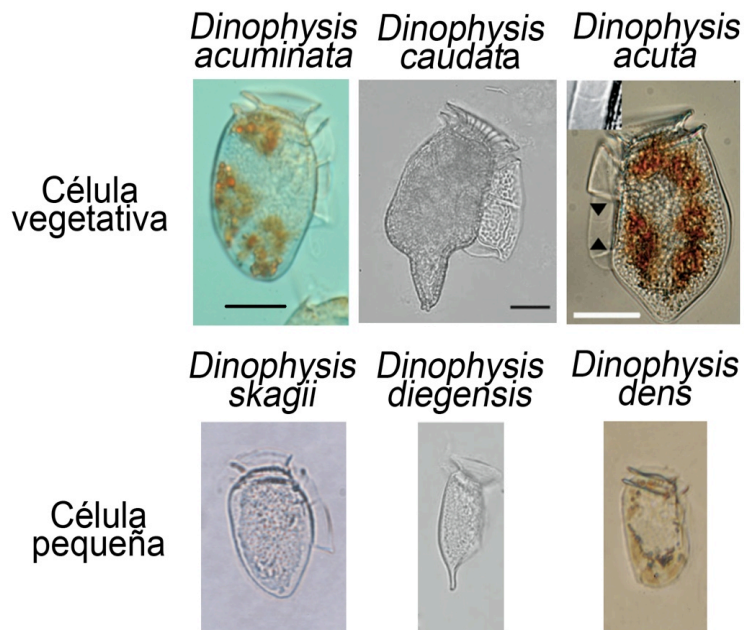


Figura 6. Micrografías de células vegetativas de *Dinophysis acuminata*, *D. caudata* y *D. acuta*, y de sus células pequeñas *D. skagii*, *D. diegensis* y *D. dens*. Tomado de (Reguera y col., 2007; Escalera y Reguera, 2008; Raho y col., 2013).

filogenéticas en especies de *Dinophysis* no resultan ser los más idóneos. Por ejemplo, las secuencias de las regiones D1-D2 del operón 28S rRNA de especies fototróficas sólo han sido capaces de discriminar dos clados principales: uno que agrupa a *D. caudata* Saville-Kent, *D. Fortii* Pavillard, *D. tripos* Gourret, *D. acuta* (de Noruega) y *D. norvegica*, y otro formado por *D. acuminata*, *D. dens* Pavillard, *D. sacculus* Stein y *D. acuta* (del Reino Unido) (Edvardsen y col., 2003). Además, tampoco parece haber una correlación significativa entre la localización geográfica y variaciones en este gen, por lo que no ha sido posible describir las diferencias intraespecíficas entre aislados de *Dinophysis* de diferentes regiones (Hart y col., 2007). Qiu y col. (2011) analizó la secuencia 28S de *Dinophysis miles* del mar de China y halló que esta era idéntica a otra secuencia de *D. miles* del océano Índico (FJ808688). Sin embargo, ésta también resultó ser idéntica a *D. tripos* (FJ808692, AY040585) y *D. odiosa* (AY259241), por lo que concluyó que el gen 28S era incapaz de resolver estas tres especies.

Resultados similares se han obtenido al utilizar el operón 18S rRNA, mostrando una baja resolución para este género de dinoflagelados (Saunders y col., 1997; Ruiz-Sebastián y O’Ryan, 2001; Edvardsen y col., 2003). Por ejemplo, las especies *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. norvegica* resultaron ser diferentes entre 5 y 8 pares de bases (Edvardsen y col., 2003). De manera similar, el gen 18S no permitió distinguir correctamente a *D. miles* de *D. norvegica* y *D. caudata* (Qiu y col., 2011).

Las regiones espaciadoras internas ITS1 e ITS2 son porciones de DNA no funcionales situadas entre los genes 18S, 5,8S y 28S rRNA (Figura 7). La comparación de secuencias de la región ITS es



ampliamente utilizada en la filogenia y taxonomía molecular debido al alto número de copias de los genes, lo cual facilita su amplificación por PCR incluso de pequeñas cantidades de DNA, y a su alto grado de variación incluso entre especies estrechamente relacionadas (Bhattacharya y Medlin, 1998; Schoch y col., 2012). Esto puede explicarse por la relativamente baja presión evolutiva que actúa sobre tales secuencias no funcionales. Sin embargo, el análisis de estas secuencias no permiten discriminar entre las diferentes especies de *Dinophysis*. Por ejemplo, las regiones ITS resultaron idénticas para *D. acuminata* y *D. norvegica* (Edvardsen y col., 2003), y mostraron una similitud de 99% entre *D. acuminata* y *D. sacculus* (Marín y col., 2001).

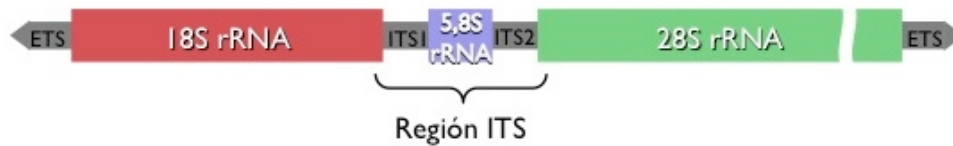


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del operón de rRNA.

1.6.4. Genes mitocondriales como marcadores moleculares

El DNA mitocondrial es un candidato útil como marcador molecular en reconstrucciones filogenéticas más estrechas debido a que sus genes se hallan generalmente conservados pero están sujetos a más variaciones que los genes nucleares (Avice, 1994; Saccone y col., 2000). Sin embargo, su utilidad ha sido poco explorada en dinoflagelados. Algunos genes mitocondriales son mejores relojes moleculares que el rRNA porque tienen una tasa de mutación relativamente constante, lo que los hace ideales para estudios filogenéticos entre especies muy cercanas. Por ejemplo, el citocromo b (*cob*) es uno de los genes mitocondriales más utilizados en el análisis filogenético de poblaciones (Taylor y Hellberg, 2003; Kamikawa y Nishimura, 2009).

Lin y col. (2006b) presentaron resultados que mostraban la existencia de pequeñas diferencias en las secuencias del gen *cob* en poblaciones del dinoflagelado *Prorocentrum minimum*. Sin embargo las diferencias obtenidas fueron mayores cuando se compararon las secuencias de *P. minimum* y *P. micans*, concluyendo que este gen puede ser un marcador potencialmente útil para identificar especies de este género. Se ha demostrado que la combinación del estudio de los genes nucleares y mitocondriales proporciona construcciones filogenéticas sólidas entre una amplia variedad de organismos, incluyendo protistas del grupo Alveolata (Lin y col., 2002; Zhang y col., 2005). Sin embargo, su utilidad para otros grupos de dinoflagelados aún no ha sido evaluada.

Otro gen mitocondrial utilizado con éxito en la identificación de una amplia gama de organismos, desde animales a hongos, es el que codifica para la citocromo c oxidasa 1 (*cox1*) (Seifert y col., 2007). El potencial de este gen ha generado mucho interés y se ha llegado a establecerlo como el "núcleo de un sistema de bio-identificación global para animales" (Hebert y col., 2003a; Hebert y col., 2003b). Saunders (2005) verificó que el gen *cox1* era un marcador adecuado para la tipificación de algas rojas y Robba y col. (2006) comparó los resultados de numerosas muestras de este grupo de



algas para concluir que *cox1* era un marcador molecular con un mayor poder resolutivo que el gen que codifica para la RuBisCO de plástidos. También el gen demostró ser útil para separar los diferentes clados del dinoflagelado del género *Symbiodinium* (Takabayashi y col., 2004).

Papaefthimiou y col. (2010) utilizaron el gen *cox1* para describir a un *Dinophysis* cf. *acuminata* aislado en la Bahía de Thermaikos (Grecia), concluyendo que éste se encontraba más relacionado con *D. ovum*. Posteriormente, la secuenciación de gen *cox1* se utilizó en *D. miles*, observándose unas diferencias de sólo 3 ó 4 pares de bases con *D. ovum* (AM931583, GU452507, GU452508), 3 pb con *D. acuminata* (EU130566) y una o ninguna con *D. tripos* (EU927473, EU927472) (Qiu y col., 2011).

1.7 Lectinas

Las lectinas, cuyo nombre procede de la palabra latina *legere*, que significa "seleccionar", son un grupo de proteínas o glicoproteínas de naturaleza no-enzimática que tienen la capacidad de unirse de forma no covalente y muy específica a azúcares o grupos de azúcares (Goldstein y col., 1980; Sharon y Lis, 2004). Todas las moléculas de lectina poseen dos o más sitios de unión a carbohidratos, una propiedad esencial para su capacidad de aglutinar células o para interactuar con carbohidratos complejos (Wu y col., 2001). Se pueden clasificar en grupos en función de la base de su especificidad, la que se determina por la capacidad de los diversos azúcares para inhibir la hemaglutinación de eritrocitos (Slifkin y Doyle, 1990).

1.7.1. Técnicas alternativas para la identificación de *Dinophysis* spp.

Aunque las técnicas moleculares pueden tener una buena resolución y no son difíciles de aplicar, necesitan tiempo para ser realizadas. Esto puede ser una desventaja durante los programas de seguimiento o monitoreo, en el que puede ser necesario un resultado rápido y fiable y pone de manifiesto la necesidad de una técnica rápida, fácil de realizar y capaz de identificar especies de *Dinophysis*. Es por ello que el uso de sondas (anticuerpos monoclonales, lectinas y oligonucleótidos) constituye una alternativa prometedora a los recuentos rutinarios de microorganismos (Anderson, 1995; Scholin y Anderson, 1998; Takahashi y col., 2005; Touzet y Raine, 2007; Hou y col., 2008; Dittami y col., 2013).

Dicha capacidad de reconocer carbohidratos de forma específica ha sido aprovechada para el desarrollo de sondas, donde las lectinas unidas a compuestos fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) se han utilizado con el fin de discriminar grupos de dinoflagelados nocivos y para revelar la diversidad propia de cada especie de la pared celular de diferentes dinoflagelados (Costas y Rodas, 1994; Cho y col., 1998). Por ejemplo, se ha descrito que las lectinas pueden diferenciar entre genotipos de diversas especies de microalgas de la clase Cyanophyceae y Dinophyceae (Costas y col., 1993; Costas y Rodas, 1994; Costas y col., 1995). Rhodes y col. (1995) demostraron que las lectinas podían utilizarse con éxito como sondas para diferenciar entre especies de dinoflagelados morfológicamente similares de aguas costeras de Nueva Zelanda, como *Gymnodinium mikimotoi*, *Gymnodinium* s. y *G. pulchellum*, *Alexandrium minutum* y *Cachonina halli*. De forma similar, Cho y col. (1998) pudieron distinguir 12 microalgas de las costas de Corea utilizando lectinas FITC-conjugadas.



Pese a que los trabajos realizados destacan la utilidad de las lectinas conjugadas con FITC para discriminar entre dinoflagelados, ningún estudio se ha llevado a cabo evaluando esta capacidad en el género *Dinophysis*.

1.7.2. Reconocimiento entre presa y predador

Muchas especies de organismos ciliados y flagelados, en especial aquellos que interceptan a sus presas, exhiben un comportamiento de selección en base a propiedades físicas (John y Davidson, 2001; Matz y Jurgens, 2001, 2005). La influencia de factores morfológicos, tales como el tamaño de la presa es uno de los factores más conocidos a los que se atribuye las interacciones presa-predador (Simek y Chrzanowski, 1992; Hansen y col., 1996; Matz y Jurgens, 2005). La forma celular y la motilidad de la presa también ejercen su efecto en el comportamiento de ingesta observándose que las presas muy móviles pueden evitar o escapar de la ingestión (Tillmann y Reckermann, 2002; Matz y Jurgens, 2005). En otros casos los protozoos simplemente no puede consumir presas que poseen formas complejas, como es el caso de microorganismos filamentosos (Jürgens y Güde, 1994).

En la actualidad existe una gran cantidad de estudios que describen el papel que juegan las interacciones químicas en las relaciones que se producen entre los depredadores protistas y sus presas (Cembella, 2003; Pohnert y col., 2007; DJS y col., 2008). Desde la perspectiva de un predador, estas interacciones químicas incluyen tanto señales químicas disueltas liberadas de presa cómo el reconocimiento de moléculas en la superficie celular de las presas (DJS y col., 2008).

Los protistas planctónicos pueden discriminar entre presas de tamaños similares en base a diferencias en la composición de la superficie celular (DJS y col., 2008). Sin embargo, se sabe poco acerca de los potenciales mecanismos involucrados en estas interacciones químicas. En los macrófagos la fagocitosis es iniciada por receptores en la superficie de la célula fagocítica que se adhieren al patógeno *Dictyostelium*, desencadenando las señales que llevan al proceso fagocítico (Bozzaro y col., 2008; Cosson y Soldati, 2008). Estos receptores generalmente son proteínas, como las integrinas y lectinas (Hynes, 2002; Wootton y col., 2007).

Es bien conocido en macrófagos el papel que cumple lactina receptor de manosa. Esta lectina transmembrana presente en células sanguíneas fagocíticas juega un papel fundamental en el reconocimiento al unirse a carbohidratos en la superficie de los microorganismos patógenos (Stahl y Ezekowitz, 1998). Entre los protistas las lectinas también parecen desempeñar una serie de funciones involucradas en la interacción entre organismos. Por ejemplo, la ameba de vida libre *Hartmannella vermiformis* utiliza una lectina que reconoce galactosa o N-actetyl-galactosamina para adherirse y captar la bacteria patógena *Legionella pneumophila* (Venkataraman y col., 1997). En el dinoflagelado marino *Oxyrrhis marina* se ha visto que utiliza una lectina de unión a manosa dependiente de calcio para capturar sus posibles presas (Wootton y col., 2007). Una glicoproteína rica en manosa presente en la pared celular de la microalga roja *Porphyridium* sp. puede ser el un sitio de biorreconocimiento por su depredador *Cryptocodinium cohnii* (Ucko y col., 1999; Shrestha y col.). Existe una amplia variedad de lectinas en los organismos predadores, que les permitirían clasificar entre las presas de distinta calidad nutricional sobre la base de su composición de carbohidratos de la superficie celular (Wootton y col., 2007; Martel, 2009). Debido a que las lectinas poseen unas especificidades bien



determinadas por unos pocos carbohidratos (Wu y col., 2001), estas pueden actuar ya sea facilitando la aglutinación, unión y adhesión entre células, o mediando entre los mecanismos intracelulares y el proceso de reconocimiento (Dodd y Drickamer, 2001).

1.8. El problema de los plástidos de *Dinophysis*

Los dinoflagelados exhiben una gran diversidad en su forma de nutrición, desde fototrofia, heterotrofia y hasta mixotrofia (Horiguchi, 2006). Los dinoflagelados fotosintéticos poseen una gran variedad de plástidos que derivan de varios grupos de algas, incluyendo criptofitas, diatomeas, haptofitas y prasinofitas y se ha sugerido que sus plástidos actuales son el resultado de varias pérdidas y reemplazos a través de su historia evolutiva (Schnepf y Elbrächter, 1999; Saldarriaga y col., 2001; Hackett y col., 2003).

Los tipos de plástidos presentes en dinoflagelados hallados hasta la fecha se pueden clasificar en cinco categorías: (i) aquellos que contienen clorofila a y c (a/c) y fucoxantina derivados de una diatomea, (ii) aquellos que contienen clorofila a/b derivados de una clorofita, (iii) un tipo diferente de aquellos que contienen clorofila a/c y fucoxantina pero que derivan de haptofitas, (iv) los que poseen clorofila a/c y ficobilina que derivan de criptofitas (Schnepf y Elbrächter, 1999), y por último (v) cleptoplástidos, plástidos que adquiere de otro organismo y los conserva de manera funcional un tiempo determinado (Schnepf, 1993; Schnepf y Elbrächter, 1999; Horiguchi, 2006). El tipo más común de plástidos en dinoflagelados son los que contienen peridina como pigmento accesorio, los cuales tienen su origen en las algas rojas (Ishida y Green, 2002; Yoon y col., 2002; Takishita y col., 2005), aunque también existen grupos de dinoflagelados que tienen plástidos menos comunes originados de haptofitas o criptofitas (Hackett y col., 2003; Janson, 2004).

1.8.1. Mixotrofia

La mayoría de las especies de *Dinophysis* son mixótrofas, organismos fagotróficos que albergan algas simbiotas o secuestran los plástidos de sus presas. Las evidencias de la naturaleza mixotrófica de *Dinophysis* spp. fueron proporcionadas hace décadas e incluían la observación de vacuolas digestivas en el interior celular y los reiterados intentos fallidos de establecer cultivos en el laboratorio (Lucas y Vesk, 1990; Jacobson y Andersen, 1994; Berland y col., 1995). En 1991, (Hansen) observó por vez primera a células de *D. rotundata* (= *Phalochroma rotundatum*), de naturaleza heterótrofa, alimentándose del ciliado *Tiarina fusus* por un proceso conocido como mizocitosis, un tipo de fagocitosis en el que el predador perfora la cubierta de su presa con un pedúnculo de alimentación y succiona su contenido. Sin embargo, no fue hasta la obtención del primer cultivo de la especie *Dinophysis acuminata* en 2006, cuando se verificó su naturaleza mixotrófica y su principal presa (Park y col., 2006) en una línea predador-presa en la que *D. acuminata* era alimentado con el ciliado *Mesodinium rubrum*. A su vez, *M. rubrum*, que posee un endosimbionte obligado, necesita el suplemento de algas de origen criptofita del género *Teleaulax* para obtener buenas tasas de división. Se trata, entonces, de un cultivo complejo con un predador primario (*Mesodinium*) y otro secundario (*Dinophysis*). *M. rubrum*, es hasta el momento, la única presa conocida con la que se han podido establecer cultivos de *Dinophysis* spp (Nishitani y col.,



2008a; Park y col., 2010); a su vez el ciliado se alimenta de criptofitas, especialmente de aquellas que pertenecen al clado *Teleaulax*, *Plagioselmis*, *Geminigera* (TPG) (Gustafson y col., 2000; Hansen y Fenchel, 2006; Park y col., 2007; Myung y col., 2011; Hansen y col., 2012).

1.8.2. Origen de los plástidos

Existe mucha literatura que describe como las especies fotosintéticas de *Dinophysis* albergan plástidos cuyo origen se relaciona con criptofitas (Schnepf y Elbrächter, 1988; Takishita y Uchida, 1999; Takishita y col., 2002; Hackett y col., 2003; Janson y Graneli, 2003; Janson, 2004). Sin embargo, si sus plástidos son permanentes o cleptoplástidos ha dado lugar a una controversia aún no resuelta (Takishita y col., 2002; Minnhagen y Janson, 2006; Garcia-Cuetos y col., 2010; Park y col., 2010). Esta discrepancia se debe a que los estudios basados en técnicas moleculares y en ultraestructura han llevado a interpretaciones contradictorias acerca de la naturaleza de los plástidos en *Dinophysis*. Los datos moleculares disponibles proporcionados por varios genes plastidiales, como 16S rRNA, *rbcl*, *psbA*, *psaA* y *nmSSU*, han demostrado que existe una gran homogeneidad entre varias especies de *Dinophysis* y criptofitas del grupo TPG, especialmente con el género *Teleaulax* (Janson, 2004; Minnhagen y Janson, 2006; Nishitani y col., 2008a; Park y col., 2008; Garcia-Cuetos y col., 2010; Reguera y col., 2012; Myung y col., 2013), indicando que los plástidos en los dinoflagelados son cleptoplástido. Sin embargo, estudios de microscopía electrónica de transferencia (MET) sobre la ultraestructura de plástidos en *Dinophysis*, tanto de cultivos como de poblaciones naturales, mostraron que poseen una particular forma estrellada, una doble membrana rodeando al plástido, tilacoides en pares, pirenoides periféricos, y la ausencia de nucleomorfo (núcleo eucariótico del simbionte) (Hansen y col., 2013). Estas características difieren significativamente del ciliado y de la criptofita, lo que apoya la hipótesis de plástidos permanentes. Sin embargo, recientemente Kim y col. (2012b) arrojaron luz sobre estas dos posturas antepuestas, mostrando que en *D. caudata*, a medida que se produce el secuestro de los plástidos de *M. rubrum*, éstos sufren una importante modificación en su estructura, observándose una vez finalizado el proceso la característica forma estrellada típica de *Dinophysis*.

Aunque *M. rubrum* es el único ciliado que se ha utilizado en los cultivos de *Dinophysis*, se han detectado la presencia de plástidos polimórficos en células *Dinophysis* de muestras de campo (Hackett y col., 2003; Qiu y col., 2011; Kim y col., 2012a), lo que sugiere que además de *M. rubrum*, *Dinophysis* spp. puede alimentarse de otros ciliados que poseen diferentes tipos de plástidos en su interior.



Alrededor de 100 especies de dinoflagelados fotótrofos y heterótrofos han sido asignados al género *Dinophysis*. La identificación de las diferentes especies de este género se basan principalmente, en sus diferencias morfológicas sin embargo estas microalgas poseen ciclos de vida muy complejos y polimórficos lo que complica su identificación especialmente en el caso de que dos especies muy cercanas con diferente perfil de toxinas y toxicidad co-existan en el mismo lugar y en el mismo tiempo. Por ello la identificación y caracterización definitiva de las diferentes especies de *Dinophysis*, proporcionaría una herramienta sumamente útil para la detección de estos microorganismos en las labores de monitoreo lo que supondría un avance en las predicciones y sistemas de control de proliferaciones tóxicas.

El establecimiento de cultivos en laboratorio por Park y col., en el 2006 estableciendo una línea presa-predador está permitiendo iniciar diversos estudios genéticos y fisiológicos de estos organismos. La línea *Dinophysis-Mesodinium-Teleaulax* está bien establecida aunque otras posibles están siendo estudiadas por su potencial impacto sobre el control de las poblaciones de *Dinophysis* en medios naturales. La existencia de cadenas tróficas alternativas, podría venir determinada por marcadores superficiales de los distintos eslabones de la cadena como se ha demostrado en otros organismos, y cuyo estudio no se ha abordado hasta el momento en el caso de este género.

Actualmente existe una controversia sobre el origen de los plástidos de *Dinophysis* si son permanentes o por el contrario necesita adquirirlos de sus presas. La posibilidad de obtener cultivos de laboratorio tanto del dinoflagelado como de sus presas puede permitir analizar el flujo de los plástidos entre los distintos miembros de la cadena trófica.

A la vista de los antecedentes expuestos los principales objetivos planteados en esta tesis doctoral han sido los siguientes:

- 1.- Determinación de la capacidad discriminatoria entre especies del género *Dinophysis* de diversos marcadores moleculares incluyendo varias regiones de los operones de rRNA, y los genes mitocondriales *cox1* y *cob*.
- 2.- Clarificación, utilizando una aproximación molecular, del origen permanente o transitorio de los plástidos de *Dinophysis acuta* mediante el estudio de la transferencia de plástidos en la cadena trófica en cultivos de laboratorio.
- 3.- Determinación de carbohidratos presentes en la superficie celular y en diferentes estadios del ciclo de vida, como posibles marcadores específicos de especies de *Dinophysis* con distinto origen geográfico, mediante el uso de lectinas.
- 4.- Análisis de posibles factores de reconocimiento presa-predador en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica de *Dinophysis*.



3.1 Reactivos

Tabla 2. Reactivos utilizados y casa comercial de procedencia

Reactivo	Casa comercial
φ29-HindIII DNA	CBMSO
α-L-fucosa	SIGMA
α-D-metil-manosa	SIGMA
Agar bacteriológico	PRONADISA
Agarosa	SIGMA
Agua de mar artificial	TROPIC MARIN
Ampicilina	ROCHE
Bacto-triptona	DIFCO
Bromuro de etidio	SIGMA
Calcofluor	SIGMA
Cebadores	ISOGEN
Cloruro de magnesio	SIGMA
Cloruro de potasio	SIGMA
Cloruro de sodio	MERCK
dNTPs	AMERSHAM BIOSCIENCES
Dodecil sulfato sódico (SDS)	MERCK
EDTA	MERCK
Etanol	MERCK
Extracto de levadura	DIFCO
Formamida	AMERSHAM BIOSCIENCES
Fosfato ácido disódico	SIGMA
Fosfato de potasio monobásico	SIGMA
Ioduro de propidio	INVITROGEN
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	SIGMA
Lectina ConA	SIGMA
Lectina DBA	SIGMA
Lectina UEA	SIGMA
Lectina WGA	SIGMA
Metanol	MERCK
N-acetil-α-D-galactosamina	SIGMA
N-acetil-β-D-glucosamina	SIGMA
Peptona	PANREAC
pGEM-T Easy Vectors	PROMEGA
Poli-L-lisina	SIGMA
Polietilenglicol 6000	SIGMA
Prolong Gold	INVITROGEN
Proteinasa K	SIGMA
Taq-polimerasa	ROCHE



Triptona	DIFCO
Tris-Trizma base	SIGMA
Tritiplex III (EDTA)	MERCK
Vitamina B12	MERCK
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosido)	SIGMA

3.2 Microorganismos utilizados

Tabla 3: Resumen de los organismos utilizados provenientes de cultivos y de muestras naturales

Organismo	Año	Procedencia	Aislador
Organismos en cultivos			
<i>Alexandrium minutum</i> AMAD06 (CS-323/6)		Port River, Australia	S. Blackburn
<i>Teleaulax amphioxeia</i> Hill (AND-A0710)	2008	Huelva	D. Jaen
<i>Mesodinium rubrum</i> (AND-A0711)	2008	Huelva	D. Jaen
<i>Falcomonas</i> sp. (CRY1V)	2008	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	P. Rial
<i>Hemiselmis</i> sp. (CRY6V)	2008	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	P. Rial
<i>Teleaulax gracilis</i> (Cr6EHU)	2005	Río Nervioi-Ibaizabal (Bahía de Vizcaya)	Aitor Laza-Martínez
<i>Dinophysis tripos</i> Gourret (VGO1062)	2009	Ría de Vigo, (42 ° 21,40 'N 8 ° 46,42' W)	F. Rodríguez
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent (VGO1064)	2010	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	F. Rodríguez
<i>Dinophysis sacculus</i> Stein (VGO1132)	2012	Ría de Ares-Betanzos (43 ° 19,40 'N, 8 ° 12,37' W)	F. Rodríguez
<i>Dinophysis acuta</i> Ehrenberg (VGO1065)	2010	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	F. Rodríguez
<i>Dinophysis acuta</i> Ehrenberg (AND-A0816)	2008	Huelva	D. Jaen
<i>Dinophysis fortii</i> Pavillard		Huelva	D. Jaen
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent		Huelva	D. Jaen
Organismos obtenidos de muestras naturales			
<i>Dinophysis ovum</i> Schütt	2007	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-
<i>Dinophysis skagii</i> Paulsen	2006	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparede & Lachmann	2006	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-



<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent	2007	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-
<i>Dinophysis acuta</i> Ehrenberg	2008	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-
<i>Dinophysis tripos</i> Gourret	2007	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	-
<i>Dinophysis sacculus</i> Stein	2007	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	
<i>Dinophysis rotundata</i>	2008	Ría de Pontevedra, (42 ° 8,22 'N, 8 ° 51,36' W)	

3.2.1 Microalgas

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron las microalgas que se resumen en la tabla 3.

Las microalgas procedentes de Huelva fueron aisladas dentro del Programa de Monitoreo de Andalucía para el control de las condiciones sanitarias en áreas de producción de mariscos que se realiza semanalmente. Las procedentes de las rías de Galicia fueron obtenidas en el transcurso del programa de monitoreo del Centro Oceanográfico de Vigo perteneciente al Instituto Español de Oceanografía (IEO) y *Teleaulax gracilis* (Cr6EHU) fue aislada de un muestreo en la bahía de El Abra en Bilbao (Vizcaya) por el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco, España.

Las especies de *Dinophysis* y *Phalacroma* que se utilizaron inicialmente en los diferentes ensayos provenían de muestras naturales recogidas por los programas de monitoreo del Centro Oceanográfico de Vigo durante las esporádicas floraciones algales de las diferentes especies. En estos casos la toma de muestras se llevó a cabo con la ayuda de una bomba sumergible con la que se tomaron muestras desde los 3 a los 5 metros de profundidad durante 10 minutos. El agua de mar obtenida se pasó a través de una serie de mallas superpuestas de diferentes tamaños de poro hasta obtener un concentrado correspondiente a la fracción comprendida entre las 20-77 micras de tamaño que se utilizó para el aislamiento de *Dinophysis* spp. Este se diluyó con agua de mar en botellas de 5 l de modo que el material de plancton se mantuvo fresco y vivo durante el transporte desde el barco al laboratorio donde se procesaron las muestras dividiéndose en alícuotas que se usaron tanto para el aislamiento de células individuales de *Dinophysis*, o se filtraron a través de una malla de 20 µm. Lo que quedó retenido en la malla fue resuspendido en metanol o etanol 100% frío con la ayuda de una botella de lavado y se mantuvo en tubos Falcon a -20° C hasta su uso.

A partir del año 2008, los laboratorios del Centro Oceanográfico de Vigo y de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros de Huelva, establecieron cultivos de diferentes especies de *Dinophysis* (Tabla 2) y se comenzó a utilizar células provenientes de cultivos en vez de muestras naturales.



3.2.2. Bacterias

A lo largo de esta tesis se utilizó la bacteria competente *Escherichia coli* DH5 α obtenida del servicio de fermentación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en todos los estudios de clonación de fragmentos de DNA.

3.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

3.3.1. Microalgas

Las microalgas fueron cultivadas en medio L1 sin silicatos (Guillard y Hargraves, 1993) a 32 ups (Unidades Prácticas de Salinidad), con un ciclo luz: oscuridad 12:12 a 150 μmol fotones m^2s^{-1} de irradiación, en matraces de cristal de 100 ml.

Cultivos independientes del ciliado *Mesodinium rubrum* se establecieron agregando criptofitas como presas periódicamente cada 5 ó 6 días, manteniendo una relación criptofita:*M. rubrum* de 5:1 (Myung y col., 2011).

De manera similar, los cultivos de *Dinophysis* spp. se realizaron añadiendo al medio L1 el ciliado *M. rubrum* dos veces por semana en una relación presa:predador de 10:1. En este cultivo el ciliado cumple la función de presa, ya que al ser *Dinophysis* de naturaleza mixotrófica necesita alimentarse periódicamente para su crecimiento (Park y col., 2006).

En la tabla 4 se resumen los cultivos realizados así como las presas utilizadas para alimentar los cultivos de los ciliados y dinoflagelados.

Tabla 4: cultivos realizados

	Microalga	Presa	Nombre cultivo
Criptofitas	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	–	AND-A0710
	<i>Teleaulax gracilis</i>	–	Cr6EHU
	<i>Hemiselmis</i> sp.	–	CRY6V
	<i>Falcomonas</i> sp.	–	CRY1V
Ciliados	<i>Mesodinium rubrum</i>	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	MT
	<i>Mesodinium rubrum</i>	<i>Teleaulax gracilis</i>	MG
	<i>Mesodinium rubrum</i>	<i>Hemiselmis</i> sp.	MCRY6V
	<i>Mesodinium rubrum</i>	<i>Falcomonas</i> sp.	MCRY1V
Dinoflagelad os	<i>Dinophysis acuta</i> (Huelva)	MT	DMT
	<i>Dinophysis acuta</i> (Huelva)	MG	DMG
	<i>Dinophysis acuta</i> (Huelva)	MCRY6V	DMCRY6V



<i>Dinophysis acuta</i> (Huelva)	MCRY1V	DMCRY1V
<i>Dinophysis caudata</i> (Huelva)	MT	–
<i>Dinophysis ovum</i> (Huelva)	MT	–
<i>Dinophysis fortii</i> (Huelva)	MT	–
<i>Dinophysis tripos</i> (Vigo)	MT	(VGO1062)
<i>Dinophysis acuminata</i> (Vigo)	MT	–
<i>Dinophysis acuta</i> (Vigo)	MT	–
<i>Dinophysis caudata</i> (Vigo)	MT	(VGO1064)
<i>Dinophysis sacculus</i> (Vigo)	MT	(VGO1132)
<i>Alexandrium minutum</i>	–	AMAD06

Los cultivos de microalgas fueron mantenidos en los laboratorios de Huelva y Vigo. Para su transporte a Madrid, se fijaron previamente en etanol o metanol 100% y se mantuvieron a -20° C hasta su uso. En otros casos nos desplazamos al lugar donde se realizaban los cultivos para llevar a cabo los experimentos con muestras frescas.

3.3.2. Bacterias

El crecimiento de bacterias recombinantes en medio sólido se realizó en medio LB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5g/l y agar bacteriológico 1,5% (p/v)) suplementado con ampicilina (concentración final 100 µg/ml), que fue añadida al medio LB estéril a 50° C. La selección de recombinantes por actividad β-galactosidasa fue realizada añadiendo al medio X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) a una concentración final de 40 µg/ml y IPTG 100mM por placa.

3.3.3. Micromanipulación de las microalgas

Células individuales de *Dinophysis*, ya fueran provenientes de cultivos o de muestras naturales, se aislaron con una pipeta microcapilar en un microscopio invertido (Axiovert 200, Zeiss) a un aumento de 50X y 100X. Las células se transfirieron 2 ó 3 veces a agua de mar estéril y finalmente se lavaron en solución tampón de fosfato 1X (PBS: 3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4).

El aislamiento de células de *M. rubrum*, debido a su gran fragilidad y con el fin de prevenir la lisis celular provocada por cambios osmóticos, se realizó mezclando un volumen de cultivo celular con el mismo volumen de tampón PBS 1X y luego se procedió a su aislamiento.



En el caso de que las células estuvieran conservadas en metanol o etanol, la muestra fue centrifugada (Mikro 120 Hettich Zentrifugen) a 5000 rpm y resuspendida en 1X PBS. Luego se procedió al aislamiento célula a célula como se ha descrito anteriormente.

3.4 Métodos de Biología Molecular

3.4.1. Extracción de DNA de células de microalgas aisladas para amplificación por PCR

Las células aisladas mediante micromanipulación fueron transferidas a tubos eppendorf de 200 μ l conteniendo 5 μ l de buffer de lisis (0.005% SDS con 400 μ l⁻¹ Proteinasa K).

La mezcla se sometió a un choque térmico durante media hora a -80°C y a continuación otra media hora a 60°C. Finalmente las muestras se incubaron 10 min a 95°C para inactivar la proteinasa K (Kai y col., 2006).

El DNA extraído se utilizó para la amplificación mediante PCR de los diferentes genes estudiados.

3.4.2. Amplificación de regiones específicas del DNA mediante PCR

La evaluación de la eficacia de los marcadores moleculares de *Dinophysis* spp. se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación de los genes de 18S rRNA, la región D8 a D11 del 28S rRNA y la región ITS, así como de aquellos genes que codifican para la citocromo oxidasa 1 mitocondrial (*cox1*) y citocromo b mitocondrial (*cob*).

El estudio del origen de los plástidos de *Dinophysis acuta* se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación de los genes de 18S rRNA y del gen codificante para la proteína D1 del fotosistema 2 (*psbA*).

Los cebadores utilizados han sido previamente publicados y se especifican en la tabla 5.

Tabla 5: cebadores utilizados

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Referencia
Dino18SF1	AAGGGTTGTGTTYATTAGNTACARAAC	(Lin y col., 2006a)
Dino18SR1	GAGCCAGATRCDCACCCA	(Lin y col., 2006a)
FD8	GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG	(Chinain y col., 1999)
RB	GATAGGAAGAGCCGACATCGA	(Chinain y col., 1999)
ITSA2	CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGGHTCCGTAGGT	(Adachi y col., 1994)
ITSB2	CCTGCAGTCGACANAATGCTTAANTTCAGC(AG)GG	(Adachi y col., 1994)
Dlnocox1F	AAAAATTGTAATCATAAACGCTTAGG	(Zhang y col., 2008)



Dinocox1R	TGTTGAGCCACCTATAGTAAACATTA	(Zhang y col., 2008)
Dinocob1F	ATGAAATCTCATTACAWWCATATCCTTGTC	(Zhang y col., 2008)
Dinocob1R	TCTCTTGAGGKAATTGWKMACCTATCCA	(Zhang y col., 2008)
18ScomF1	GCTTGCTCAAAGATTAAGCCATGC	(Zhang y col., 2008)
18ScomR1	CACCTACGG AACCTTGTTACGAC	(Zhang y col., 2008)
psbAF	ATGACTGCTACTTTAGAAAGACG	(Hackett y col., 2003)
psbAR2	TCATGCATWACTTCCATACCT	(Hackett y col., 2003)
SP6	AAGATATCACAGTGGATTTA	kit pGEM-T & pGEM-T Easy Vector (Promega)
T7	ATTATGCTGAGTGATATCCC	
*Código de degeneración de nucleótidos según IUPAC: M=A,C, N=A,C,G,T, Y=T,C H=A,C,T W=A,T K=G,T		

Para la amplificación por PCR de los fragmentos del 28S rRNA se utilizó la pareja de cebadores FD8/RB. Para el gen 18S rRNA se utilizó la pareja Dino18SF1/Dino18SR1. Los pares ITSA2/ITSB2 se utilizaron para amplificar las regiones intergénicas ITS1-5,8S rRNA-ITS2. Las amplificaciones del gen *cox1* mitocondrial se realizó utilizando los cebadores Dinocox1F y Dinocox1R, mientras que para las amplificaciones del gen mitocondrial *cob* se utilizaron los cebadores Dinocob1F y Dinocob1R. La adscripción filogenética de las criptofitas utilizadas para el seguimiento de los cloroplastos en *D. acuta* se llevó a cabo con el par de cebadores 18ScomF1 y 18ScomR1. La amplificación del gen *psbA* de cloroplastos tanto en *D. acuta*, *M. rubrum* y las criptofitas, se realizó con los cebadores psbAF y psbA2R. La amplificación por PCR de todos los genes clonados en el vector de transformación pGEM-T Easy Vector se realizó con los cebadores generales SP6 y T7.

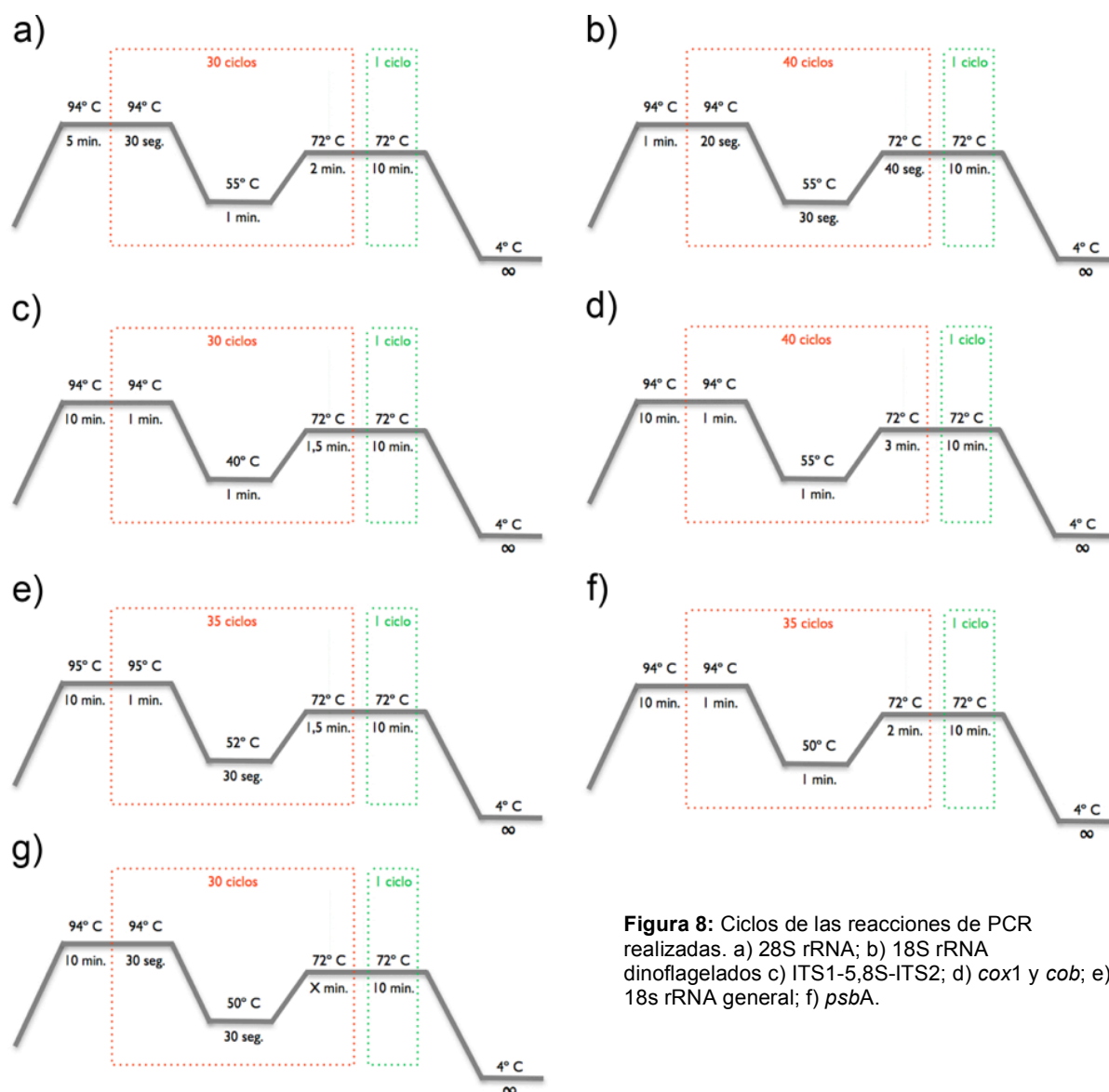
Los programas de amplificación utilizados según los cebadores utilizados fueron los indicados en la figura 7.

Las reacciones de amplificación contenían: en 50 µl de volumen final 5 µl DNA, 1x Tampón de PCR; 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador correspondiente y 1,5 U de Taq DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador 2720 (Applied Biosystems, EEUU) para llevar a cabo el proceso.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM) y visualizados por tinción con bromuro de etidio (10 µg/ml) con lámpara de UV.

3.4.3. Clonación de los productos de PCR

A partir de los productos de amplificación obtenidos se llevó a cabo la reacción de ligación empleando el kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) siguiendo las condiciones de la casa comercial. Con el DNA ligado se transformaron células competentes *E. coli* DH5α.



Todas las colonias blancas fueron picadas y los fragmentos de DNA clonados se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores universales SP6 y T7 con las condiciones anteriormente descritas.

Los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa 1% y el DNA amplificado fue purificado antes de ser enviado para su secuenciación.

3.4.4. Purificación y secuenciación de DNA

Los productos de la amplificación de los insertos se purificaron antes de su secuenciación. Para ello, se agregó en proporción 1:1 una solución de purificación (Polietilenglicol 6000 20% p/v, NaCl 2,5 M) y se incubaron a 37° C durante 30 minutos, agitando con vortex cada 10 minutos. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm (Mikro 120 Hettich Zentrifugen) por 30



minutos. Se eliminó el sobrenadante y los precipitados se lavaron dos veces con etanol frío al 80%, centrifugando 15 minutos a 14000 rpm cada vez. Finalmente, los precipitados se secaron en estufa a 37° C y se resuspendieron en 15 µl de agua MQ estéril, dejando el DNA preparado para su secuenciación.

Los productos de la purificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%, comprobándose la concentración de DNA en las preparaciones midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

La secuenciación se llevó a cabo por la empresa Macrogen Europe (Ámsterdam, Holanda) utilizando el secuenciador automatizado Applied Biosystem ABI3730XL (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) junto al ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI).

3.4.5. Análisis de las secuencias

3.4.5.1. Ensamblaje y alineamiento

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas utilizando el programa DNABaser Ver. 3.0 (Heracle BioSoft S.R.L., Rumania) y posteriormente se compararon con las ya existentes en la base de datos EMBL-GenBank usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, (Altschul y col., 1990), National Center For Biotechnology Information; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin identificar secuencias conocidas con alta similitud.

Las secuencias obtenidas en el proceso de clonación junto con las seleccionadas de la base de datos fueron alineadas con el programa informático CLUSTAL X (Thompson y col., 1997) y posteriormente editadas con el fin de obtener un conjunto de datos homogéneo necesario para el análisis filogenético.

3.4.5.2. Análisis filogenéticos

Para el análisis filogenético de las secuencias obtenidas, a partir de cada alineamiento primero se calcularon los modelos de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaran a la matriz de datos con el programa informático jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). El mejor modelo de evolución de secuencias para cada alineamiento se seleccionó por el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Los modelos seleccionados para cada alineamiento, así como la longitud de los mismos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de la longitud de los alineamientos realizados y los modelos de sustitución de nucleótidos seleccionados

Árbol Filogenético	Modelo de sustitución	pb
18S	TrNef+I	417
28S	TIM2+I+G	767



ITS	TIM2+G	547
<i>cox1</i>	GTR+I	389
<i>cob</i>	TVM+I+G	843
18S Criptofitas	TIM2+I+G	1662
<i>psbA</i>	GTR+G	795

La inferencia de los árboles filogenéticos se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud con el programa informático PAUP * 4.0 (ver. 4.0b10) (Swofford, 2003) utilizando los modelos de sustitución previamente determinados.

Este método calcula para cada uno de los posibles árboles la probabilidad de que a partir de ese árbol se puedan reconstruir los datos observados. Esa probabilidad se denomina verosimilitud. De los árboles posibles, se selecciona el que presenta una mayor verosimilitud.

Finalmente, se realizó para todos los árboles un análisis de confianza estadística para cada rama mediante Bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Esta técnica, mediante una reordenación al azar de los datos originales, genera una serie de árboles-réplica y calcula el porcentaje de conservación de cada una de las ramas del árbol original a lo largo de los diferentes árboles-réplica. De esta forma establece el índice de Bootstrap de cada rama del árbol original. Los valores de Bootstrap superiores al 50% se muestran en el interior de las ramas de cada árbol.

3.5 Estudio del origen de los cloroplastos en *Dinophysis acuta*

3.5.1. Adscripción filogenética de las criptofitas

A partir de los cultivos de las criptofitas *Teleaulax amphioxeia*, *T. gracilis*, *Hemiselmis* sp. y *Falcomonas* sp., se procedió a determinar su adscripción filogenética utilizando el gen 18S rRNA.

Para la extracción del DNA, entre 20 y 50 células de cada criptofita fueron transferidas a tubos Eppendorf de 200 µl conteniendo 5 µl de tampón de lisis, los cuales fueron tratados como se describe en el apartado 3.4.1.

Para la amplificación del gen por PCR se utilizaron los cebadores universales 18ScomF1 y 18ScomR1 como se detalla en el apartado 3.4.2.

Los productos de PCR obtenidos se clonaron, se amplificaron por PCR, se purificaron y se secuenciaron como se especifica en los apartados 3.4.3 y 3.4.4.

De las secuencias obtenidas se realizó el análisis filogenético como se detalla en apartado 3.4.5.

3.5.2. Establecimiento de cultivos de *Mesodinium rubrum*



Un cultivo de *M. rubrum* cultivado con *T. amphioxeia*, se mantuvo sin añadir nuevas presas durante más de dos semanas para asegurar la eliminación de células de la criptofita en el medio de cultivo. Una vez que el cultivo estuvo libre de células criptofitas, se establecieron cuatro cultivos individuales a partir de éste. En cada uno, *M. rubrum* fue alimentado con células de *T. amphioxeia*, *T. gracilis*, *Falcomonas* sp. o *Hemiselmis* sp. como presas. Estos cultivos fueron nombrados MT, MG, MCRY1V y MCRY6V respectivamente (Tabla 3). Los nuevos cultivos se alimentaron con las correspondientes criptofitas durante más de tres meses para asegurar un completo reemplazo de los cloroplastos, antes de utilizarlos para alimentar cultivos de *D. acuta*. Un esquema de los diferentes cultivos se encuentra representado en la figura 8.

3.5.3. Establecimiento de cultivos de *Dinophysis acuta*

Un cultivo de *D. acuta* AND-A0816 crecido de forma rutinaria con *M. rubrum* alimentado con *T. amphioxeia*, fue privado de cualquier presa ciliado por un período máximo de 3 meses, ya que superado este período los cultivos no retornan del estado de hambruna y mueren. Al tercer mes se procedió a alimentar a *D. acuta* con los cultivos previamente establecidos de *M. rubrum* alimentados con las diferentes criptofitas según se describe en el apartado anterior. Estos cultivos fueron nombrados como DMT, DMG, DMCRY1V y DMCRY6V (Tabla 3, Figura 9).

Como control se mantuvieron cultivos de *D. acuta* correspondientes a DMT y DMCRY1V sin presa por tres meses. Estos cultivos fueron nombrados DMTH y DMCRY1VH2 respectivamente.

La figura 9 muestra una representación esquemática de los cultivos llevados a cabo.

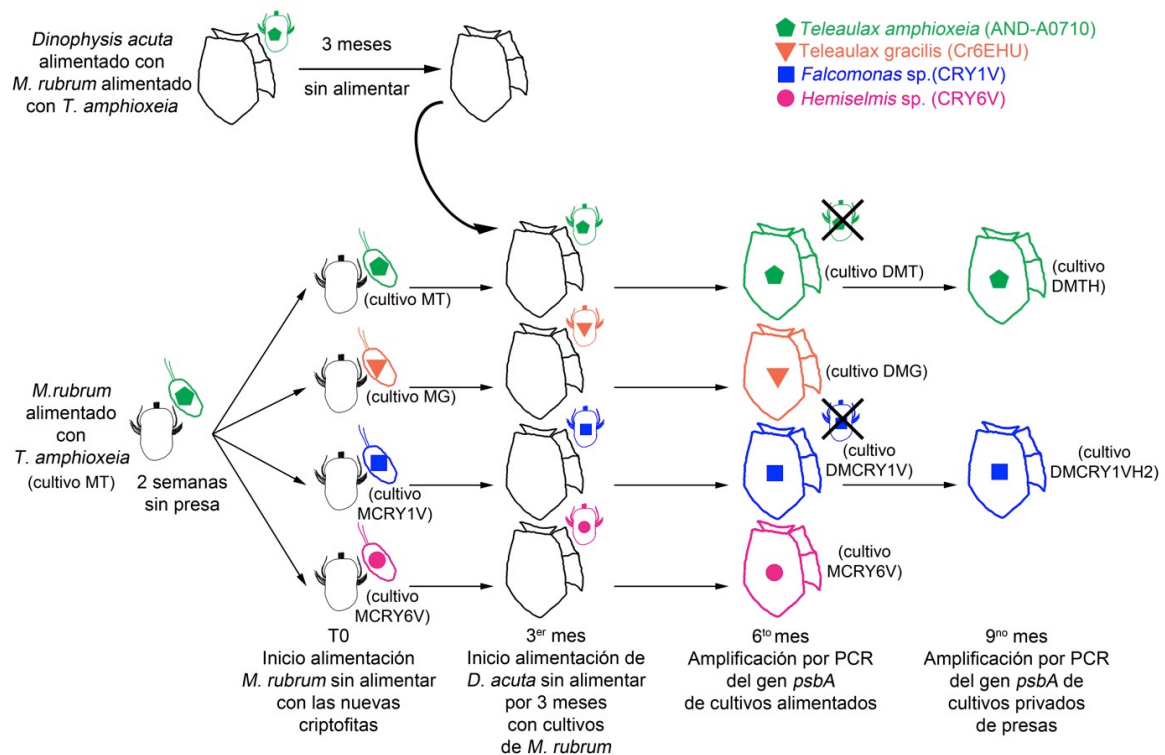


Figura 9. Representación esquemática de los cultivos de *D. acuta*, *M. rubrum* y de las criptofitas realizados. Cada color detalla la línea presa-predador criptofita-*M. rubrum*- *D. acuta*.



3.5.4. Seguimiento del origen de los plástidos por amplificación del gen *psbA*

Para determinar los reemplazos de los diferentes cloroplastos de acuerdo con las criptofitas utilizadas en los experimentos, se fueron tomando muestras de cada uno de los cultivos utilizados a lo largo del experimento. Para ello se cogieron con pipeta de 40 a 50 células de las cuatro criptofitas y células individuales de *D. acuta* y *M. rubrum* que fueron aisladas una a una por micromanipulación como se detalla en el apartado 3.4.1.

Las células se transfirieron a tubos Eppendorf de 200 µl con buffer de lisis según se especifica en el apartado 3.4.1 con objeto de extraer el DNA de las células que posteriormente se utilizó como molde para amplificar el gen plastidial *psbA* utilizando los cebadores *psbAF* y *psbAR2* como se detalla en el apartado 3.4.2.

Los productos de amplificación con tamaños de 928 pb se clonaron y secuenciaron como se especifica en los apartados 3.4.3 y 3.4.4.

A partir de las secuencias obtenidas se construyeron árboles filogenéticos con la metodología detallada en el apartado 3.4.5.

3.6 Determinación de la composición de carbohidratos en la superficie de *Dinophysis* spp.

3.6.1. Microalgas utilizadas

Se han caracterizado los carbohidratos presentes en la superficie celular tanto de células intermedias, en diferentes estadios iniciales del ciclo de vida, como vegetativas de diferentes especies de *Dinophysis* procedentes de cultivos de *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii* y *D. ovum* (Huelva) y *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. tripos* (ría de Vigo), así como de la presa de *Dinophysis*, *M. rubrum* y de la criptofita *T. amphioxeia*, presa del ciliado.

Dado que el rendimiento de células de los cultivos de *Dinophysis* establecidos hasta la fecha no son altos, la metodología se puso a punto con cultivos del dinoflagelado *Alexandrium minutum* cepa Halim, con los que el número de células no era limitante.

Estos experimentos se realizaron tanto con muestras de células vivas como fijadas previamente en metanol o etanol 100% para determinar una posible interferencia o modificación de algún componente de la pared celular que impidiera la unión a la lectina.

A su vez, se determinó la especificidad de la unión de las lectinas a los carbohidratos expuestos en la superficie celular utilizando como modelo células en cultivo de *D. acuminata* aislado de Huelva (ver apartado 3.6.3).



3.6.2. Marcaje de las células con lectinas conjugadas a FITC

Se han utilizado lectinas con diferentes especificidades, marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Tabla 6).

Tabla 6. Lectinas utilizadas y sus hidratos de carbono de reconocimiento específico. Las lectinas están marcadas fluorescentemente con FITC.

Lectina	Abreviación	Especificidad
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	α -D-metil-manosa, α -D-metil-glucosa
<i>Ulex europaeus</i>	UEA	α -L-fucosa
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	N-acetil- β -D-glucosamina, ácido sialico.
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	N-acetil- α -D-galactosamina

Para el marcaje, las células se sedimentaron por centrifugación a 3200g durante 5 min (Mikro 120 Hettich Zentrifugen) y se resuspendieron en 50 μ l de agua de mar artificial cuando se trabajó con células vivas para mantenerlas en un medio compatible. Cuando las células a marcar se hallaban conservadas en etanol 100%, éstas fueron previamente lavadas dos veces con PBS 1X y sedimentadas por centrifugación a 3200g durante 5 min. Posteriormente se resuspendieron, igualmente, en agua de mar artificial.

Para que las células se adhirieran al soporte y no se despegaran durante el proceso de marcaje, se utilizaron cubreobjetos circulares de cristal de 1 cm de diámetro que se incubaron previamente en una solución de poli-L-lisina (5,6 ml agua MILLI-Q estéril, 700 μ l PBS 1X y 1400 μ l poli-L-lisina 0,01% v/v) manteniéndose a 37° C durante toda la noche, tras lo cual se lavaron dos veces con PBS 1X y se dejaron secar dos horas en campana de flujo laminar.

Para realizar el marcaje se introdujo un cubreobjetos tratado con poli-lisina en una placa Petri de 3 cm de diámetro y sobre éste se depositaron 10 μ l de la suspensión de células dejando que decanten durante 1 h a 4° C. Posteriormente se eliminó el exceso de líquido con micropipeta y sobre las células se depositaron 15 μ l de las lectinas a las concentraciones indicadas en la tabla 7. Tratamientos controles se realizaron añadiendo sobre las células 15 μ l de PBS 1X.



Tabla 7. Concentraciones óptimas de las lectinas y sus correspondientes azúcares específicos

Lectina	Concentración	Carbohidrato	Concentración (mM)
Con A	50 µg/ml	α-manosa	100 mM
UEA	100 µg/ml	α-L-fucosa	250 mM
WGA	50 µg/ml	N-acetilglucosamina	500 mM
DBA	50 µg/ml	N-acetilgalactosamina	300 mM

Las muestras tratadas y los controles se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual los soportes fueron lavados con 1 ml de agua de mar estéril.

Con el objetivo de observar de forma más precisa la localización de los marcajes, se recurrió al uso del calcoflúor y el yoduro de propidio. El primero tiñe las tecas de los dinoflagelados por unión a la celulosa, mientras que el segundo se intercala en el DNA. Para ello, 15 µl de una solución con 100 µg/ml de calcoflúor y 1.5 µM de yoduro de propidio se depositaron sobre las células durante 7 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, las células se lavaron con PBS 1X y se montaron sobre portaobjetos con una gota de Prolong Gold con el fin de minimizar el fotoblanqueo y preservar las señales fluorescentes debidas a los marcajes, así como conservar las preparaciones para el almacenamiento y análisis a largo plazo. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas en oscuridad antes de ser observadas con microscopía confocal (ver apartado 3.6.4).

3.6.3. Ensayo de la especificidad de la unión lectina-FITC

Para determinar la especificidad de la unión de las lectinas a los carbohidratos expuestos en la superficie celular de los dinoflagelados, se incubaron células de *Dinophysis acuminata* aislado de Huelva con los carbohidratos específicos para cada una de ellas, de manera que actuaran como inhibidores competitivos en la unión. Las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente con concentraciones crecientes de α-manosa, α-L-fucosa, β-GlcNAc o α-GalNAc. Luego de la incubación se procedió a la marcación con las lectinas según se describe en el apartado anterior.

3.6.4. Microscopía Láser Confocal (CLSM; Confocal Laser Scanning Microscopy)

La detección de los residuos de carbohidratos presentes en la superficie de los dinoflagelados a través la utilización de lectinas-FITC fue evaluada mediante microscopía laser confocal (Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP5; Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM, Facultad de Medicina). Las muestras se visualizaron con los objetivos 40X y 63X. Los fluorocromos utilizados y sus respectivas longitudes de onda de emisión y absorción se reflejan a continuación en la tabla 8.

**Tabla 8.** Fluorocromos utilizados.

Fluorocromo	Longitud de onda		Color
	Excitación (nm)	Emisión (nm)	
FITC	495	520	Verde
Calcoflúor	380	470	Azul
Ioduro de propidio	535	617	Rojo

3.6.5. Posibles factores de reconocimiento en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica.

Una vez identificados los carbohidratos presentes en la superficie celular de *M. rubrum*, presa de *Dinophysis* y de *T. amphioxeia*, presa del ciliado, se diseñaron diferentes experimentos para corroborar la función de estos carbohidratos en el reconocimiento específico presa-predador mediado por lectinas.

Con este fin, cultivos de *D. acuta* VGO1065 fueron crecidos en matraces de 50 ml con el agregado de *M. rubrum* como presa en una proporción 1:10 como se describe en el apartado 3.3.1.

Con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de carbohidratos diana de lectinas que pudieran estar involucrados en el reconocimiento entre estos dos organismos, 5 ml de medio L1 conteniendo 60 células de *D. acuta* y 1500 de *M. rubrum* se incubaron en placas de 24 pocillos con el agregado de los carbohidratos α -manosa, α -L-fucosa y α -GalNAc a una concentración final de 20 μ M y 300 μ M.

A los tres días se cuantificaron las células de *M. rubrum* y *D. acuta* presentes por cuantificación en cámara Sedgewick Rafter.



4.1 Búsqueda de marcadores moleculares específicos para *Dinophysis* spp.

Los primeros estudios realizados en esta tesis se realizaron con muestras naturales que fueron recolectadas durante las labores rutinarias de monitoreo del Centro Oceanográfico de Vigo especialmente cuando aparecían proliferaciones de dinoflagelados y el número de organismos era suficiente para realizar los experimentos propuestos así como para conservar células para su utilización posterior.

En el 2006, Park y col., establecieron en el laboratorio el primer cultivo estable de *D. acuminata* en el que estaban implicados un ciliado, *Mesodinium rubrum*, que se utilizaba de presa del dinoflagelado, el cual a su vez, era alimentado con un alga criptofita, *Teleaulax amphioxeia*. Muchos laboratorios intentaron cultivar diferentes especies de este género siguiendo esta línea presa-predador y algunos tuvieron éxito, de forma que se consiguieron cultivos de: *D. fortii* (Nagai y col., 2008), *D. infundibulus* Schiller (Nishitani y col., 2008b), *D. caudata* (Nishitani y col., 2008a), *D. acuta* (Jaén y col., 2009) y *D. tripos* (Rodríguez y col., 2012).

Los cultivos *in vitro* están facilitado enormemente el inicio de estudios fisiológicos y genéticos con estas especies sin necesidad de la eventualidad de las proliferaciones naturales.

A pesar de todo, su mantenimiento no es sencillo ya que están involucrados tres cultivos independientes y el rendimiento celular suele ser bajo.

La identificación rutinaria de las especies de *Dinophysis* se realiza por observación de su morfología celular, lo que requiere de personal experto que sea capaz de diferenciar las características, muchas veces sutiles, que las identifican (Figura 10). Sin embargo, las especies pueden presentar variaciones debido a su ciclo de vida polimórfico, a su nutrición y a la región geográfica donde se localizan (Reguera y Gonzalez-Gil, 2001), lo que puede generar problemas de identificación en situaciones en las que se requiere que ésta sea precisa, sobre todo cuando especies similares con potenciales toxigénicos diferentes aparecen simultáneamente. Un claro ejemplo de esta situación ocurre con *D. acuminata*. Esta especie es el principal agente causante de los episodios de DSP en las rías gallegas y otros países europeos y muestra un alto grado de variabilidad morfológica entre regiones y estaciones geográficas y su posición taxonómica está en conflicto con la especie cercana *D. sacculus*, de menor toxicidad (Bravo y col., 1995a; Reguera y col., 1996; Zingone y col., 1998; Culverhouse y col., 2003).



Por lo tanto, es de especial interés desarrollar técnicas sencillas, rápidas y fiables que permitan la identificación inequívoca de especies que puedan resultar en un daño a la salud pública y la economía y que pueda ser realizada por personal no experto en aspectos morfológicos. Por ello nuestros estudios se enfocaron en la búsqueda y evaluación de marcadores moleculares que ofrecieran una clara diferenciación entre las diferentes especies de *Dinophysis* y que nos permitiera diseñar sondas o cebadores específicos de grupo para utilizar en experimentos de FISH o PCR respectivamente.

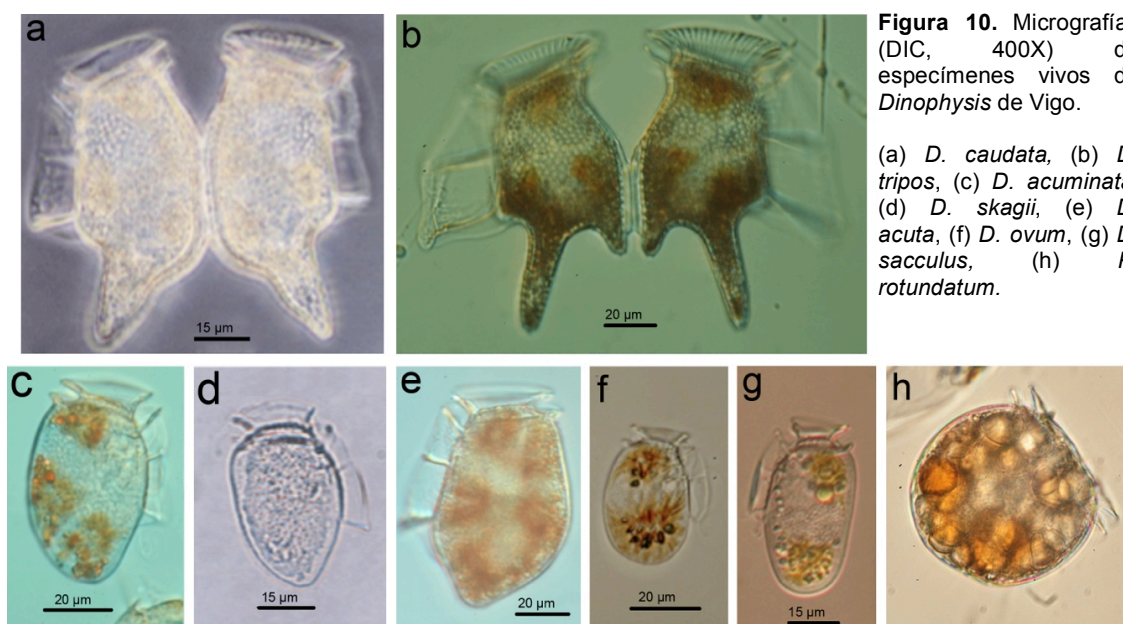


Figura 10. Micrografías (DIC, 400X) de especímenes vivos de *Dinophysis* de Vigo.

(a) *D. caudata*, (b) *D. tripos*, (c) *D. acuminata*, (d) *D. skagii*, (e) *D. acuta*, (f) *D. ovum*, (g) *D. sacculus*, (h) *P. rotundatum*.

El problema principal para diferenciar las especies de este género, desde un punto de vista molecular, es su baja variabilidad genética (Marín y col., 2001; Raho y col., 2008; Qiu y col., 2011) y aunque se han probado un número considerable de genes candidatos que han sido concluyentes en otros géneros, no lo han sido para *Dinophysis* al no observarse un grado de variabilidad de las secuencias suficiente para el diseño de sondas o cebadores específicos de especie.

En este apartado se analizará la eficacia de los marcadores moleculares basados en los genes 18S, 28S y regiones ITS de los operones del rRNA así como los genes mitocondriales *cox1* y *cob* en un total de 8 especies de *Dinophysis* provenientes de las rías de Vigo, que se compararán con otras con otros aislados de diferentes localidades geográficas. Para evaluar la aplicabilidad de estos genes como marcadores moleculares, se realizarán árboles filogenéticos y evaluará la posición de las especies de *Dinophysis* dentro de los árboles.

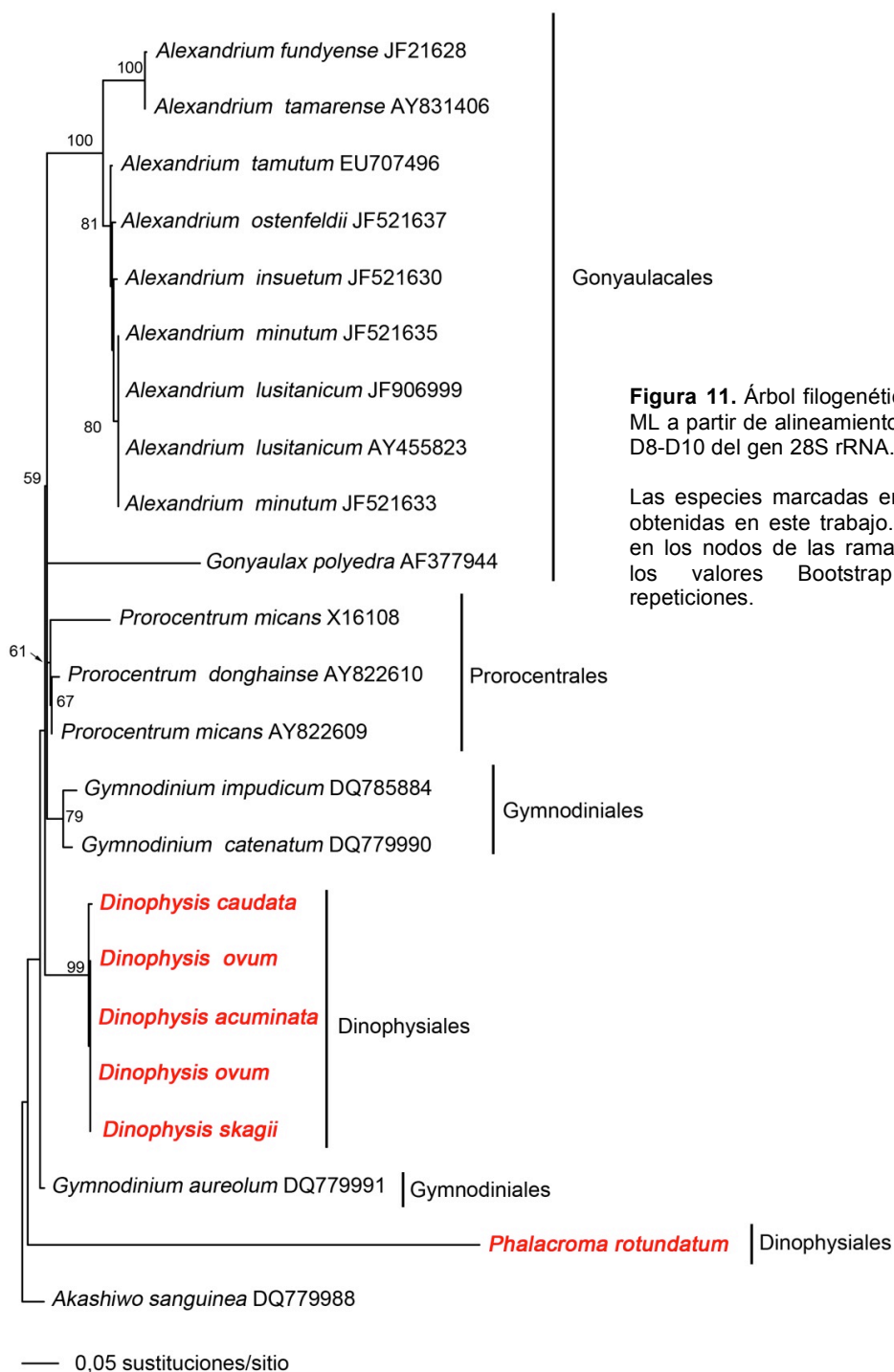
Con el fin de facilitar el seguimiento de los distintos especímenes objeto de estudio y aislados en esta tesis, en cada árbol filogenético, éstos están marcados en rojo.



4.1.1. Análisis del gen 28S rRNA

La región hipervariable D8 a D10 del gen 28S rRNA se amplificó a partir de células de las especies *D. caudata*, *D. ovum*, *D. acuminata*, *D. skagii* y *P. rotundatum* provenientes de muestras naturales.

El árbol filogenético se infirió a partir de un alineamiento de 767 pb de longitud, donde las secuencias obtenidas se compararon con las que se encuentran en la base de datos GenBank. Sin embargo, en esta base de datos no existen depositadas secuencias de la región en estudio para especies de *Dinophysis*, por lo que no fue posible realizar un estudio comparativo con especies de otras localidades.



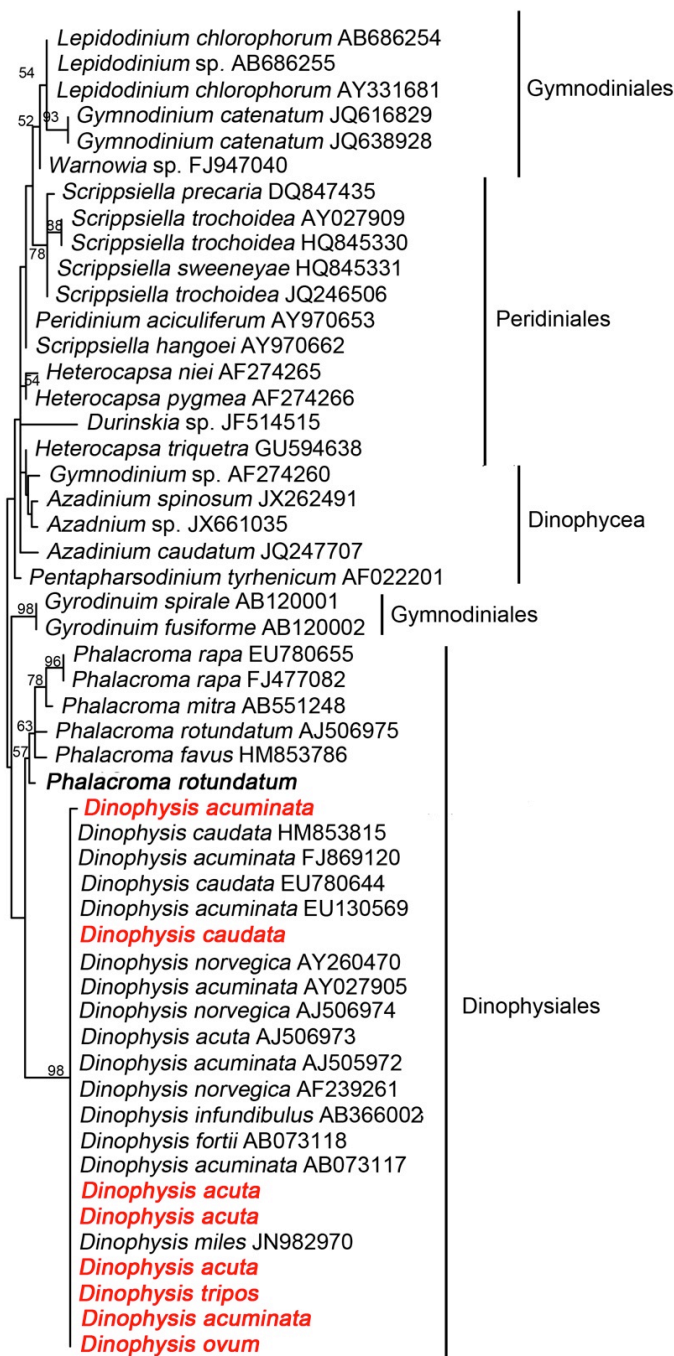


El análisis del árbol filogenético (Figura 11) muestra una clara división de los órdenes de dinoflagelados Gonyaulacales, Prorocentrales y Dinophysiales, mientras que los Gymnodiniales aparecen como un grupo polifilético. En el grupo de los Gonyaulacales, representados por los dinoflagelados del género *Alexandrium* y *Gonyaulax*, se observó una división en dos clados correspondientes a ambos géneros. En el primero se diferencian dos ramas, donde especies diferentes se agrupan juntas con un alto índice Bootstrap del 100%, como es el caso de *A. tamarense* y *A. fundyense*. En la otra rama del grupo se observa un patrón similar, donde las especies *A. tamutum*, *A. ostenfeldii*, *A. insuetum*, *A. minutum* y *A. lusitanicum* forman un grupo monofilético con unas longitudes de rama cortas, indicando una escasa variación en sus secuencias. En el otro clado se encuentra la especie *Gonyaulax polyedra* AF377944, única secuencia para este gen, depositada en el GenBank para este género. Una situación similar se observó en la rama integrada por los Prorocentrales, donde las especies *P. micans* y *P. donghainse* se agrupan juntas con longitudes de ramas muy cortas.

El análisis del grupo de los Dinophysiales mostró que estos se separaron en dos clados, uno formado por las especies del género *Dinophysis*, y otra por *Phalacroma rotundatum*, el cual diverge primero en el árbol. Los especímenes de *Dinophysis* analizados se agrupan en un mismo clado con un fuerte índice Bootstrap del 99%. Dentro de este clado se observó que las longitudes de las ramas, las cuales indican la cantidad de cambios, son prácticamente cero. También se puede observar que especímenes que pertenecen al llamado “complejo *acuminata*”, tales como *D. acuminata*, *D. skagii* y *D. ovum*, se agrupan juntos. Cabe resaltar, siendo la primera vez que se obtienen estos resultados, que la secuencia obtenida de *D. acuminata* se agrupó con *D. skagii*, el cual está reportado ser parte del ciclo de vida de éste (Reguera, 2002b). Estas secuencias se agruparon también con dos clones de *D. ovum* analizados, una especie de menor tamaño. Sin embargo, estas especies aparecen junto a *D. caudata*, especie de mayor tamaño y morfología marcadamente diferente. Al realizar un análisis comparativo entre las secuencias de *D. ovum*, *D. acuminata* y *D. skagii*, éstas resultaron ser idénticas (100% de similitud) y difirieron en tan sólo 3 nucleótidos respecto a la secuencia de *D. caudata* (99,6% similitud). La identificación morfológica de *D. acuminata* es una tarea difícil y en consecuencia fue re-evaluada en varias ocasiones desde su primera descripción por Claparède y Lachmann (1858-1859). En el pasado, se había dividido en varias especies, como *D. acuminata*, *D. boehmii*, *D. borealis*, *D. lachmanii* y *D. skagii*. Debido a su baja incidencia en poblaciones naturales, los trabajos de variabilidad génica de “*D. skagii*” habían sido escasos, si no inexistentes.

4.1.2. Análisis del gen 18S rRNA

El gen 18S rRNA es uno de los marcadores moleculares más utilizados para la adscripción filogenética de especies. Por ello se evaluó la capacidad de este gen para discriminar entre especies de *Dinophysis* provenientes de la ría de Vigo. Las especies analizadas fueron obtenidas de muestras naturales.



- 0,001 sustituciones/sitio

Figura 12. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos de la región D1-D3 del gen 18S rRNA.

Las especies marcadas en rojo son las obtenidas en este trabajo. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 repeticiones.

El árbol filogenético, realizado a partir de alineamientos de 417 pb. de la región D1 a D3 (Figura 12) muestra una división de los dinoflagelados en varios clados terminales bien definidos, a excepción de los Gymnodiniales. Éstos se observaron en dos ramas diferentes, una de ellas como grupo hermano de los Peridinales, y otra representada por *Gymnodinium spirale* y *G. fusiforme*, formando un grupo hermano de los Dinophysiales. Los organismos de este grupo formaron un clado divergente respecto



a los otros dinoflagelados, indicando una separación temprana. El clado se dividió en dos grupos: uno formado por especies del género *Phalacroma*, y otro por especies del género *Dinophysis*. Éste está formado por especies fotótrofas y con morfologías variables de *Dinophysis*, los cuales mostraron un agrupamiento con un fuerte índice Bootstrap del 98% sin ningún tipo de diferenciación. Se observa como especies del “complejo *acuminata*” se agrupan junto a otras especies. Tal es el caso de las grandes células de *D. caudata* o *D. tripos*, con sus marcadas prolongaciones antapicales, que se agruparon junto a células más pequeñas, como *D. acuta*, caracterizadas por una terminación triangular con vértice redondeado, o *D. ovum*, célula ovoide de tamaño aún más pequeño (Figura 10). Tampoco se observó una agrupación de las especies debida a sus localidades de aislamiento y así las especies de *D. acuminata* provenientes de Vigo, de USA (FJ869120 y EU130569), de Sudáfrica (AB073170), de Noruega (AJ506972) o de Japón (AB073117) aparecen juntas en el mismo clado. Cuando se procedió al análisis de las similitudes entre las secuencias se observó un 100% de similitud entre todas las secuencias, a excepción de *D. acuminata* que presentó un 99,8% de identidad con el resto de secuencias.

Al igual que el árbol filogenético inferido del gen 28S rRNA, se puede observar la divergencia de los individuos del género *Phalacroma*. En esta rama se observa que los individuos de *P. rapa*, especie fotosintética, se agruparon juntos. Sin embargo se aprecia que *P. rotundatum* de Vigo diverge antes y no se agrupó junto al otro espécimen de *P. rotundatum* (AJ506975) del fiordo de Oslo (Mar Báltico).

4.1.3. Análisis de las regiones del rRNA ITS1-5,8S rRNA-ITS2

En situaciones donde los marcadores moleculares como el 28S o el 18S rRNA no poseen el poder resolutivo necesario debido a una baja variabilidad, las regiones comprendidas entre los espaciadores ITS1 e ITS2, que incluyen al gen 5,8S rRNA, son utilizadas debido a que son más variables que los otros genes constituyentes del operón del rRNA, lo que las hace especialmente útiles para diferenciar niveles taxonómicos cercanos, así como especies y sus poblaciones (Stern y col., 2012).

Debido a esta propiedad se analizó la capacidad de esta región para resolver la adscripción filogenética de especies de *Dinophysis*.

En el árbol filogenético (Figura 13) se puede observar la presencia de 4 grupos o clados bien definidos. En el primer grupo se observan agrupados los especímenes del género *Phalacroma*, que fueron más divergentes. Dentro de éste, *P. rapa* diverge primero, mientras que el otro está formado por *P. rotundatum* y *Phalacroma* cf. *rotundatum*. En este clado se puede observar que el espécimen aislado de Vigo se ha agrupado con otros de la misma especie provenientes de la bahía de Hiroshima, Japón (EU790657 y EU790658).

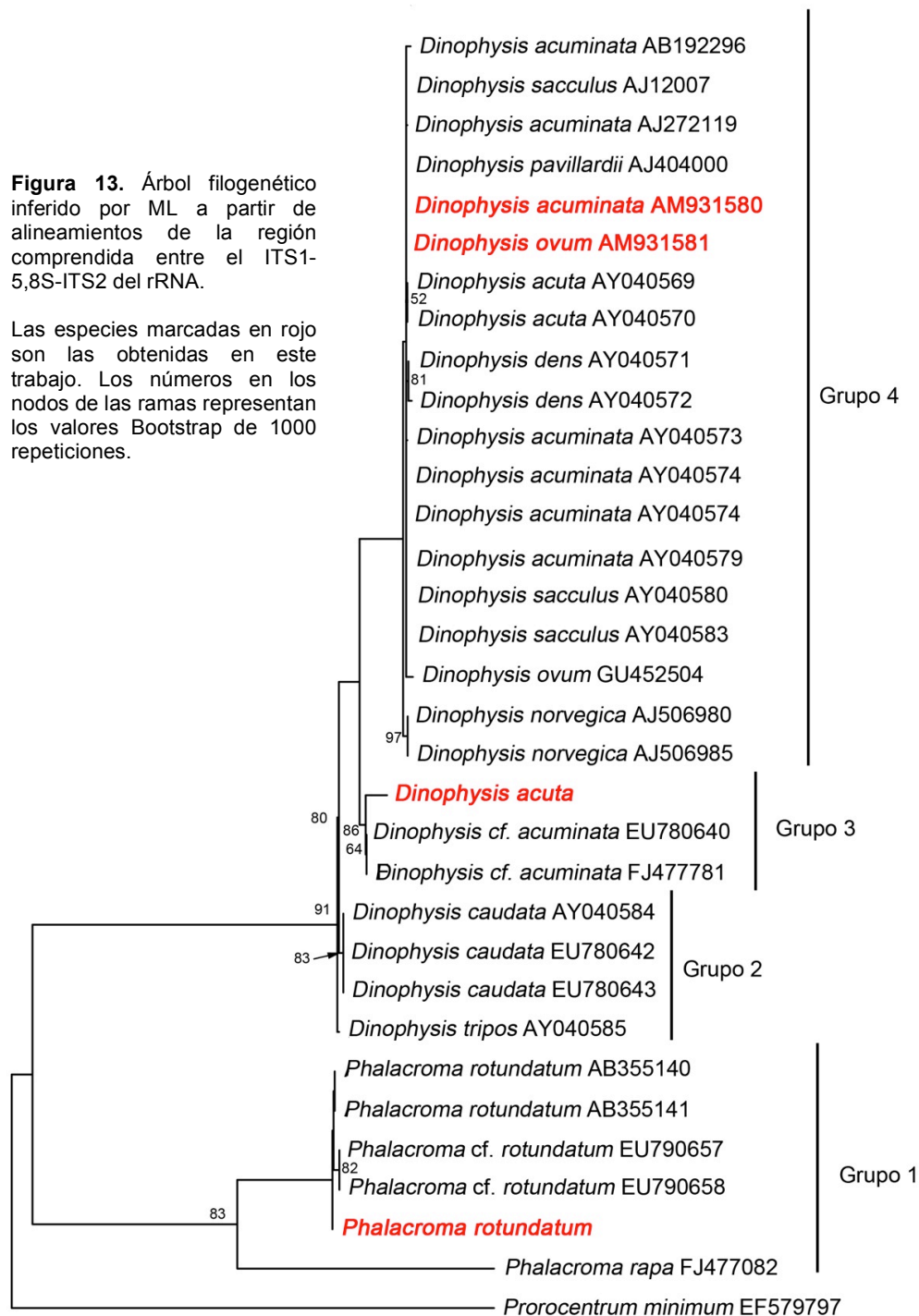
En el grupo 2 se observan las especies de mayor tamaño de *Dinophysis*, *D. caudata* y *D. tripos*. En el grupo 3, el espécimen de *D. acuta* de Vigo se agrupó con aislados de *Dinophysis* cf. *acuminata* provenientes de Florida, USA. En el grupo 4 se observan agrupadas una variedad de diferentes especies *Dinophysis* de menor tamaño, como *D. acuminata*, *D. norvegica*, *D. dens* Pavillard, *D. sacculus*, *D. ovum* y *D. acuta*, y las distancias que se observan son muy pequeñas. En este clado,



dos individuos de *D. norvegica* del fiordo de Oslo, Noruega, divergen primero. El espécimen de *D. acuminata* AM931580 de Vigo se agrupó con otras cepas de *D. acuminata* de Francia, Australia, Japón y Reino Unido (Raho y col., 2008).

Figura 13. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos de la región comprendida entre el ITS1-5,8S-ITS2 del rRNA.

Las especies marcadas en rojo son las obtenidas en este trabajo. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 repeticiones.



— 0,05 sustituciones/sitio



4.1.4. Análisis de la funcionalidad de los genes mitocondriales *cox1* y *cob* como posibles marcadores moleculares en *Dinophysis* spp.

Los genes del DNA mitocondrial (mt) han demostrado ser eficientes a la hora de determinar la adscripción filogenética en especies de animales y hongos (García-Varela y Nadler, 2006; Molitor y col., 2010). Recientemente, los estudios sobre la taxonomía de dinoflagelados se han enfocado en éstos genes ya que su mayor variabilidad los hace buenos candidatos como marcadores moleculares en relaciones filogenéticas cercanas (Lin y col., 2002; Zhang y Lin, 2005; Lin y col., 2009).

Dada la baja variabilidad obtenida con los genes de los operones del rRNA decidimos evaluar los genes mt *cox1* y *cob* con diferentes especies del género *Dinophysis*, siendo los primeros en realizar este tipo de estudios (Raho y col., 2008; Raho y col., 2013).

4.1.4.1. *cox1*

El análisis filogenético basado en secuencias parciales de 389 nucleótidos de longitud del gen mitocondrial *cox1* mostró que los Dinophysiales forman un clado monofilético donde pueden ser identificados 4 grupos o clados (Figura 14). El primer grupo contiene individuos pertenecientes al "complejo *acuminata*", representado aquí por los ejemplares de *D. ovum*, *D. sacculus*, *D. acuminata* y *D. skagii* de Vigo,provenientes de Vigo (especies marcadas en rojo), junto con aislados del Océano Atlántico Norte (EU927466-7), de la bahía de Narraganset, EEUU (EU130566) y del golfo de Thermaikos, Grecia (GU452508). Al comparar la longitud completa de las secuencias (966 a 1191 pb), el aislado de *D. acuminata* de Vigo (AM931582) tenía 17 y 15 diferencias cuando se comparó con *D. ovum* y *D. sacculus* respectivamente, ambos de la misma localidad, pero cuando la comparación se realizó con *D. skagii* no se observaron diferencias. El segundo grupo engloba las especies que pertenecen al "grupo *caudata*" (sensu (Kofoid y Skogsberg, 1928), que incluye las grandes especies *D. caudata*, *D. tripos* y *D. miles*. El tercer grupo incluye a los especímenes de *D. norvegica* de la Cuenca de Bedford (Canadá), los cuales se encuentran cercanos a *D. acuta* de Vigo. En el cuarto grupo se pueden observar todas las secuencias de los organismos heterótrofos *Phalacroma rotundatum* formando un grupo monofilético con Bootstrap del 100%.



En cuanto a la procedencia geográfica de las secuencias, el patrón de ramificación mostró pequeñas diferencias dentro de *Dinophysis* spp. Por ejemplo, las secuencias *D. tripos* gallegos (JX470192) y canadienses (Cuenca de Bedford, EU927476 y EU927478) se agruparon en un mismo clado. Del mismo modo, las secuencias de *D. ovum* de aislados de Vigo (AM931583) se agruparon con los especímenes de *D. ovum* de Grecia (GU452507 y GU452508).

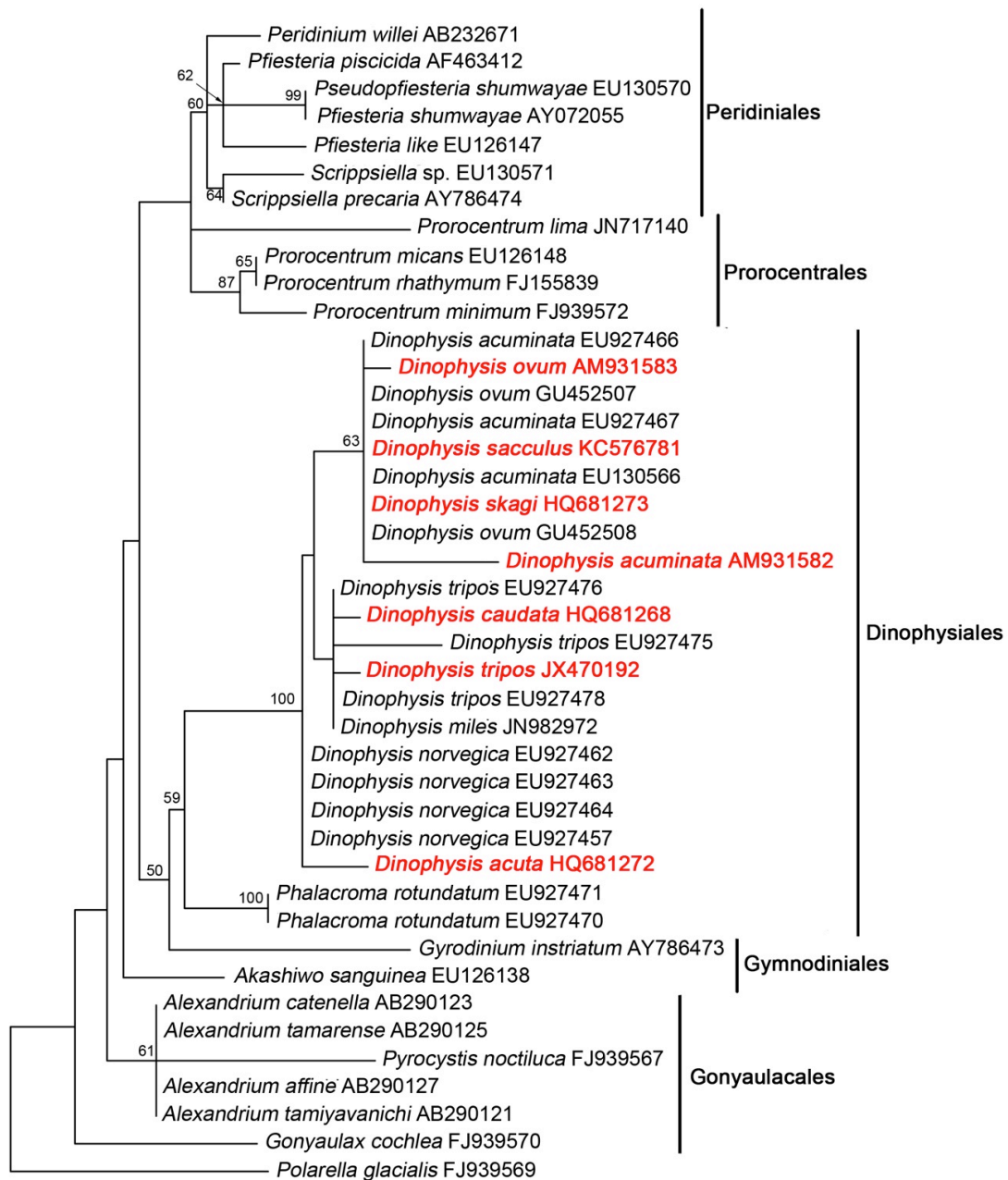


Figura 14. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos del gen *cox1*.

Las especies marcadas en rojo son las obtenidas en este trabajo. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 repeticiones.

4.1.4.2. *cob*

El análisis filogenético del gen mitocondrial *cob* se realizó a partir de un alineamiento de 893 pb, el cual incluyeron las secuencias de cinco especies de *Dinophysis* provenientes de Vigo y las 2 únicas secuencias de este gen disponibles para este género en la base de datos GenBank, *D. acuminata* EU130568 y *D. miles* JN982971, provenientes de dinoflagelados aislados en China.

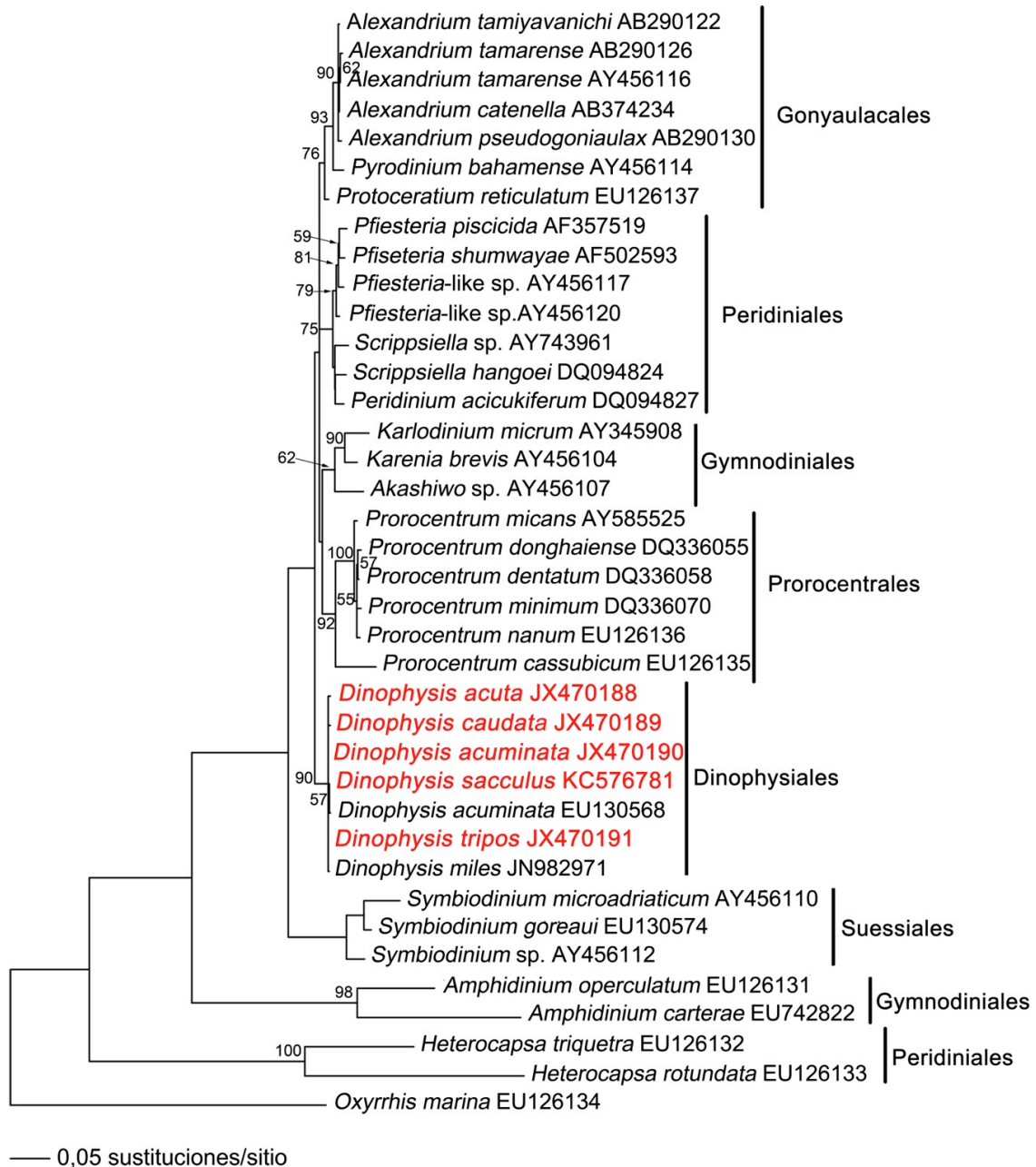


Figura 15. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos del gen *cob*. Las especies marcadas en rojo son las obtenidas en este trabajo. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 repeticiones.



En el árbol filogenético la mayoría de los órdenes de las especies analizadas aparecen como grupos monofiléticos (Figura 15), a excepción de los Peridiniales y Gymnodiniales que se observan como grupos polifiléticos, donde los dinoflagelados del género *Heterocapsa* y *Amphidinium* se observan en una posición basal en el árbol.

En cuanto al género *Dinophysis*, las 7 especies analizadas forman una rama que diverge, indicando una separación temprana de los otros dinoflagelados, agrupándose todas juntas en una misma rama con un índice Bootstrap del 90%. Así se observa que las especies de tamaño pequeño, *D. acuminata* y *D. sacculus*, se encuentran junto con las especies de mayor tamaño *D. acuta*, *D. tripos* y *D. caudata*. De manera similar, en el árbol no se observa una diferenciación de las especies respecto a su lugar de procedencia, ya que las especies de Vigo se agruparon junto con la de China. Un análisis detallado de las secuencias analizadas reveló que las diferencias de nucleótidos entre las 7 especies del género analizadas oscilaron entre 0 y 4 pb, observándose la mayor diferencia entre *D. acuta* con *D. caudata* de Vigo o *D. acuminata* (EU130568) de la bahía de Narragansett, USA. Especies con morfología muy distinta, como la pareja de *D. miles* (JN982971) de China y el *D. acuminata* gallego, mostraron sólo 1 pb de diferencia.

4.1.5. Desarrollo de posibles sondas

Las sondas moleculares tienen la característica de detectar moléculas que son específicas para el taxón (grupo de especies, variedades, etc) que son de interés. Son fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) que se unen a RNA o segmentos de DNA específicos dentro de las células diana, no haciéndolo a organismos no objetivo. Los operones de rRNA han sido ampliamente utilizados para identificar microorganismos y estudiar sus relaciones filogenéticas. Las sondas moleculares se pueden acoplar con una variedad de moléculas reportadoras (fluorescente, radioactivo, quimioluminiscente) y la detección se puede lograr utilizando diferentes técnicas, como *dot blot*, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o *microarrays*.

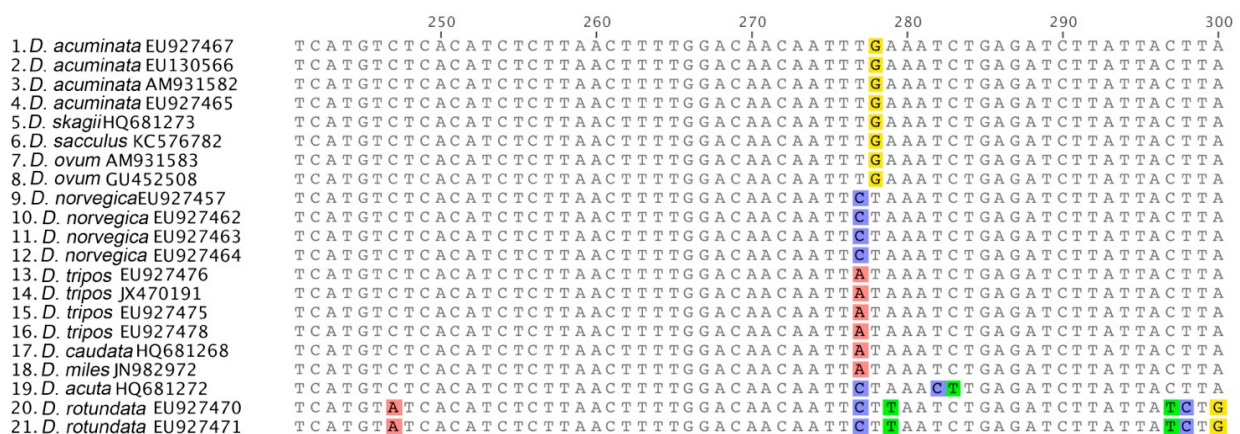


Figura 16. Detalle del alineamiento del gen *cox1* abarcando los nucleótidos desde la posición 241 a 300.



Los programas de monitoreo establecidos examinan periódicamente muestras de agua mediante microscopía óptica, con los problemas que ello lleva consigo tal y como se describió anteriormente. Por lo tanto, existe una necesidad en el desarrollo de sondas específicas de especie o específicas de cepa, que puedan ser utilizados para detectar sólo las células de interés (Edvardsen y col., 2013). El desarrollo de herramientas moleculares, tales como sondas de anticuerpos o sondas de oligonucleótidos dirigidas a la detección de algas tóxicas es de gran interés, pero su uso se encuentra limitado a un número de especies concretas ya que han sido sondas diseñadas para organismos localizados en áreas geográficas específicas (Scholin y col., 1997; Godhe y col., 2007; Kavanagh y col., 2010).

Del análisis de los marcadores moleculares evaluados en este trabajo, el gen mitocondrial *cox1* parece ser el que mejor podría discriminar ciertos grupos de especies, por lo que se analizó su secuencia en busca de zonas que pudieran utilizarse en el desarrollo de sondas, ya sea específicas de grupos o especies (Figura 16, el alineamiento completo se encuentra en el apartado suplementario). Un análisis detallado de estas secuencias permitió observar que la zona comprendida entre los nucleótidos 277 a 300 podría utilizarse para tal fin. Las secuencias de *P. rotundatum* son la que tienen mayores diferencias de nucleótidos, claramente diferenciable de las especies de *Dinophysis* (A277, T279, T297, C298, G300). Todas las secuencias de especies del “complejo *acuminata*” analizadas (*D. acuminata*, *D. skagii*, *D. sacculus*) presentaron una T en la posición 277 y G en la posición 278, a diferencia de las especies *D. tripos* y *D. caudata* que tenían una A y T en estas posiciones, o *D. norvegica*, *D. acuta* y *P. rotundatum* que tenían una C y una T. Las especies de *D. norvegica* analizadas presentan una C en la posición 277, al igual que las especies *D. acuta* y *P. rotundatum*. Sin embargo, estas especies manifiestan unas sustituciones en posiciones cercanas (*D. acuta* C282, T283; *P. rotundatum* T279) que permitirían la discriminación de estas tres especies. En cuanto a las especies de mayor tamaño *D. tripos*, *D. caudata* y *D. miles*, todas sus secuencias tenían una A en la posición 277, lo que permitiría desarrollar una sonda específica para este grupo.

4.2 Estudio del origen de los plástidos en *Dinophysis acuta*

Las especies de los dinoflagelados *Dinophysis* son organismos mixótrofos obligados que requieren alimentarse del ciliado *M. rubrum* y necesitan la presencia de luz para lograr el crecimiento. En la actualidad se sabe que albergan plástidos de origen criptofita, particularmente del género *Teleaulax*, *Plagioselmis* o *Geminigera* (clado TPG). Sin embargo, si estos plástidos son permanentes o adquiridos periódicamente de *M. rubrum*, sigue siendo un tema controvertido.

En el desarrollo de este apartado se ha estudiado el origen de los plástidos de *Dinophysis acuta* Ehrenberg, uno de los principales agentes responsables de los brotes de intoxicación diarreica en Europa Occidental con objeto de dar respuestas a esta discusión. Con este fin, se realizaron una serie de experimentos de alimentación con cultivos de *D. acuta* y *M. rubrum* como presa, este último alimentado con dos especies de criptofitas pertenecientes al clado TPG, *Teleaulax amphioxeia* y



Teleaulax gracilis, y otras dos que no pertenecen a dicho clado, *Falcomonas* sp. y *Hemiselmis* sp. Para ello se desarrollaron una serie de cultivos en los que *M. rubrum* fue alimentado con las cuatro criptofitas, los cuales fueron luego utilizados como presas para la alimentación de cultivos de *D. acuta* como se describe en materiales y métodos, apartado 3.5.3 (Figura 9). El destino de los plástidos de las criptofitas transferidos a *D. acuta* a través de su presa ciliado se investigó mediante el gen *psbA* como trazador.

4.2.1. Análisis filogenético de las criptofitas

Las criptofitas utilizadas en los ensayos de seguimiento de los plástidos se obtuvieron de aislamientos de muestras naturales obtenidas de las costas de Vigo, de Huelva y de Bilbao, por lo que se procedió a realizar un análisis filogenético del gen 18S rRNA de los aislados AND-A0710, Cr6EHU, CRY1V y CRY6V para poder identificarlas filogenéticamente.

En la figura 17 se muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas. Se puede observar que el aislado AND-A0710 de Huelva (KF734087) se agrupó con otras secuencias de *T. amphioxeia* obtenidas del GenBank. El análisis de similitud mostró que la secuencia de AND-A0710 era idéntica a la de *T. amphioxeia* AB364287 de Japón, y éstas se distanciaron un 0,2% de la secuencia de *T. amphioxeia* AJ007287 de Dinamarca. La especie Cr6EHU (JQ966994) aislada de Bilbao formó un grupo con otra secuencia de *T. gracilis* aislada de la misma localidad (Cr7EHU, num. acceso. JQ966995) con un 99.6 % de similitud de secuencia para. La secuencia obtenida de la criptofita CRY6V (KF734088) se agrupó con un fuerte índice Bootstrap junto a secuencias de organismos del género *Hemiselmis*. El análisis de la secuencia mostró que ésta compartía un 99,9% de identidad con *H. rufesens* de EE.UU. (AM901349) y *H. brunnescens* de Inglaterra (AJ007282). Por último, CRY1V (KF734089) formó un grupo con dos criptofitas no identificadas aisladas del norte de la bahía de Baffin (Canadá), nombradas en la base de datos como *Cryptophyceae* sp. CCMP2293 y CCMP2045 (Potvin y Lovejoy, 2009), con las que compartían un 99,9% y un 84,6% de identidad de secuencia, respectivamente. Posteriormente, esta criptofita fue identificada en base a su morfología como *Falcomonas* sp. (Pilar Rial, com. personal).

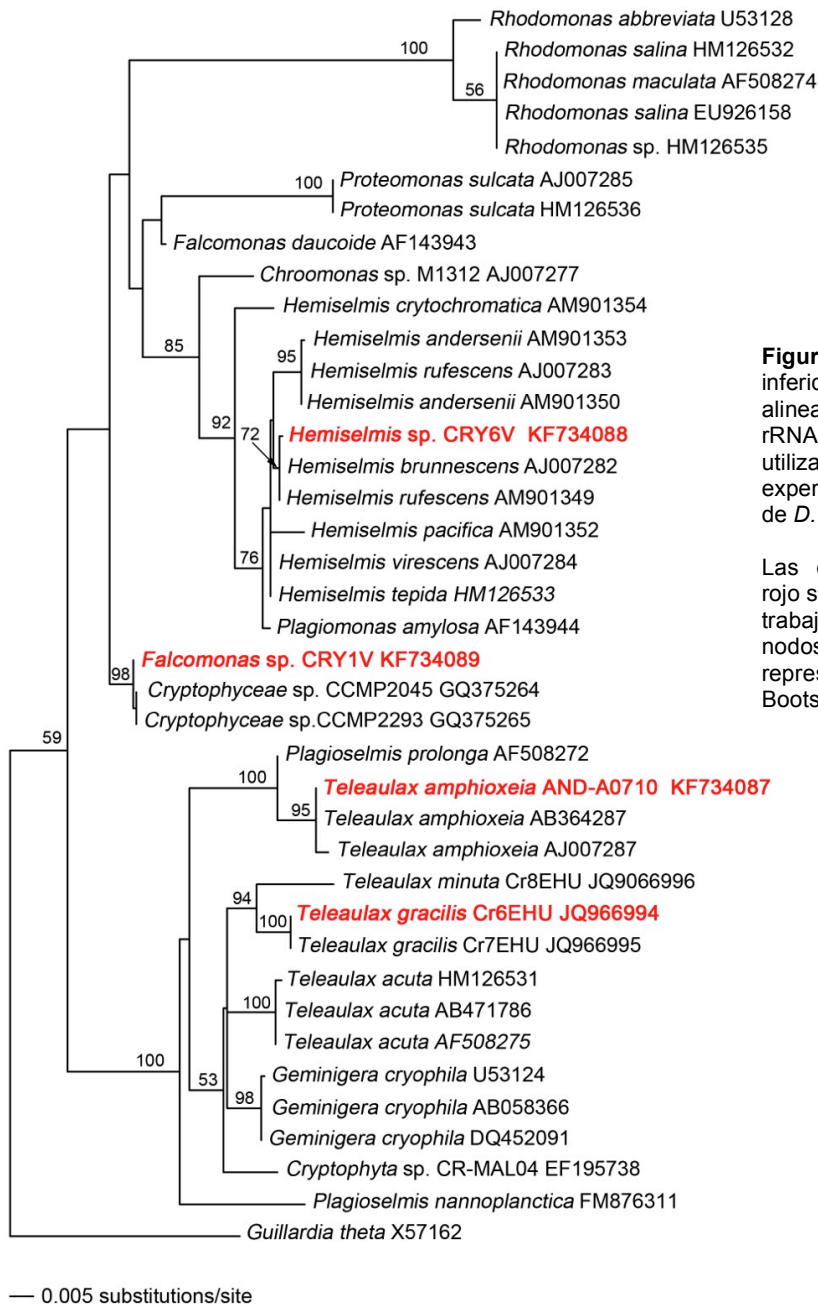


Figura 17. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos del gen 18S rRNA de las cuatro criptofitas utilizadas en los experimentos de alimentación de *D. acuta*.

Las especies marcadas en rojo son las obtenidas en este trabajo. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000

4.2.2. Seguimiento de los plástidos a través del gen *psbA*

Todas las especies estudiadas de *Dinophysis* tienen plástidos provenientes de una criptofita y los estudios genéticos indican que éstos están estrechamente relacionados o son idénticos a los plástidos de las especies de criptofitas dentro del clado TPG. Por ello se utilizaron dos especies de criptofitas pertenecientes a este clado (*T. amphioxeia* y *T. gracilis*) y dos especies que no pertenecen (*Falcomonas* sp. y *Hemiselmis* sp.) como presas para *M. rubrum*, el cual se utilizó como presa de *D. acuta*. Utilizando el gen *psbA* como trazador fue posible seguir la captura de los plástidos desde las criptofitas y su paso al ciliado y finalmente al dinoflagelado.



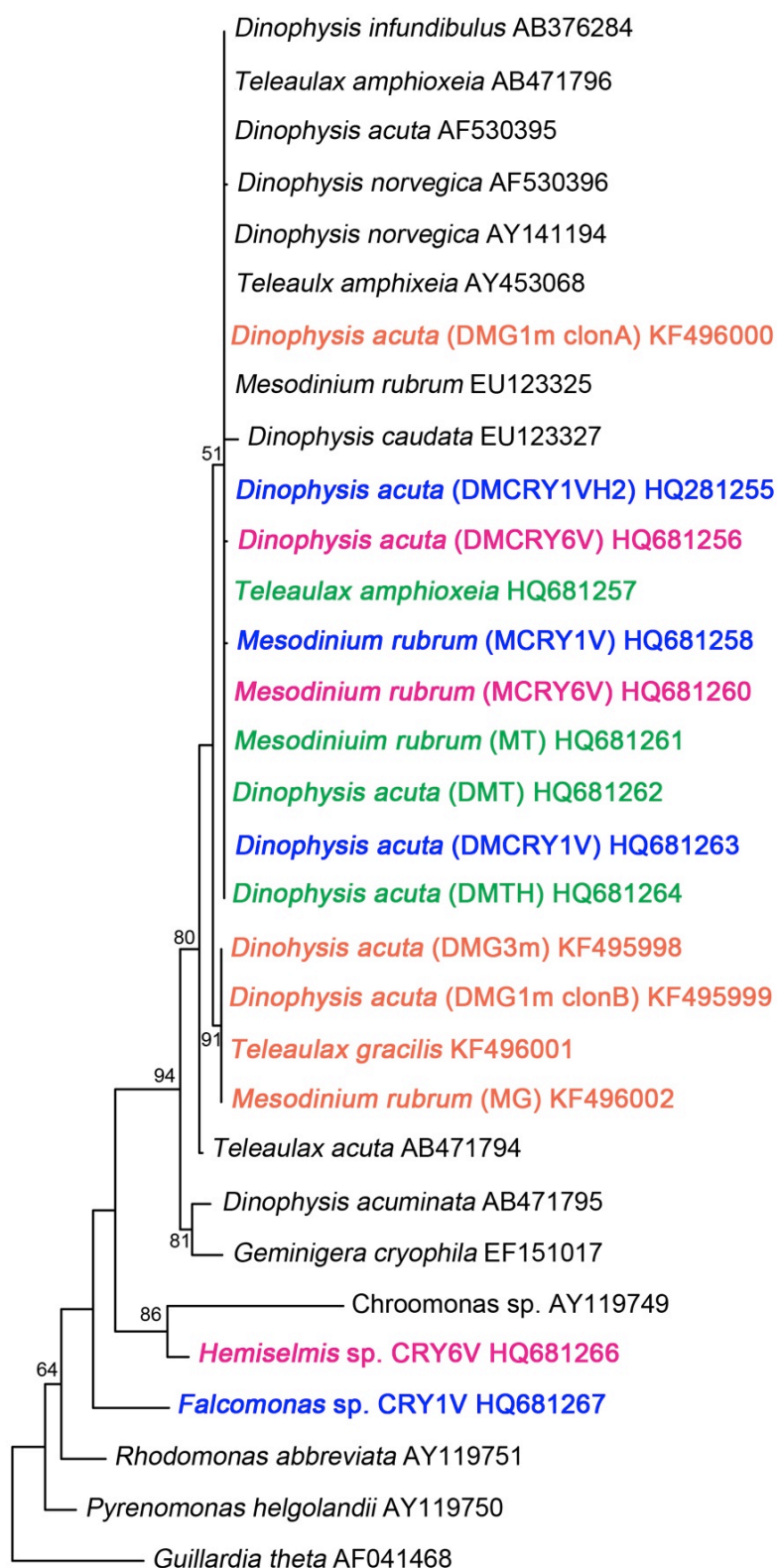
Primero se corroboró que las secuencias *psbA* de las criptofitas utilizadas como dadoras de plástidos eran lo suficientemente diferentes para evitar una interpretación errónea de los resultados. Para cada criptofita se determinó una secuencia consenso a partir de tres secuencias provenientes de clonación, las cuales finalmente se utilizaron en el análisis filogenético

Se analizaron tres secuencias provenientes de clonación de cada criptofita, a partir de las cuales se determinó una secuencia consenso que finalmente se utilizó en el análisis filogenético.

Las secuencias del gen *psbA* obtenidas de las criptofitas y de *D. acuta* y *M. rubrum* de los cultivos (Figura 9) fueron analizadas junto a las secuencias obtenidas de la base de datos GenBank. En la figura 18 se observa que *T. amphioxeia* Y-A0710, *T. gracilis* Cr6EHU, *Falcomonas* sp. CRY1V y *Hemiselmis* sp. CRY6V divergen en tres clados diferentes, demostrando ser buenas herramientas para ser utilizadas como donantes de plástidos.

En éste se observa un grupo mayoritario con un índice bootstrap del 94%, formado por tres clados donde se agruparon una variedad de especies de *Dinophysis*, *M. rubrum* y criptofitas pertenecientes al grupo TPG. En el primer clado se observa que *D. acuminata* AB471795 de la bahía de Funka, Japón, se agrupó junto a *Geminigera cryophila* EF151017 del estrecho de McMurdo, Antártida, lo que indica que este dinoflagelado poseía plástidos cuyo origen estaba relacionado con *G. cryophila*. Con un índice Bootstrap del 91% se encuentra agrupada la criptofita *T. gracilis* Cr6EHU (num. acceso KF496001) junto a *M. rubrum* y *D. acuta* provenientes de los cultivos MG y DMG respectivamente, indicando que sus plástidos estaban relacionados con *T. gracilis*.

Por último, un tercer clado agrupó a *T. amphioxeia*, tanto de Huelva como de Dinamarca (AY453068), y la mayoría de los cultivos de *D. acuta* y *M. rubrum* utilizados en los ensayos de alimentación, indicando que los plástidos de todos los organismos presentes en el grupo tenían su origen en *T. amphioxeia*.



— 0.01 substitutions/site

Figura 18. Árbol filogenético inferido por ML a partir de alineamientos del gen *psbA*. Las especies marcadas en cada línea representan las secuencias obtenidas de cada línea presa predador. Línea *T. amphioxeia* en verde, línea *T. gracilis* en naranja, línea *Hemiselmis* sp. en fucsia, línea *Falcomonas* sp. en azul. Los números en los nodos de las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 repeticiones.



Al realizar un estudio más pormenorizados se observa que en este grupo, las secuencias obtenidas a partir de los cultivos de *D. acuta* alimentados durante 3 meses con *M. rubrum* alimentado con *T. amphioxeia* Y-A0710 (secuencia consenso de 7 clones, cultivo DMT, Figura 9) fueron idénticas a las obtenidas de la criptofita y de *M. rubrum* alimentado con ella (secuencia consenso de 5 clones cultivo MT). El análisis de nucleótidos reveló que estas secuencias era similares (98,8 al 100% sitios idénticos) a otras secuencias *psbA* provenientes de entradas de GenBank de *M. rubrum* (EU123325) y de otras especies de *Dinophysis*, como *D. infundibulus* AB376264, *D. norvegica* AF530396 y AY141194, *D. caudata* EU123327 y *D. acuta* AF53039. Curiosamente, las secuencias obtenidas en nuestros experimentos a partir de *M. rubrum* alimentados con *Falcomonas* sp. CRY1V (secuencia consenso de 5 clones, cultivo MCRY1V) o *Hemiselmis* sp. CRY6V (secuencia consenso de 6 clones, cultivo MCRY6V), así como *D. acuta* alimentados con esos cultivos (secuencia consenso de 6 clones, DMCRY1V y DMCRY6V, respectivamente) no se agruparon junto a las correspondientes criptofitas, y sin embargo formaron un grupo monofilético junto a *T. amphioxeia* (secuencias DMCRY1V, DMCRY6V, MCRY1V, MCRY6V).

Cuando se analizaron las secuencias de los cultivos de *D. acuta* que se sometieron a hambruna durante tres meses (DMTH y DMCRY1VH2), las secuencias consenso obtenidas de 3 clones se agruparon con todas las secuencias de tipo *T. amphioxeia*, lo que indica que los plástidos originales se encontraban presentes en el interior de las células del dinoflagelado al momento de efectuar la amplificación por PCR.

Todas las secuencias obtenidas a partir de *T. gracilis* y de *M. rubrum* alimentados con ella (secuencia consenso 12 clones, cultivo MG), como la secuencia de *D. acuta* alimentados con el ciliado durante tres meses (secuencia consenso de 13 clones, cultivo DMG), se agruparon juntos como un grupo monofilético con un fuerte índice Bootstrap, y el análisis de secuencias de los tres organismos mostró que estas eran idénticas entre ellas (100% similitud).

Debido a que este resultado sugiere un reemplazo de los plástidos, se realizó un nuevo experimento con el cultivo DMG para determinar en que momento se producía dicho intercambio del plástido de *T. amphioxeia* (inicio del cultivo) por los de *T. gracilis*.

Para ello se analizaron las secuencias del gen *psbA* de 14 clones procedentes de un cultivo DMG al primer mes (1m) de iniciada la nueva alimentación. Tras el análisis de los resultados se detectaron dos tipos diferentes de secuencias: una de tipo *T. gracilis* (8 secuencias, DMG1mB) y otra de tipo *T. amphioxeia* (6 secuencias, DMG1mA), lo que por primera vez en este tipo de estudios indica, que ambos plástidos estaban presentes al mismo tiempo en la misma célula a tiempos intermedios del cambio de presa.



4.3 Determinación de carbohidratos de superficie en *Dinophysis* spp.

Debido a que los cultivos de *Dinophysis* son difíciles de mantener ya que requieren el co-cultivo de criptofitas y *M. rubrum*, y su rendimiento suele ser bajo, la puesta a punto de la técnica de marcaje con lectinas conjugadas con FITC se realizó con cultivos del dinoflagelado *Alexandrium minutum* clon AMAD06, puesto que su cultivo es más sencillo que el de *Dinophysis* y suelen alcanzar mayores densidades celulares. En el proceso se utilizaron tanto células vivas como preservadas en etanol a -20° C, ya que este método se usa habitualmente para mantener células de dinoflagelados que van a ser utilizadas posteriormente en diferentes técnicas moleculares, no encontrándose diferencias en

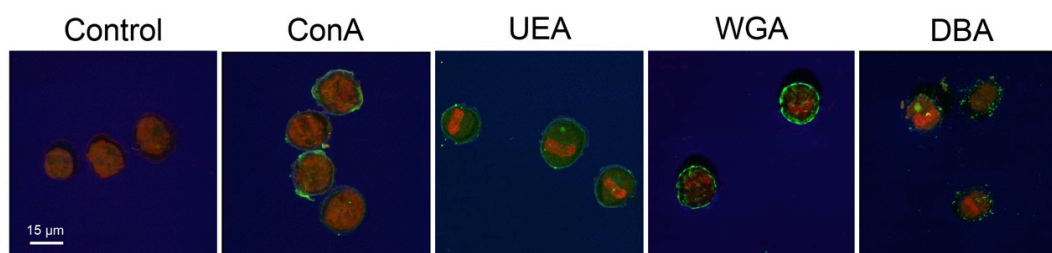


Figura 19. Micrografías de CLMS en las que se muestran los marcajes específicos en células de *Alexandrium minutum* AMAD06 mediante el uso de diferentes lectinas conjugadas a FITC (fluorescencia verde). Las tecas están teñidas con calcoflúor (fluorescencia azul). El núcleo de los dinoflagelados está teñido con yoduro de propidio (fluorescencia roja).

cuanto a su capacidad de marcaje con las lectinas utilizadas, indicando que este método de conservación no altera los carbohidratos en la pared del dinoflagelado y por lo tanto no afecta al reconocimiento de las lectinas.

En la figura 19 se puede observar en color verde los marcajes debido a las cuatro lectinas utilizadas en *Alexandrium minutum* AMAD06, donde todas ellas se unieron al dinoflagelado, revelando la presencia de los carbohidratos α -L-fucosa, N-acetilglucosamina, α -manosa y N-acetilgalactosamina en la pared de este dinoflagelado. Las tinciones con las lectinas ConA, UEA y DBA se observaron en toda la superficie de la célula, mientras que el marcaje con la lectina DBA se observó en forma de puntos definidos sobre la superficie celular.

4.3.1. Evaluación de la especificidad de la unión de las lectinas conjugadas con FITC

Una vez puesta a punto la técnica, se procedió a realizar las tinciones en células vivas y fijadas en etanol, procedentes de cultivos de *Dinophysis acuminata* de Huelva y evaluar la especificidad de la unión de las lectinas a la superficie celular por competición con los azúcares correspondientes (Figura 20).

Las células se incubaron con las lectinas ConA, UEA y DBA en presencia y ausencia de los carbohidratos específicos (Tabla 7). Tras la incubación las células se inmovilizaron en cubreobjetos de cristal tratados con poli-L-lisina, soporte sobre el cual se realizaron las tinciones con calcoflúor y yoduro de propidio según se especifica en materiales y métodos (Aptdo. 3.6.2).



Como se observa en la figura 20, los marcajes con las lectinas ConA y WGA se detectaron de forma intensa en toda la superficie de la célula, marcaje que se vio inhibido cuando las células se incubaron junto a los carbohidratos competidores α -manosa y N-acetilglucosamina respectivamente. Con la lectina DBA se observa una zona de fluorescencia en la mitad de la célula, sin embargo cuando se preincubó con L-fucosa, la intensidad de la fluorescencia es comparable a la célula en el tratamiento control.

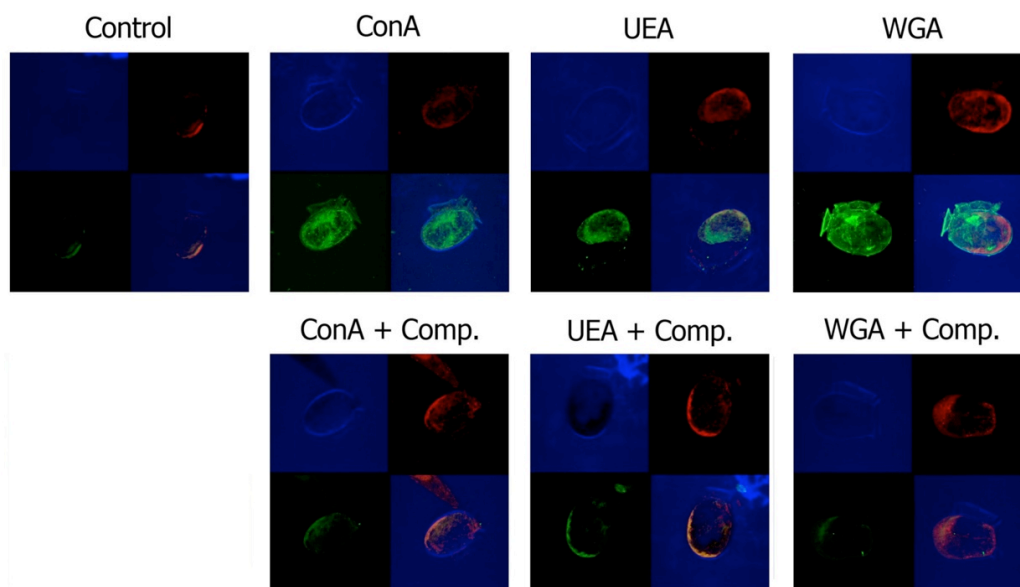


Figura 20. Micrografías de CLMS en las que se muestran los marcajes específicos de células vegetativas de *Dinophysis acuminata* de Huelva mediante el uso de diferentes lectinas conjugadas a FITC (fluorescencia verde) en presencia y ausencia de sus carbohidratos específicos. Las tecas están teñidas con calcofluor (fluorescencia azul). El núcleo de los dinoflagelados está teñido con ioduro de propidio (fluorescencia roja).

4.3.2. Evaluación de la composición de carbohidratos de diferentes especies de *Dinophysis* de Huelva y Vigo mediante lectinas conjugadas con FITC en células vegetativas y pequeñas.

En este apartado se estudiará de manera cualitativa la composición de carbohidratos en células de *Dinophysis* provenientes de Huelva y Vigo, tanto sobre células vegetativas como sobre células pequeñas de su ciclo de vida, utilizando las lectinas ConA, UEA, WGA y DBA conjugadas al compuesto fluorescente FITC.

4.3.2.1. Células vegetativas

Los marcajes con lectinas en las células vegetativas de las especies de *Dinophysis* utilizadas mostraron diferencias en cuanto la composición y localización de carbohidratos (Figura 21).



- Todas las especies se marcaron positivamente por la lectina ConA, lo que indica la presencia de los carbohidratos D-glucosa y D-manosa en la pared celular de las microalgas. Sin embargo la intensidad y localización no fue igual para todas las especies. En *D. acuta* de Vigo el marcaje observado fue muy leve. En *D. acuminata*, *D. tripos* y *D. caudata* de Vigo, así como en todas las células de Huelva, la lectina se unió fuertemente a la superficie de las células, pudiéndose observar claramente los poros de las tecas. El marcaje, en general, se distribuyó de manera homogénea, sin embargo en *D. caudata* de Vigo se observaron zonas punteadas de mayor intensidad, y en *D. ovum* de Huelva se observó una mayor intensidad en la aleta sulcal izquierda y superior.
- Cuando se utilizó la lectina UEA para revelar la presencia de α -L-fucosa, no todas las especies se marcaron positivamente. *D. tripos* de Vigo, *D. acuta* y *D. ovum* de Huelva no mostraron tinción y el patrón presente en las especies que se marcaron no fue tan homogéneo como el que mostró la lectina ConA. En los cultivos procedentes de Vigo, *D. acuminata* presentó una serie de puntos discretos a lo largo de su superficie. *D. acuta* se marcó levemente en toda la superficie, destacando la aleta cingular anterior y los poros de la teca, mientras que *D. caudata* mostró una tinción fuerte en toda la superficie. Las especies provenientes de Huelva mostraron un patrón diferente; así en *D. caudata* se observó fluorescencia en una franja bordeando la epiteca y descendiendo por la zona de la aleta sulcal izquierda, en *D. fortii* la tinción estaba presente como una serie de pequeñas manchas discretas dispersas en la superficie celular acompañada con una más grande, bien teñida, situada en el centro de la teca.

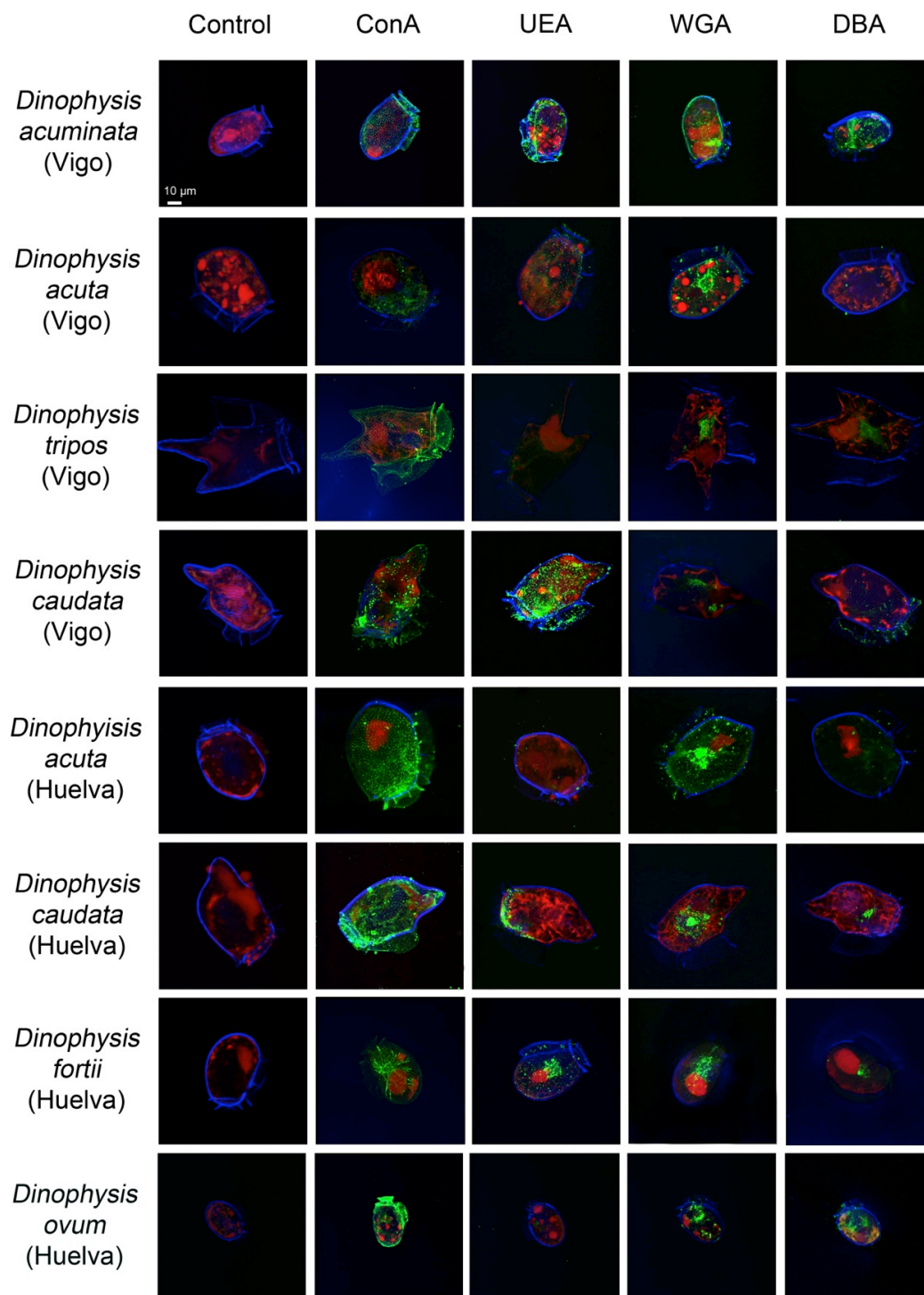


Figura 21. Micrografías de CLMS en las que se muestran marcajes específicos de células vegetativas para diferentes especies de *Dinophysis* de Galicia y Huelva mediante el uso de diferentes lectinas conjugadas a FITC (fluorescencia verde). Las tecas están teñidas con calcoflúor (fluorescencia azul). El núcleo de los dinoflagelados está teñido con yoduro de propidio (fluorescencia roja).



- La presencia de N-acetil- β -D-glucosamina se detectó en todas las especies analizadas con la lectina WGA, pero su localización varió en función de las especies. En *D. acuminata* de Vigo se observó la fluorescencia en toda la superficie celular con una intensidad fuerte, mientras que *D. acuta* y *D. tripos* presentaron una zona fluorescente en el centro la teca. En *D. caudata* la intensidad del marcaje fue menor, observándose dos zonas, una de ellas central. En las especies originarias de Huelva también se observaron diferencias en cuanto a la intensidad y patrones de unión de la lectina. En *D. acuta* la tinción tuvo lugar por toda la superficie, destacando una zona central de mayor intensidad. En *D. caudata* y *D. fortii* también se observó una zona central más marcada, pero sin embargo, en estas especies no se observó marcaje en el resto de la célula. En *D. ovum* la tinción se observó con un patrón heterogéneo.
- El marcaje con la lectina DBA se utilizó para revelar la presencia y localización de los carbohidratos N-acetil-D-galactosamina. *D. acuminata* de Vigo y *D. ovum* de Huelva fueron las únicas especies que mostraron fluorescencia en toda la célula. En *D. caudata* de Vigo la tinción se observó como una fluorescencia situada en la epiteca, en la aleta singular anterior y posterior, en la aleta sulcal izquierda y en puntos concretos de la teca. Tanto en *D. caudata* y *D. fortii* de Huelva, cómo en *D. tripos* de Vigo, la fluorescencia se observó en el centro de la teca. Las células de *D. acuta* de Vigo no mostraron fluorescencia, mientras en que la de Huelva fue muy leve.

4.3.2.2. Células pequeñas

Debido a la falta de disponibilidad de células en estadios de células pequeñas de las especies de *Dinophysis* asiladas de Huelva, solo se pudo realizar los marcajes en aquellas provenientes de Vigo (Figura 22).

- Los marcajes efectuados sobre las células gametas de las especies de *Dinophysis* mostraron que todas las células se marcaron con la lectina ConA. En todos los casos la fluorescencia se observó con una intensidad fuerte y de manera homogénea sobre la superficie celular. En este caso tanto células vegetativas como pequeñas e intermedias se marcaron con esta lectina, revelando la presencia constante de los carbohidratos D-glucosa y D-manosa en la pared celular en estos estadios.
- Cuando se utilizó la lectina UEA también se observaron cambios en los marcajes con respecto a las células vegetativas. Por ejemplo, en *D. acuminata*, al igual que en *D. caudata*, no se observó la unión de la lectina a la célula pequeña del dinoflagelado, pero sin embargo lo hizo en su forma vegetativa de forma muy evidente. En la célula pequeña de *D. acuta* se



observó la unión de la lectina en toda la célula de manera evidente, mientras que en la célula vegetativa ésta fue muy tenue. *D. tripos* no se marcó en ninguno de los estadios del ciclo celular evaluados.

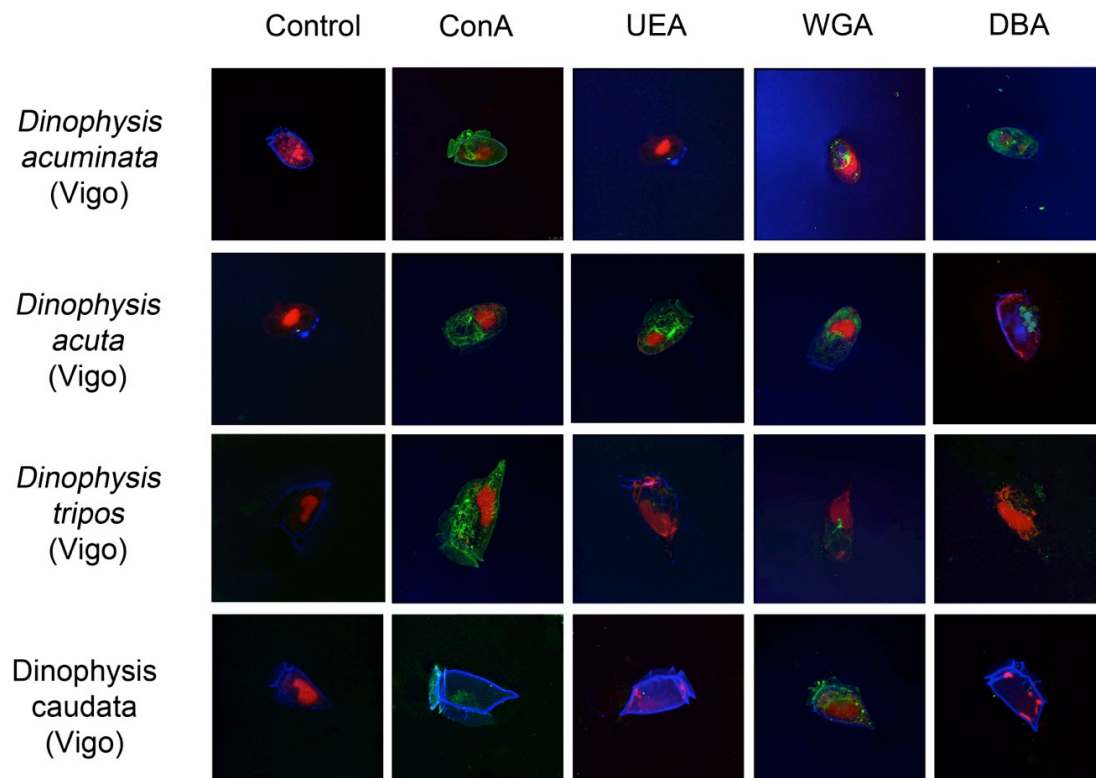


Figura 22. Micrografías de CLMS en las que se muestran marcajes específicos de células pequeñas para diferentes especies de *Dinophysis* de Galicia mediante el uso de diferentes lectinas conjugadas a FITC (fluorescencia verde). Las tecas están teñidas con calcoflúor (fluorescencia azul). El núcleo de los dinoflagelados está teñido con ioduro de propidio (fluorescencia roja).

- Al igual que en las células vegetativas, todas las células pequeñas de las especies analizadas se marcaron con la lectina WGA, revelando la presencia de N-acetilglucosamina. Sin embargo los patrones de dichos marcajes parecen variar entre éstos estadios celulares, a excepción de *D. tripos* que en ambos casos fue comparable. En *D. acuminata* la fluorescencia se observó en una pequeña zona en el centro de la teca, a diferencia de la vegetativa que se observó en toda la célula. En *D. acuta*, a diferencia de la célula vegetativa donde el marcaje se detectó en el centro de la teca, en la célula pequeña ésta se detectó de manera más tenue en la mitad inferior de la célula. En *D. caudata* también parece haber un cambio evidente en la distribución de la unión de la lectina, siendo ésta principalmente central en la vegetativa y en cambio se distribuyó en toda la célula gameta.
- Al observar los patrones e intensidades de los marcajes con la lectina DBA de las células pequeñas se observa que no hubo cambios respecto a las vegetativas de *D. acuminata* y *D.*



acuta. Sin embargo, en *D. caudata*, a diferencia de las células vegetativas, no se observó fluorescencia en las pequeñas, y en *D. tripos* que se observó en una zona central y más extendida en la célula intermedia, poniendo en manifiesto un cambio en la composición de los carbohidratos N-acetil-D-galactosamina en estos estadios de su ciclo celular.

Este es el primer trabajo que describe de forma comparativa la composición cualitativa de carbohidratos de la pared de especies de *Dinophysis* de dos regiones diferentes y los cambios en dicha composición en etapas de su ciclo de vida.

La unión diferencial observada de las lectinas en la superficie de las células, tanto en las células vegetativas como en las pequeñas, sugieren que esta técnica cualitativa tiene un gran potencial para la confirmación de la identificación de las especies de estas microalgas tóxicas y otros estudios. A modo de resumen, en la tabla 9 se detallan los patrones de unión de las lectinas a las células de *Dinophysis* evaluadas.

Tabla 9. Patrones de unión de las lectinas ConA, UEA, WGA y DBA en especies de *Dinophysis* aislados de Huelva y Vigo, en células pequeñas y vegetativas.

Especies provenientes de Huelva	Lectina									
	Control		ConA		UEA		WGA		DBA	
<i>Dinophysis acuta</i>	-		++		-		++		+-	
<i>Dinophysis caudata</i>	-		++		+		+		+	
<i>Dinophysis fortii</i>	-		++		+		+		+	
<i>Dinophysis ovum</i>	-		++		-		+		++	
Especies provenientes de Vigo	Veg.	Peq.	Veg.	Peq.	Veg.	Peq.	Veg.	Peq.	Veg.	Peq.
<i>Dinophysis acuminata</i>	-	-	+	++	+	-	++	+-	++	++
<i>Dinophysis acuta</i>	-	-	+-	++	+-	++	+	+	-	-
<i>Dinophysis tripos</i>	-	-	++	++	-	-	+	+-	+	-
<i>Dinophysis caudata</i>	-	-	++	++	++	-	+-	+	+-	-

4.4. Posible función de los carbohidratos como determinantes superficiales implicados en el reconocimiento entre presa-predador en la cadena trófica

Dentro de la variedad de posibles mecanismos para el reconocimiento entre presa y predador en la cadena trófica, nos hemos centrado en aquellos mediados por carbohidratos. Esto podrá permitir la identificación de aquellos carbohidratos comunes entre los microorganismos que son utilizados como presas y que no estén presentes en la superficie de los que no son aceptados como tales.

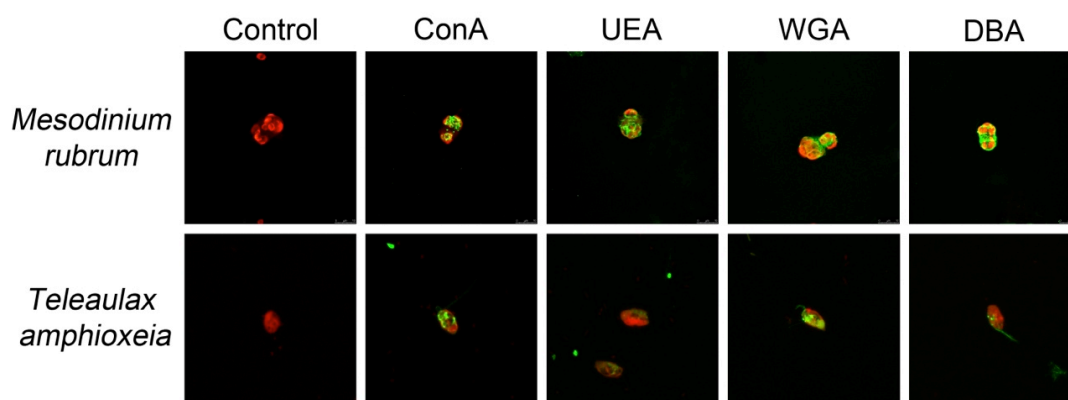


Figura 23. Micrografías de CLMS en las que se observan marcajes específicos de células vegetativas para *Mesodinium rubrum* y *Teleaulax amphioxeia* mediante el uso de diferentes lectinas conjugadas a FITC (fluorescencia verde). El núcleo de las microalgas está teñido con yoduro de propidio (fluorescencia roja).

En este trabajo se han determinado los residuos de carbohidratos expuestos en la superficie de los otros miembros de la cadena trófica de *D. acuta*, *M. rubrum* y *T. amphioxeia* mediante el uso de las mismas lectinas conjugadas a FITC en los ensayos en *Dinophysis* spp.

En la figura 23 se puede observar que el marcaje efectuado a las células del ciliado fue positivo para las cuatro lectinas utilizadas, y los patrones de marcaje fueron comparables en todas ellas, observándose en toda la célula intensamente.

Los marcajes realizados a la criptofita *T. amphioxeia* muestran que esta también se marcó con las cuatro lectinas utilizadas, sin embargo con la lectina UEA la marca se observó de manera muy débil. Los marcajes con las lectinas ConA y WGA fueron similares en intensidad y localización, observándose en la célula y en el flagelo. Con la lectina DBA la tinción en el cuerpo de la célula fue muy escasa, sin embargo es muy evidente la señal localizada en el flageo.

Los carbohidratos detectados en las células de *M. rubrum* y *T. amphioxeia* podrían desempeñar un papel en el proceso mediado por lectinas de reconocimiento de las presas por parte de los predadores. Con el fin de evaluar la posibilidad de la existencia de este tipo de mecanismos en la selección de la presa de *Dinophysis*, cultivos de *D. acuta* de Vigo se incubaron con *M. rubrum* en medio de cultivo suplementado con los carbohidratos L-fucosa, D-manosa o N-acetil-galactosamina durante tres días, momento en el cual se cuantificaron las células del ciliado y del dinoflagelado (Tabla 10).

Los resultados preliminares obtenidos nos permitieron observar que cuando se agregó L-fucosa 20 μM al medio un aumento en el número de células del dinoflagelado acompañado de un descenso del 66.66% en el número de células ciliadas. Sin embargo, cuando la concentración fue de 300 μM el número de células de ambos organismos fue comparable a la del cultivo sin tratar. Cuando se agregó el carbohidrato D-manosa a 20 μM el número de células de *D. acuta* descendió a 55 al tercer día, el



cual fue acompañado por un descenso en el número de células del ciliado. Al aumentar la concentración del carbohidrato se observó un ascenso en el número de células del dinoflagelado mientras que el del ciliado se mantuvo constante. Finalmente, el agregado de N-acetil-galactosamina produjo un descenso en el número de células de los dos organismos, siendo más acentuado a la mayor concentración.

Si bien estos resultados preliminares no son concluyentes, sí muestran un posible papel de las lectinas en el reconocimiento entre presa y predador.

	T0	-	L-fucosa		D-manosa		N-acetil-galactosamina	
			20 μ M	300 μ M	20 μ M	300 μ M	20 μ M	300 μ M
<i>D. acuta</i>	60	78,33	95	75	55	90	30	60
<i>M. rubrum</i>	1500	1390	520	1135	515	1530	500	1075

Tabla 10. Cuantificación del número de células de *D. acuta* de Vigo y de *M. rubrum* presa al inicio (T0) y luego de tres días de cultivo en medio L1 suplementado con los carbohidratos L-fucosa, D-manosa o N-acetil-galactosamina a una concentración final de 20 y 300 μ M.



La identificación y cuantificación de las especies de *Dinophysis* es parte de la rutina de trabajo en programas de monitoreo de algas tóxicas debido al impacto que provocan en la salud pública y en las economías regionales. En España la región de Galicia ha sido señalada como la segunda productora a nivel mundial después de China de moluscos bivalvos, en especial de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), con una producción estimada entre 200.000 y 250.000 toneladas al año. En esta región, la presencia de *Dinophysis*, en especial los frecuentes *D. acuminata* y *D. acuta*, provocan cada año cierres en las áreas de producción de moluscos bivalvos como el ocurrido en los meses de octubre noviembre de 2013 o el caso especial del 2005 en el que se produjeron cierres en la ría de Vigo (www.intecmar.org).

La identificación de especies de *Dinophysis* tóxicos en los programas de monitoreo se realiza mediante la observación microscópica de su morfología, lo cual puede generar inconvenientes si se tiene en cuenta la plasticidad morfológica del género. En este contexto, los estudios moleculares pueden ayudar en la discriminación de las especies *Dinophysis*, ya sea como método único de identificación o como complemento a la observación microscópica.

Es por ello que en esta tesis uno de los objetivos principales se enfocaron en la evaluación y búsqueda de potenciales marcadores moleculares que pudieran resolver especies cercanas conflictivas, como las del llamado “complejo *acuminata*”.

5.1. Marcadores Moleculares

5.1. RNA ribosómico

El operón de rRNA, que contiene regiones codificantes y no codificantes con diferencias sustanciales en cuanto a sus tasas de evolución, ha sido ampliamente utilizado tanto para analizar las relaciones taxonómicas de alto nivel como también para relaciones intraespecíficas. Los miembros de la familia, en particular la subunidad mayor (28S) y la menor (18S) del rRNA, poseen mosaicos de regiones variables y conservadas que facilitan las comparaciones entre especies estrechamente relacionadas así como taxones más divergentes que han revolucionado el estudio de las relaciones filogenéticas entre organismos (Bhattacharya, 1997). En cambio, las regiones espaciadoras internas ITS1-5,8S-ITS2 suelen ser más variables que las otras regiones del operón rRNA, característica que le confiere una mayor utilidad en niveles filogenéticos cercanos, como entre especies y sus poblaciones (Stern y col., 2012).

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de las regiones 18S, 28S y regiones ITS1-5,8S rRNA-ITS2 del operón rRNA en una gran variedad de especies de *Dinophysis* problemáticas para la acuicultura, como *D. tripos* Gourret, *D. caudata* Saville-Kent, *D. sacculus* Stein, *D. acuta* Ehrenberg, *D. ovum* Schütt, *D. skagii* Paulsen, *D. acuminata* Claparede & Lachmann y *Phalacroma rotundatum* (= *Dinophysis rotundata*), provenientes tanto de muestras naturales recogidas durante proliferaciones de estas microalgas como de cultivos que fueron establecidos en laboratorio.



- El análisis filogénico llevado a cabo con el gen 28S comprendió los dominios hipervariables D8, D9 y D10. Esta región específica se seleccionó debido a su potencial interés en filogenia y análisis taxonómicos de especies muy relacionadas, debido a que son las regiones que mayor variabilidad presentan dentro del gen (Lenaers y col., 1991).

Esta es la primera vez que se analiza esta región en el género *Dinophysis* que se localiza entre los nucleótidos 1980 y 2905 debido a que otras regiones del gen estudiadas anteriormente no dieron resultados concluyentes. Por esta razón en la base de datos GenBank no se encontraron depositadas un número suficiente de secuencias para realizar un estudio comparativo con especies de otras localidades geográficas. Sin embargo, el análisis efectuado para las especies de *Dinophysis* de Vigo muestran que el poder resolutivo de esta región del gen 28S rRNA es bajo, lo que se ve reflejado en las escasas diferencias a nivel genético observadas (99,8% de similitud). Esta baja variabilidad génica es evidente incluso cuando las diferencias a nivel morfológico son muy elevadas. Como se observa en la figura 10, las especies más pequeñas pertenecientes al “complejo *acuminata*”, como *D. acuminata*, *D. skagii* y *D. ovum*, se agruparon junto a *D. caudata*, cuya morfología, debida a su prolongación o proceso en la región antapical, es marcadamente evidente (Figura 10). Si bien esta región es la primera vez que se utiliza en el estudio de especies de *Dinophysis*, esta ya había sido evaluada anteriormente en otros dinoflagelados con éxito. La comparación de secuencias de esta región demostró ser útil para discriminar dos morfoespecies tóxicas no descritas de *Gambierdiscus polynesiensis* sp. nov. y *G. australes* sp. nov. de *G. toxicus* (Chinain y col., 1999). Sin embargo, Fraga y col. (2011) se mostraron cautelosos debido a que esta región agrupó a una cepa de *Gambierdiscus* (VGO1022) alejada de las especies de morfología similares *G. polynesiensis*.

La baja resolución observada en este gen parece repetirse en otros estudios llevados a cabo con especies de *Dinophysis* de otras localidades geográficas realizadas principalmente con las regiones D1-D2. Edvardsen y col. (2003) hallaron una escasa variación entorno al 0,4%, que se correspondió a unas diferencias de entre 3 a 12 nucleótidos, entre *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. norvegica* Claparède et Lachmann aislados de la costa sur de Noruega. Qiu y col. (2011) describieron que las regiones D1-D2 del gen 28S rRNA de *D. miles* del mar del sur de China eran idénticas a las de *D. miles* del océano Índico (FJ808688), pero también lo eran con *D. tripos* del océano Índico (FJ808692) y de la bahía de Concarneau, Francia (AY040585) y con *D. odiosa* del lago Creran en Escocia (AY259241), concluyendo, por tanto, que este gen no permitía discriminar correctamente a las dos especies morfológicamente similares como son *D. miles* y *D. tripos* ni con la más diferente *D. odiosa*. Hart y col. (2007) analizaron esta región en especies de *Dinophysis* de la costa escocesa y observaron que las secuencias de *D. acuminata* y *D. norvegica* eran idénticas a las secuencias de las mismas especies aisladas de Noruega (Edvardsen y col., 2003), Francia y Australia (Guillou y col., 2002), por lo que no hubo una discriminación debida a la localización geográfica.



- En el análisis filogenético basado en secuencias parciales del gen 18S rRNA todas las especies del orden Dinophysiales se agruparon en un grupo monofilético, el cual se dividió en dos ramas, una agrupando a los representantes del género *Phalacroma* y otra a los de *Dinophysis* (Figura 12). Este clado estaba formado por las especies *D. acuminata* (de Vigo, EEUU, Noruega y Japón), *D. caudata* (De Vigo, Marsella y EEUU), *D. norvegica* (del mar del norte y Noruega), *D. acuta* (de Vigo y Noruega), *D. infundibulus* y de *D. fortii* (de Japón), *D. ovum* (de Vigo) y *D. miles* (de China). Todas estas especies, a pesar de su variabilidad morfológica, resultaron ser idénticas (99,8 al 100% de similitud). Al observar detenidamente dicho clado vemos que las distancias son en su mayoría cero o cercanas a él, sin existir una discriminación entre especies ni entre localidades.

La homogeneidad observada podría deberse a la longitud del alineamiento (417 pb), sin embargo, estudios realizados con secuencias completas del gen arrojan resultados similares. Las secuencias completas del 18S rRNA (1800 pb) de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. norvegica* y *P. rotundatum* difirieron solamente un 0,3% (5–8 bp) (Edvardsen y col., 2003).

La secuencia de *Phalacroma rotundatum* de Vigo se agrupó en el clado que agrupa al género *Phalacroma* Stein, donde también se observa una secuencia de *P. rotundatum* de Noruega, lo que sustenta su traspaso a un nuevo género. Esto apoya la distinción entre *Dinophysis* y *Phalacroma*, que coloca las especies de *Dinophysis* como *D. rotundata* con una epiteca en forma de domo claramente visible y la mayoría de ellos heterótrofos, en el género *Phalacroma*.

- Los resultados obtenidos para las regiones ITSs en nuestro trabajo (Figura 13) están en concordancia con las observaciones descritas por otros autores, ya que no se ha observado una clara discriminación entre las especies analizadas. *D. acuta* de Vigo se agrupó con dos *Dinophysis* cf. *acuminata* aislados en Florida. Al analizar las diferencias de nucleótidos de estas secuencias, éstas fueron un 97,7% y 98,2% (EU780640 y FJ477081) idénticas respecto a la de *D. acuta* gallego. Lamentablemente en la publicación que hace referencia a ellas (Handy y col., 2009) no hay micrografías de los especímenes aislados que nos permita observar su morfología, sin embargo el análisis de sus secuencias indican que existe una diferencia del 4,3% con respecto a *D. acuminata* de Vigo, pero de un 2,8% respecto al *D. acuta* gallego. Sin embargo, otras secuencias de *D. acuta* (AY040569, AY040570), así como de *D. dens* de Portugal, reportada como parte del ciclo de vida de *D. acuta* (Reguera y col., 2004), se agruparon en otro cluster. Este resultado sugeriría que estos aislados se encuentran más cercanos a *D. acuta* que a *D. acuminata*, y por lo tanto podrían tratarse de gametas cuyo menor tamaño que la célula vegetativa y su morfología serían semejantes a *D. acuminata* (Reguera y Gonzalez-Gil, 2001).

Estudios moleculares previos en *Dinophysis* spp. han demostrado que las regiones ITS (que incluyen el 5,8S rRNA) presentan bajos niveles de variabilidad de secuencia y dan resultados pobres en los análisis filogenéticos. Marín y col. (2001) observaron un 99% de similitud entre las secuencias ITS de *D. acuminata* y *D. sacculus* de Galicia, de morfología similar y



abundantes en las rías Altas gallegas. Guillou y col. (2002) obtuvieron resultados similares, observando diferencias de solo una posición en las secuencias de *D. acuminata* de Francia y Reino Unido respecto a *D. sacculus* de Francia. De manera similar Edvardsen y col. (2003) reportaron que las regiones ITS de *D. acuminata* y *D. norvegica* de la costa sur de Noruega eran idénticas.

De los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias de los genes del operón del rRNA,, parece que ninguno de los genes del operón del rRNA permite discriminar entre las especies estudiadas, ninguno parece discriminar entre las especies estudiadas, ya sea teniendo en cuenta sus morfologías diferentes o lugares de procedencia. El interés en la búsqueda de marcadores moleculares con un buen poder resolutivo radica en obtener diferencias claras en las secuencias que puedan ayudar a diseñar cebadores o sondas específicas de grupos o especies que provean de herramientas en programas de monitoreo y faciliten la identificación de especies formadoras de proliferaciones y que generan un impacto directo en la salud y en la economía. Por ello se utilizaron otros genes menos estudiados, como es el caso de los genes mitocondriales.

5.1.2. Genes mitocondriales *cox1* y *cob*

En los últimos años ha habido un incremento en el número de trabajos que se han centrado en la búsqueda de marcadores moleculares en dinoflagelados explorando el potencial de los genes mitocondriales *cox1* y *cob* (Litaker y col., 2007; Zhang y col., 2008; Kamikawa y col., 2009; Lin y col., 2009; Stern y col., 2012).

Recientemente, Stern y col. (2012) compararon la eficiencia global de las regiones ITS y de genes mitocondriales como marcadores moleculares en varios géneros de dinoflagelados. Estos autores observaron que para secuencias obtenidas de genes *cob* e ITS existe un hueco bien definido de distancias entre especies y cepas de especies, y en cambio, el gen *cox1* carecía de tal brecha, por lo que su uso como marcador molecular en dinoflagelados sería menos útil. Sin embargo, este estudio no incluyó ningún representante del género *Dinophysis*.

Entre la gran variedad de organismos que existen dentro del filo *Dinoflagellata*, el género *Dinophysis* es un candidato perfecto para evaluar la idoneidad de estos marcadores, dadas las escasas variaciones a nivel génico observadas en los genes ribosomales. Sin embargo, de los dos genes *cox1* y *cob* utilizados, hasta la fecha, sólo el primero ha sido explorado en mayor o menor detalle en especies este género (Raho y col., 2008; Campbell y col., 2010; Papaefthimiou y col., 2010; Fux y col., 2011; Raho y col., 2013).

Nuestros resultados obtenidos con el gen *cox1* (Figura 14) (Raho y col., 2013), si bien no han permitido discriminar entre especies muy cercanas como *D. acuminata* de otras especies relacionadas del “complejo *acuminata*” (*D. ovum* o *D. sacculus*), en general ofrecen una mejor resolución que el gen *cob*. Esto es particularmente cierto en el caso de *D. acuta*, *D. ovum* y *D. sacculus* frente a *D. acuminata*, pero no así para el par *D. caudata* y *D. tripos*, las cuales se



encuentran agrupadas en un solo clado. Cuando se analizaron las diferencias en pares de bases se halló una diferencia de 17 pares de bases en el alineamiento de *cox1* entre *D. ovum* y *D. acuminata*. Se encontró una diferencia similar (15 pb) entre *D. sacculus* y *D. acuminata*, por lo que ambas especies podrían ser bien discriminadas utilizando *cox1*. Sin embargo, difícilmente sería el caso entre *D. ovum* y *D. sacculus* de Vigo, ya que sus secuencias fueron muy similares (2 diferencias).

Dada la similitud morfológica existente entre *D. acuminata* y *D. ovum*, el 100% de similitud en secuencia hallada entre *D. acuminata* aislados en América del Norte (EU130566 (Zhang y col., 2008), EU927466, EU927467) y *D. ovum* (GU452507) de Grecia (Papaefthimiou y col., 2010) se debe interpretar con cautela, ya que dichos organismos podrían haber sido erróneamente identificados en base a su morfología. Las células griegas de *Dinophysis* identificadas por observación microscópica como *D. cf. acuminata*, resultaron estar relacionados con *D. ovum* de Galicia después de la secuenciación y análisis del gen *cox1* (Papaefthimiou y col., 2010). Un caso similar puede haber ocurrido con las cepas de *D. acuminata* norteamericanas, pero lamentablemente no hay en las publicaciones que hacen referencia a ellas micrografías disponibles para confirmar si se ajustan a *D. acuminata* o a "*D. acuminata cf. ovum*". Este inconveniente, que suele ser habitual en la bibliografía, plantea la necesidad de la inclusión de micrografías en las publicaciones que hacen referencias a aislamientos de organismos y sus secuencias.

El análisis filogenético efectuado con el gen *cob* a las especies de *Dinophysis* aisladas, que abarca el mayor número de especies hasta la fecha, confirma que el poder de resolución taxonómica de este gen es bastante pobre a nivel de especie para el género *Dinophysis* (Figura 15). Especies morfológicamente diferentes como *D. acuta*, *D. caudata*, *D. acuminata*, *D. tripos* y *D. miles* (Figura 10) se agrupan juntas en un mismo clado y con unas longitudes de rama muy cortas, indicando una baja variabilidad de secuencia entre estos organismos. Puesto que no existe en las bases de datos como GenBank una amplia colección de secuencias *cob* disponibles para este género, es difícil una evaluación completa de su resolución global. Sin embargo, ateniéndonos a los resultados aquí obtenidos, el gen *cob* no parece tener la resolución necesaria para discriminar entre especies de morfología similar, ni tampoco para especies de morfología claramente identificable, como por ejemplo *D. miles* y *D. acuminata*.

Una publicación ha evaluado su eficacia dentro del género. En ella Qiu y col. (2011) utilizaron este gen para comparar *Dinophysis miles* (JN982971) con *D. acuminata* (EU130568) aislados en el Mar del Sur de China, las únicas secuencias del gen *cob* de *Dinophysis* disponibles hasta la fecha. Su análisis mostró que *D. miles* y *D. acuminata*, dos especies con muy diferente morfología, y la primera restringida a los mares tropicales, sólo mostró tres nucleótidos diferentes, resultados que son similares a los obtenidos con secuencias de los genes ribosómicos y a los resultados obtenidos en nuestro análisis.

Teniendo en cuenta los estudios previos y los resultados obtenidos en esta tesis, se podría afirmar que el gen mitocondrial *cox1* es el único marcador molecular que ha permitido diferenciar claramente al menos 3 grupos de especies de *Dinophysis*. Uno de ellos está formado por células del "complejo *acuminata*", formado por organismos de tamaño pequeño como *D. acuminata*, *D. ovum* y *D. sacculus*.



Otro grupo bien definido incluye a las grandes células de las especies *D. tripos* y *D. caudata*. El tercer grupo incluye a células como *D. acuta* y *D. norvegica*. Estos resultados podrían utilizarse para diseñar sondas específicas que discriminen entre estos tres grupos.

5.1.3. Relación de *Phalacroma rotundatum* con respecto al género

A pesar de que el orden Dinophysiales comprende una amplia diversidad morfológica, el número y la disposición de las placas tecales está altamente conservada. El plan estructural y tabulación de las placas son, por lo tanto, de limitado valor taxonómico en la separación de los taxones de este orden. El género *Phalacroma* fue erigido por Stein (Stein, 1883) para describir a un grupo de Dinophysiales con unas características distintivas, como las listas cingular horizontales en vista lateral y una gran epiteca, suficientemente diferentes del concepto del género *Dinophysis*. Sin embargo, algunas especies de este nuevo género son difíciles de separar de *Dinophysis* ya que la disposición de las placas de las tecas entre *Dinophysis* y *Phalacroma* son muy similares, por lo que se propuso la fusión de los dos géneros (Hallegraeff y Lucas, 1988).

En este trabajo se determinaron las secuencias de los genes 18S rRNA, 28S rRNA, región ITS y *cox1* en células naturales de *P. rotundatum* aislado de Vigo durante una proliferación. En todos los análisis filogenéticos realizados, *P. rotundatum* diverge del clado que agrupa al resto de las especies de *Dinophysis*, y se agrupa con especies del género *Phalacroma*.

Sobre la base de estos resultados moleculares se concluye que el controvertido género *Phalacroma* es de hecho un género válido. Esta separación apoya la distinción de *P. rotundatum* (= *D. rotundata*) dentro del género *Phalacroma*, ya que morfológicamente presenta una epiteca con forma de domo bien marcada y una nutrición heterótrofa, a diferencia de las especies de *Dinophysis*.

Sin embargo, algunas especies de *Phalacroma* son fotosintéticas; *Phalacroma rapa* (Jorgensen) son organismos fotosintéticos, aunque sus plástidos y pigmentos difieren de aquellos en los *Dinophysis* fotosintéticos, los cuales tienen plástidos del tipo criptofita con dos tilacoides y fluorescencia anaranjada (Schnepf y Elbrächter, 1999). Los plástidos en *P. rapa* tienen tres tilacoides y una coloración marrón-dorada (Hallegraeff y Lucas, 1988). Esta distinción del género también se ve reforzada por argumentos del tipo ecológicos; las especies de *Dinophysis* son en su mayoría neríticas, mientras que las de *Phalacroma* son en su mayoría oceánicas (Hallegraeff y Lucas, 1988).

5.2 Estudio del origen de los plástidos en *Dinophysis acuta*

Desde que se estableciera el primer cultivo en el laboratorio (Park y col., 2006) lo que , posibilitó la realización de experimentos controlados, se han descrito otras especies de *Dinophysis* de las que se han logrado mantener en cultivo de forma estable (Park y col., 2006; Nagai y col., 2008; Nishitani y col., 2008a; Nishitani y col., 2008b; Jaén y col., 2009; Kamiyama y Suzuki, 2009; Rodríguez y col., 2012), si bien su mantenimiento no es sencillo al estar involucrada una línea presa-predador.



Durante el desarrollo de esta tesis se analizaron las secuencias del gen *psbA* presente en varias líneas presa-predador de *Dinophysis acuta* aislado de Huelva con el fin de dilucidar el origen de los plástidos en este dinoflagelado. Uno de los experimentos que denominamos “control” se llevó a cabo en dinoflagelados a los que no se añadió presa por un periodo de tres meses. Nuestro análisis del gen en células de *D. acuta* sin alimentar, permitió detectar secuencias del tipo *T. amphioxeia* en su interior, lo que indicaba que los plástidos aún estaban presentes.

Este sorprendente resultado indica que las células de *Dinophysis* sometidas a inanición pueden efectuar una o varias divisiones celulares y llegar a durar hasta 3 meses a expensas de las reservas internas. Aunque ningún otro grupo ha mantenido tanto tiempo en ayunas un cultivo, estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Nagai y col. (2008), que observaron la desaparición de los plástidos relativamente grandes (> 5 µm de longitud) de *D. fortii* después de más de 4 semanas de cultivo sin la presa ciliado, y sólo unos pocos plástidos pequeños (0,5 a 2 µm de longitud) se mantuvieron en la región marginal de las células. Estos resultados parecen repetirse en otras especies, como *D. infundibulus* (= *D. infundibulum*) (Nishitani y col., 2008b) y *D. caudata* (Park y col., 2008), que cuando se cultivaron sin la presa ciliado por casi 2 meses, aún conservaban algunos plástidos pequeños. Recientemente, Minnhagen y col. (2011) no observaron replicación de los plástidos en *D. caudata* que fue sometida a inanición. Una posible explicación de que los dinoflagelados puedan sobrevivir durante tanto tiempo en estados de hambruna puede deberse a que realicen fotosíntesis. Sin embargo cuando se realizaron mediciones de la capacidad fotosintética se observó que ésta aporta sólo aproximadamente el 25% de la demanda total de carbono (Riisgaard y Hansen, 2009), por lo que la actividad fotosintética por si misma no permitiría el crecimiento, pero sin duda podría facilitar la supervivencia a largo plazo en los periodos de disponibilidad limitada de alimentos.

Este resultado obtenido con células en ayunas podría interpretarse como que *D. acuta* tiene plástidos permanentes de tipo *T. amphioxeia*. Si esto fuera así se podría esperar observarlos aún después de utilizar como presa un a *M. rubrum* alimentado con otra criptofita diferente como *T. gracilis* (cultivo DMG). En este cultivo, cuando la amplificación por PCR se llevó a cabo con células individuales al mes de haberse realizado el cambio de su alimentación, se detectaron tanto secuencias *psbA* de *T. amphioxeia* como de *T. gracilis*, lo que implica que ambos plástidos estaban presentes dentro de la misma célula. Sin embargo, cuando las amplificaciones se llevaron a cabo 2 meses más tarde, sólo se detectaron secuencias correspondientes a *T. gracilis*. Este resultado describe un reemplazo completo de los plástidos, el cual se llevó a cabo entre el primer y el tercer mes desde el cambio de la alimentación.

Varios autores también han descrito la presencia de plástidos polimórficos dentro de las células de *Dinophysis*. Hackett y col. (2003) observaron la presencia de plástidos de origen criptofita y de la clase Florideophyceae en células de *D. norvegica*, *D. acuminata* y *D. acuta* de muestras ambientales de Rhode Island (USA). Minnhagen y Janson (2006) describieron la presencia de plástidos de tipo *T. amphioxeia* o del tipo *Geminigera cryophila*, e incluso una combinación de ambos en la misma célula de *Dinophysis sp.* aislada del mar de Groenlandia, mientras que células de *D. miles* de China



presentaban tres tipos distintos de plástidos de origen criptofita, haptofita y cianobacterias (Qiu y col., 2011). Koike y col. (2005) encontraron que los plástidos en el dinoflagelado heterotrófico *Phalacroma mitra* se agrupaban dentro de un linaje de las haptofitas, y también en 14 células de esta especie se detectaron más de 100 diferentes secuencias de genes de origen plastidial (Nishitani y col., 2012).

Esta diversidad en el contenido de los plástidos, sin tener en cuenta la especie y la localidad, se ha usado para indicar que los plástidos en *Dinophysis* son del tipo cleptoplástido. A través de una serie de experimentos de alimentación/inanición Park y col. (2010) observaron que *D. caudata* perdía los plástidos de tipo *T. acuta* con el aumento de tiempo de inanición mientras se mantenían los plástidos de tipo *T. amphioxeia*, por lo que sugieren la posibilidad de que *D. caudata* podría tener unos plástidos de tipo *T. amphioxeia* permanentes. Sin embargo, esto también podría interpretarse como un trato diferencial de los plástidos procedentes de diferentes organismos-presa. Kim y col. (2012a) encontraron en un estudio realizado con 67 células de *Dinophysis* aisladas de aguas coreanas hasta cuatro secuencias *psbA* diferentes pertenecientes a las criptofitas *T. amphioxeia* y *T. acuta*, rafidofitas *H. akashiwo* y la clorofita *Pyramimonas* sp. en una misma célula, pero curiosamente en 66 de las células analizadas encontraron secuencias *psbA* del tipo *T. amphioxeia*. Estos resultados no hacen más que resaltar la necesidad de realizar más estudios dirigidos a determinar si los plástidos de *Dinophysis* son permanentes, cleptoplástidos o ambos, o incluso si ello depende de la especie de estudiada.

Sin embargo, el reemplazo de los plástidos no parece ocurrir en todas los cultivos efectuados. En nuestros ensayos cuando la alimentación de *D. acuta* se cambió a *M. rubrum* que había utilizado como presa las criptofitas *Falcomonas* sp. CRY1V o *Hemiselmis* sp. CRY6V (no pertenecen al grupo TPG) no se observó en *D. acuta* ninguna secuencia *psbA* correspondiente a estas criptofitas al tercer mes, a diferencia de lo observado con *T. gracilis*, y en cambio sólo se detectaron secuencias de tipo *T. amphioxeia* en ambos casos. El mismo resultado se obtuvo en los análisis realizado con *M. rubrum*. Cuando se realizaron amplificaciones de PCR en ambos cultivos de los ciliados, y al igual que en *D. acuta*, no se encontraron secuencias *psbA* de *Falcomonas* sp. o *Hemiselmis* sp.. Curiosamente, tanto en el ciliado como en los cultivos de *Dinophysis*, las secuencias detectadas correspondían a *T. amphioxeia*, lo que indica que después de seis meses no se produjo una sustitución de los plástidos en estos cultivos. Hansen et al. (2012) informaron que cuando una cepa danesa de *M. rubrum* que estaba creciendo con *T. amphioxeia* se cambió a *T. acuta*, hubo un cambio gradual en el tipo de plástido en el ciliado, y que la sustitución era relativamente lenta, requiriéndose más de 35 días para reemplazarlos completamente. Sin embargo éste no es el caso en nuestro diseño experimental, incluso después de 6 meses de haberse cambiado la criptofita que sirvió de presa. Al igual que en nuestros experimentos, la sustitución de plástidos sólo se produjo entre dos criptofitas del grupo TPG, pero curiosamente, tampoco encontraron evidencia de la sustitución de plástidos cuando *M. rubrum* fue alimentado con dos criptofitas no pertenecen al grupo TPG (*Hemiselmis tepida* y *Hanusia phi*), aunque sus cultivos no duraron más de 12 días. El análisis de micrografías de microscopio electrónico de transferencia de *M. rubrum* alimentados con *H. tepida*, les permitió observar que los plástido de nueva incorporación, una vez dentro del ciliado, fueron sometidos a digestión enzimática. Basándose en estos datos, se podría sugerir que la sepa *M. rubrum* utilizada en esta tesis podría



haber degradado los plástidos obtenidos tanto de *Falcomonas* sp. CRY1V como de *Hemiselmis* sp. CRY6V, pero mantuvo durante los seis meses los plástidos de *T. amphioxeia* que sirvieron como presa antes de comenzar los nuevos cultivos y de esta manera, estos plástidos tipo *T. amphioxeia* fueron luego adquiridos por *D. acuta*.

Este resultado plantea el interrogante acerca de la dinámica de adquisición de plástidos en *M. rubrum*. Muy poco se sabe acerca de *Mesodinium* alimentándose con criptofitas fuera del grupo TPG. Park y col. (2007) alimentó una cepa coreana de *M. rubrum* que había estado sin alimentar durante 20 días, con 4 criptofitas pertenecientes al grupo TPG y observaron tasas de crecimiento positivas. Pero cuando utilizaron como presa dos criptofitas pertenecientes al clado *Rhodomonas*, sólo con una de ellas se observó crecimiento del ciliado, lo que indica que esta cepa puede crecer alimentándose de especies no relacionadas con *Teleaulax*, si bien lo hizo a tasas bajas de crecimiento. Este resultado también fue confirmado por Myung y col. (2011). Sin embargo, estas observaciones no serían válidas para todas las cepas de *M. rubrum*; un aislado de origen danés de *M. rubrum* fue incapaz de crecer cuando fue alimentado con una cepa de *Rhodomonas salinas* (Hansen y col., 2012). Hasta el momento *M. rubrum* es el único ciliado descrito con el que ha sido posible establecer cultivos de laboratorio de *Dinophysis* (Park y col., 2006; Park y col., 2010), mostrando una marcada linealidad en la cadena trófica (*Dinophysis* spp. → *M. rubrum* → criptofita TPG). Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, se encontraron plástidos de *Dinophysis* que no pertenecen al clado TPG en células de *Dinophysis* provenientes de muestras naturales. Esto plantea el interrogante de cómo *Dinophysis* puede obtener otros plástidos, cuando los resultados disponibles de cultivos *in vitro* sugieren que sólo los secuestra si estos tienen su origen en criptofitas del clado TPG. Una posibilidad podría ser que *M. rubrum* puede adquirir cloroplastos a través de diferentes criptofitas cuando los individuos del grupo TPG no están presentes, a pesar que todos los especímenes de *M. rubrum* estudiados hasta ahora pueden crecer a largo plazo sólo alimentándose del clado TPG (Nishitani y col., 2010; Myung y col., 2011; Hansen y col., 2012). Otra posibilidad podría ser que otras especies de *Mesodinium* puedan servir como presa de *Dinophysis*; se ha descrito que *M. chamaeleon* se alimenta de una variedad de criptofitas, como *Chroomonas vectensis*, *T. amphioxeia*, *Guillardia theta*, *Hemiselmis tepida* y *Proteomonas sulcata*, aunque no permiten su crecimiento a largo plazo (Moestrup y col., 2012). Otra posibilidad consistiría en que *Dinophysis* pueda adquirir sus plástidos de ciliados mixotróficos del orden Oligotricos, como *Laboea*, *Strombidium* y *Tontonia*. (Hansen y col., 2013). Estos ciliados son generalistas en cuanto a su capacidad de secuestrar plástidos, pudiendo obtenerlos de varios grupos de algas, como las prasinofitas (Stoecker y col., 1988; Stoecker y col., 2009). En una publicación que data de 1991 se describió que *P. rotundata* podía alimentarse del ciliado *Tiarina fusus* a través del proceso de fagocitosis. Sin embargo, hasta la fecha, los intentos de llevar a cabo cultivos de *Dinophysis* con otros ciliados presa no han sido fructíferas (Hansen, 1991).



El aislado de *M. rubrum* utilizado en nuestros experimentos fue capaz de crecer con las dos criptofitas que no pertenecen al clado TPG durante los seis meses que duraron los experimentos, aunque no hubo un secuestro de sus plástidos, lo que plantea el interrogante de cómo *M. rubrum* es capaz de sobrevivir durante un período de tiempo prolongado sin adquirir nuevos plástidos. Esto podría explicarse debido a que se ha observado que *M. rubrum* es capaz de dividir sus plástidos durante la inanición (Hansen y Fenchel, 2006; Moeller y col., 2011), lo que indica que tiene algún tipo de control genético en los plástidos y explica por qué en los cultivos MCRY1V y MCRY6V aún estaban presentes plástidos del tipo *T. amphioxeia*. *M. rubrum* sólo necesita ingerir 1 célula de *T. amphioxeia* por día para lograr la máxima tasa de crecimiento (aproximadamente de $0,5 \text{ d}^{-1}$, (Smith y Hansen, 2007)), y esta ingestión representa del 1 al 2% de sus necesidades de carbono diarias. Surge la pregunta de por qué *M. rubrum* tiene que alimentarse de manera heterótrofa cuando casi la totalidad de sus necesidades de carbono se suplen mediante el proceso de fotosíntesis. Una explicación podría ser la necesidad de algunos nutrientes especiales que a través del comportamiento fototrófico no puede cumplir. Tal ingestión de células presa proporcionaría elementos que permitirían a *M. rubrum* replicar sus plástidos.

En nuestros experimentos, las secuencias del gen *psbA* detectadas en *D. acuta* tras haber estado alimentándose durante 3 meses con los diferentes cultivos de *M. rubrum* (cultivos DMT, DMG, DMCRY1V y DMCRY6V), siempre resultaron ser las mismas que las observadas en las células del ciliado (Figura 24). Basándonos en estos datos y en la información disponible, parece claro que las especies fotótrofas de *Dinophysis* adquieren sus plástidos del tipo criptofita de un ciliado presa portador, siendo *M. rubrum* el único utilizado con éxito para tal fin en cultivos de laboratorio. El ciliado, a su vez, adquiriría sus plástidos de algas criptofitas del clado TPG. Sin embargo, cuando las criptofitas presas no pertenecerían a dicho clado, el ciliado se alimentaría de ellas pero sin secuestrar los plástidos, los cuales serían degradados en vacuolas. Esta alimentación aportaría nutrientes que a través de la fotosíntesis no podría obtener, lo que le permitiría conservación de los cloroplastos en su interior hasta el encuentro de una presa del tipo TPG, momento en el que serían reemplazados.

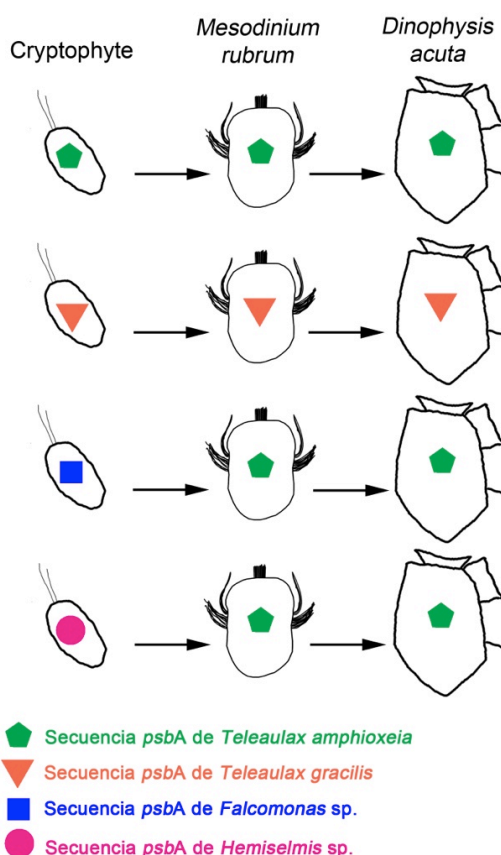


Figura 24. Representación esquemática de los resultados obtenidos del análisis del gen *psbA* de los plástidos de las líneas presa-predador de *T. amphioxeia* (verde), *T. gracilis* (naranja), *Falcomonas* sp. (azul) y *Hemiselmis* sp. (fucsia).



5.3 Estudios *in vitro* de las interacciones entre los organismos involucrados en la cadena trófica de *Dinophysis acuta*

Se utilizaron lectinas conjugadas a FITC en ensayos *in vitro* con el objetivo de determinar por primera vez los carbohidratos presentes en la superficie celular de una variedad de especies de *Dinophysis* de distinto origen geográfico, tanto en células vegetativas como en células de otros estadios del ciclo de vida. Las lectinas utilizadas se seleccionaron por su afinidad de unión específica a distintos carbohidratos. Este análisis nos ha permitido evaluar la funcionalidad de esta técnica en la tipificación de especies conflictivas del género, así como en la identificación de posibles factores involucrados en el reconocimiento presa-predador en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica de *Dinophysis*.

Con este fin, se utilizaron especies de *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii* y *D. ovum* aisladas de Huelva y las especies *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. tripos* y *D. caudata* aisladas de Vigo. En estas últimas se realizó un estudio comparativo entre los patrones de unión de las lectinas en células vegetativas y células pequeñas.

El uso de las lectinas marcadas nos permitió por primera vez describir cualitativamente la composición de la pared celular de diferentes especies de *Dinophysis*. Todas las especies analizadas parecen tener altas densidades de los hidratos de carbono D-glucosa y D-manosa en su superficie, como se manifiesta con el marcaje con la lectina ConA. Por otro lado, los hidratos de carbono más complejos como L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina son menos frecuentes, y cuando son detectados, se los observa generalmente en bajas concentraciones y concentrados en zonas determinadas de las células.

Los resultados obtenidos del análisis de micrográficas de microscopía confocal de tinciones con lectinas marcadas fluorescentemente con FITC en diferentes especies de *Dinophysis* provenientes de la región de Huelva y Vigo, sugieren que las combinaciones de lectinas podrían utilizarse para diferenciar no sólo diferentes especies de *Dinophysis*, sino también cepas de la misma especie de diferentes localidades. Por ejemplo, al comparar las intensidades y localizaciones de las tinciones de en la especie *D. acuta* de Vigo y Huelva se observaron ciertas diferencias que podrían ser utilizadas en la caracterización. En la especie de Vigo se observó marcación débil con la lectina ConA, mientras que en la de Huelva ésta fue muy fuerte. Con la lectina UEA la aislada de Vigo se marcó de forma débil y en la de Huelva no lo hizo. Con la lectina DBA la especie de Vigo no mostró fluorescencia y la de Huelva lo hizo de forma sutil. Con la lectina WGA si bien ambas células se marcaron, la localización de la señal fue diferente, observándose en toda la célula en *D. acuta* de Huelva y en el centro en la de Vigo. Con la especie de *D. caudata* también se observaron diferencias entre las localidades. Los marcajes con la lectina ConA se observaron en las células de ambas localidades, sin embargo en la de Huelva esta se distribuyó de manera homogénea, mientras que en la de Vigo se localizó en zonas más discretas. En la especie de Vigo la lectina se observó con una fuerte intensidad en toda la célula, mientras que en la de Huelva bordeó la zona de la epiteca. Con la lectina WGA las tinciones fueron en general similares, sin embargo en la especie de Huelva ésta fue más intensa. Más evidente fueron las diferencias observadas con la lectina DBA, ya que en la especie de Vigo la



tinción se observó en la epiteca, en la aleta sulcal izquierda y en puntos en la teca, y en la de Huelva se observó en el centro.

La unión diferencial de las lectinas a las superficies celulares de los dinoflagelados sugiere que esta técnica cualitativa tiene un gran potencial para la identificación de especies de estas microalgas toxigénicas.

Los resultados obtenidos también han revelado cambios en la composición de carbohidratos en las paredes celulares en los distintos estadios del ciclo de vida (Tabla 9). Por ejemplo, en *D. acuminata* de Vigo se observó un aumento en la intensidad de la lectina ConA en la célula pequeña respecto a la vegetativa, poniendo de manifiesto una mayor presencia de los carbohidratos D-manosa y D-glucosa. También se observaron cambios en los carbohidratos revelados por las lectinas UEA, WGA y DBA, destacando principalmente la presencia de L-fucosa en la célula vegetativa pero no en la pequeña. *Dinophysis caudata* también parece sufrir una modificación de los carbohidratos de la pared en los diferentes estadios del ciclo vital, observándose en las células pequeñas la ausencia de los carbohidratos L-fucosa y N-acetilgalactosamina, presentes en los estadios vegetativos.

La presencia de ciertos carbohidratos parece variar muy poco en los estadios celulares de las especies analizadas. Tal es el caso de la N-acetilglucosamina, revelada por la lectina WGA, o de los carbohidratos D-manosa y D-glucosa, revelados por la lectina ConA, que si bien variaron en intensidad en *D. acuta* y *D. acuminata*, se observaron en los dos estadios analizados.

Las lectinas se han utilizado anteriormente como sondas para la identificación de especies morfológicamente similares de dinoflagelados (Costas y Rodas, 1994; Rhodes y col., 1995; Cho y col., 1998; Cho y col., 1999a; Cho y col., 2001) poniendo de manifiesto su potencial como herramientas para la identificación de especies en los programas de vigilancia de algas nocivas. Costas y col. (1993) estudiaron los patrones de unión de lectinas en *Chroococcus* spp., *Prorocentrum lima*, *Spyrogyra* y *Zygnema* spp. concluyendo que las lectinas podían identificar clones de estos organismos, y que aunque el ciclo de división celular asexual no tuvo influencia en la actividad de unión de las lectinas, los gametos si pueden tener diferentes patrones de unión. De manera similar, Aguilera y col. (1995) describieron que la composición de carbohidratos de la superficie de la célula puede cambiar durante el ciclo celular en los dinoflagelados *Alexandrium minutum*, *Gymnodinium catenatum*, *Prorocentrum micans* y *Gyrodinium impudicum*.

La función de los glicoconjugados en la reproducción sexual puede ser mediada ya sea por cambios cualitativos o cuantitativos en su composición. Estructuras de carbohidratos específicos de los gametos pueden ser sintetizadas durante la gametogénesis, o una glicoproteína no específica de la pared celular puede aumentar en cantidad y concentrarse en áreas en las que se establece el contacto célula a célula. Kim y Kim (1999) estudiaron los patrones de unión de las lectinas ConA, WGA y SBA (aglutinina de soja) en la superficie de las gametas del alga roja *Aglaothamnion oosumiense* durante la fecundación concluyendo que los residuos de glicoconjugados estaban implicados en el proceso de reconocimiento de las gametas. También, las gametas de *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) poseen glicoproteínas de membrana específicas que se unen a WGA (Schmid y col., 1994), y (Watanabe y col., 1981) demostraron la presencia de una zona de alta



concentración de receptores de ConA en las regiones de conjugación durante el apareamiento de células de *Tetrahymena thermophila*. Sin embargo, las variaciones de glicoconjugados a lo largo del ciclo celular parecen no ocurrir en todos los organismos, ya que, por ejemplo, en *Scrippsiella lachrymosa* (*Dinophyceae*) no se pudieron advertir tales patrones de glicoconjugados específicos de manera cualitativa o cuantitativa durante el enquistamiento (Kremp y Anderson, 2004).

A pesar de los posibles inconvenientes en el uso de FITC-lectinas, éstas ofrecerían la oportunidad de la detección de especies de *Dinophysis* en tiempo real, y podrían llegar a ser herramientas útiles en los programas de seguimiento.

Los resultados obtenidos sugieren igualmente que con este tipo de análisis se podría distinguir entre diferentes especies y entre las mismas especies de procedencias distintas, lo que tiene utilidad además desde el punto de vista del estudio del origen geográfico de las especies que aparecen en una proliferación de algas. Estos estudios indican que el uso de lectinas podría permitir distinguir dichos microorganismos incluso en los estadios intermedios de su desarrollo.

5.4 Estudio de posibles factores de reconocimiento en la superficie celular de los microorganismos de la cadena trófica.

Según se ha visto existe una especificidad alta entre los diferentes componentes de la cadena trófica entre *Dinophysis* spp. y *Mesodinium rubrum*, ya que no se han observado otras presas en la dieta del dinoflagelado. A su vez, *M. rubrum* también parece tener una alta especificidad por criptofitas del grupo TPG, como *Teleaulax amphioxeia*.

Esta gran especificidad puede estar mediada por diferentes mecanismos, siendo uno de ellos el reconocimiento a través de lectinas de determinantes de superficie como los carbohidratos.

Las marcaciones con las lectinas conjugadas a FITC han revelado la presencia de los carbohidratos D-manosa, L-fucosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina en la superficie del ciliado *M. rubrum*, los cuales podrían ser reconocidos por los predadores por lectinas.

Este trabajo provee por primera vez evidencias de un posible papel de las lectinas en el reconocimiento de su presa *M. rubrum* por el predador *Dinophysis acuta*. Para ello se incubaron células de *D. acuta* con su presa *M. rubrum* con el agregado de los carbohidratos D-manosa, L-fucosa, N-acetilglucosamina y L-acetilgalactosamina y se cuantificó al cabo de tres días el número de células de la presa y el predador. Los ensayos realizados con la suplementación de los carbohidratos específicos han permitido ver variaciones en cuanto al número de presas y predadores respecto los tratamientos controles. Sin embargo, es necesario la realización de una serie de experimentos para confirmar la presencia de un mecanismo dependiente de lectinas en superficie en el reconocimiento entre *D. acuta* y *M. rubrum*. Estos experimentos se están desarrollando actualmente.



A continuación se detallan las principales conclusiones obtenidas de este trabajo:

1. Las secuencias de las regiones de los operones de rRNA analizadas (D8 a D10 del gen del 28S rRNA, el gen del 18S rRNA y los ITSs) y del gen mitocondrial *cob*, no poseen capacidad discriminatoria resultando ineficaces a la hora de resolver correctamente la adscripción filogenética de las especies de *Dinophysis* analizadas.
2. El gen mitocondrial *cox1* es el único marcador molecular de entre los analizados que discrimina entre especies. El uso de la secuencia de este gen mitocondrial ha permitido distinguir *D. acuminata* de otras especies morfológicamente cercanas que forman el llamado “complejo de *D. acuminata*” y confirmar que la denominada *D. skagii* corresponde en realidad a un cierto estadio del ciclo de vida de *D. acuminata*, por lo que no debería ser considerada como tal especie.
3. En los estudios filogenéticos realizados en este trabajo, a excepción de los que se hicieron mediante el uso del gen *cob*, las especies originalmente asignadas al género *Dinophysis* y posteriormente reasignadas al género *Phalacroma* se agruparon en ramas monofiléticas cercanas, pero diferenciadas de las de *Dinophysis*, apoyando los argumentos a favor de que *Phalacroma* es un género separado.
4. Los estudios filogenéticos basados en los genes mitocondriales o los de rRNA muestran que todas las especies del género *Dinophysis* no pueden ser adecuadamente diferenciadas mediante el uso de uno solo de los marcadores moleculares analizados y que por tanto, la identificación de especies y la determinación de las relaciones entre ellas, requieren del empleo de varios marcadores.
5. Se ha determinado la secuencia del gen plastídico *psbA* de los agentes involucrados en la cadena trófica de *D. acuta*, habiéndose demostrado su utilidad para clarificar el origen permanente o transitorio de los plástidos de esta especie.
6. Los estudios de la transferencia de plástidos en la cadena trófica de *D. acuta*, en cultivos de laboratorio, ha permitido concluir que no son permanentes y que el dinoflagelado obtiene sus plástidos de su presa, el ciliado *Mesodinium rubrum*, el cual a su vez los secuestra de algas criptofitas pertenecientes al clado TPG.
7. Se ha determinado la posible presencia de carbohidratos expuestos en la pared celular de *Dinophysis* spp mediante la utilización de lectinas conjugadas a FITC y microscopía confocal, detectándose la presencia D-glucosa y D-manosa en las envolturas de todas las especies analizadas, y de L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina solo en algunas de ellas. La composición en estos carbohidratos varía según el estadio del ciclo de vida.



8. Los resultados obtenidos sugieren que, usando este tipo de análisis con lectinas, se podría distinguir entre diferentes especies y entre las mismas especies de procedencias geográficas distintas. Igualmente podría permitir distinguir dichos microorganismos incluso en los estadios intermedios de su desarrollo.

9. Se han obtenido resultados preliminares que sugieren que los carbohidratos presentes en la superficie celular de los microorganismos involucrados en la cadena trófica podrían tener un papel en el reconocimiento presa-predador.



- Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y., 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.* 30(5), 857-863.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G.U.Y., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., Mccourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R., 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(5), 399-451.
- Aguilera, A., López-Rodas, V., González-Gil, S., Costas, E., 1995. Use of FITC-labelled lectins to identify dinoflagellates species, In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., London - New York, pp. 707-712.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on* 19(6), 716-723.
- Allen, J.I., Anderson, D.M., Burford, M., Dyhrman, S., Flynn, K., Glibert, P.M., Granéli, E., Heil, C.A., Sellner, K.G., Smayda, T.J., Zhou, M., 2006. GEOHAB: HABs in Eutrophic Systems. IOC and SCOR, Paris and Baltimore, p. 74.
- Allingham, J.S., Miles, C.O., Rayment, I., 2007. A Structural Basis for Regulation of Actin Polymerization by Pectenotoxins. *J. Mol. Biol.* 371(4), 959-970.
- Alverca, E., Biegala, I.C., Kennaway, G., Lewis, J., Franca, S., 2002. *In situ* identification and localization of bacteria associated with *Gyrodinium instriatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy. *Eur. J. Phycol.* 37, 523-530.
- Anderson, D.M., 1995. Identification of harmful algal species using molecular probes: An emerging perspective, In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., Paris, pp. 3-13.
- Anderson, D.M., 2004. Prevention, control and mitigation of harmful algal blooms: multiple approaches to HAB management, In: Hall, S., Etheridge, S.M., Anderson, D.M., Kleindinst, J., Zhu, M., Zou, Y. (Eds.), *Harmful Algae Management and Mitigation*. Asia-Pacific Economic Cooperation, Singapore, pp. 123-130.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences. *Estuaries* 25(4b), 704-726.
- Awise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Springer.
- Balech, E., 2002. Dinoflagelados tóxicos del Cono Sur Americano., In: Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B. (Eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano.*, Vigo, pp. 123-144.
- Berland, B.R., Maestrini, S.Y., Grzebyk, D., Thomas, P., 1995. Recent aspects of nutrition in the dinoflagellate *Dinophysis* cf. *acuminata*. *Aquat. Microb. Ecol.* 9, 191-198.
- Bhattacharya, D., 1997. *An introduction to algal phylogenetic and phylogenetic methods*. Springer-Verlag/Wien, Austria.



- Bhattacharya, D., Medlin, L., 1998. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiology* 116(1), 9-15.
- Bialojan, C., Takai, A., 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256, 2283-2290.
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J.-F., Vaulot, D., Simon, N., 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* ssp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.*(38), 404-411.
- Blackburn, N., Fenchel, T., Mitchell, J., 1998. Microscale Nutrient Patches in Planktonic Habitats Shown by Chemotactic Bacteria. *Science* 282(5397), 2254-2256.
- Blanco, J., Álvarez, G., Uribe, E., 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon* 49(5), 710-716.
- Bouligand, Y., Norris, V., 2001. Chromosome separation and segregation in dinoflagellates and bacteria may depend on liquid crystalline states. *Biochimie* 83(2), 187-192.
- Bozzaro, S., Bucci, C., Steinert, M., 2008. Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *International review of cell and molecular biology* 271, 253-300.
- Bravo, I., Delgado, M., Fraga, S., Honsell, G., Montresor, M., Sampayo, M.a.D.M., 1995a. The *Dinophysis* genus: toxicity and species definition in Europe, In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou- Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Paris, pp. 843-845.
- Bravo, I., Reguera, B., Fraga, S., 1995b. Description of different morphotypes of *Dinophysis acuminata* complex in the Galician Rias Bajas in 1991., In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou- Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., London - New York, pp. 21-26.
- Brinkmeyer, R., Rappé, M., Gallacher, S., Medlin, L., 2000. Development of clade- (*Roseobacter* and *Alteromonas*) and taxon-specific oligonucleotide probes to study interactions between toxic dinoflagellates and their associated bacteria. *Eur. J. Phycol.* 35, 315-329.
- Bronk, D.A., Sanderson, M.P., Mulholland, M.R., Heil, C.A., O'neil, J.M., 2004. Organic and inorganic nitrogen uptake kinetics in field populations dominated by *Karenia brevis*, In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, pp. 80-82.
- Campbell, L., Olson, R.J., Sosik, H.M., Abraham, A., Henrichs, D.W., Hyatt, C.J., Buskey, E.J., 2010. First harmful *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) bloom in the U.S. is revealed by automated imaging flow cytometry. *J. Phycol.* 46(1), 66-75.
- Cembella, A.D., 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia* 42(4), 420-447.



- Chinain, M., Faust, M.A., Pauillac, S., 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of Gambierdiscus (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. J. Phycol. 35(6), 1282-1296.
- Cho, E.S., Park, J.G., Kim, H.G., Rhodes, L.L., Chung, C.S., 1999a. The rapid differentiation of toxic *Alexandrium* and *Pseudo-nitzschia* species using fluorescent lectin probes. Journal of the Korean Society of Oceanography 34(3), 167-171.
- Cho, E.S., Rhodes, L.L., Kim, H.G., 1999b. The Morphological and Growth Characteristics of Two Strains of *Fibrocapsa japonica* Isolated from New Zealand and Japan. J.Fish.Sci.Tech. 2(1), 17-24.
- Cho, E.S., Seo, G.M., Lee, S.G., Kim, H.G., Lee, S.J., Rhodes, L.L., Hong, Y., 1998. Application of FITC-conjugated lectin probes for the recognition and differentiation of some Korean coastal red tide microalgae. J.Fishj.Sci.Tech. 1(2), 250-254.
- Cho, S.E., Park, G.J., Oh, C.B., Cho, C.Y., 2001. The application of species specific DNA-targeted probes and fluorescently tagged lectin to differentiate several species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillirophyceae) in Chinhae Bay, Korea. Sci. Mar. 65(3), 207-214.
- Cochlan, W.P., Herndon, J., Kudela, R.M., 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). Harmful Algae 8(1), 111-118.
- Cole, J.J., 1982. Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Syst. 13(1), 291-314.
- Cosson, P., Soldati, T., 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 11(3), 271-276.
- Costas, E., González-Chavarrí, E., Aguilera, A., González-Gil, S., López-Rodas, V., 1993. Use of Lectins to Recognize and Differentiate Unicellular Algae, Bot. Mar., p. 1.
- Costas, E., Rodas, V.L., 1994. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. J. Phycol. 30, 987-990.
- Costas, E., Zardoya, R., Bautista, J., Garrido, A., Rojo, C., López-Rodas, V., 1995. Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *Gymnodinium catenatum* / *Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum* / *A. lusitanicum* using antibodies, lectins, and gene sequences. J. Appl. Phycol. 31, 801-807.
- Culverhouse, P., Williams, R., Reguera, B., Herry, V., González-Gil, S., 2003. Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 247, 17-25.
- Dahl, E., Yndestad, M., 1985. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis* spp., In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 495-501.
- Dantzer, W.R., Levin, R.E., 1997. Bacterial influence on the production of paralytic shellfish toxins by dinoflagellated algae. J. Appl. Microbiol. 83(4), 464-469.
- Davis, C.C., 1948. *Gymnodinium brevis* sp. nov., a cause of discolored water and animal mortality in the Gulf of Mexico. The Botanical Gazette 109(3), 358-360.



Deeds, J.R., Wiles, K., Heideman, G.B., White, K.D., Abraham, A., 2010. First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters. *Toxicon* 55(20060850), 1138-1146.

Dittami, S.M., Riisberg, I., Edvardsen, B., 2013. Molecular probes for the detection and identification of ichthyotoxic marine microalgae of the genus *Pseudochattonella* (Dictyochophyceae, Ochrophyta). *Environmental Science and ...*

Djs, M., Ab, B., J, B., K, D., #Xfc, K, R., M, M., Jd, P., Ec, R., K, I., 2008. Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquat. Microb. Ecol.* 53(1), 83-98.

Dodd, R.B., Drickamer, K., 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11(5), 71R-79R.

Dodge, J.D., 1982. *Marine dinoflagellates of the British Isles*. HMSO, London.

Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M., Fernandez, J.J., 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56(19925818), 191-217.

Doucette, G.J., 1995. Assessment of the interaction of prokaryotic cells with harmful algal species, In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou- Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., London - New York, pp. 385-394.

Doucette, G.J., Powell, C.L., 1998. Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates?, In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 406-409.

Doucette, G.J., Trick, C.G., 1995. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium tamarense*, In: Lassus, P., Arzul, G., Erad, E., Gentien, P., Marcaillou-LeBaut, E. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Science Publ., Paris, pp. 33-38.

Doucette, T.A., Tasker, R.A., 2008. Domoic Acid: detection methods, pharmacology, and toxicology, In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. CRC Press, New York, pp. 397-430.

Edvardsen, B., Dittami, S., Groben, R., Brubak, S., Escalera, L., Rodríguez, F., Reguera, B., Chen, J., Medlin, L., 2013. Molecular probes and microarrays for the detection of toxic algae in the genera *Dinophysis* and *Phalacroma* (Dinophyta). *Environ Sci Pollut Res* 20(10), 6733-6750.

Edvardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Jakobsen, K.S., Medlin, L.K., Dahl, E., Brubak, S., Paasche, E., 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.* 39(2), 395-408.

Escalera, L., Pazos, Y., Morono, A., Reguera, B., 2007. *Noctiluca scintillans* may act as a vector of toxigenic microalgae. *Harmful Algae* 6, 317-320.

Escalera, L., Reguera, B., 2008. Planozygote division and other observations on the sexual cycle of several species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 44(6), 1425-1436.



- Escalera, L., Reguera, B., Moita, T., Pazos, Y., Cerejo, M., Cabanas, J.M., Ruiz-Villarreal, M., 2010. Bloom dynamics of *Dinophysis acuta* in an upwelling system: In situ growth versus transport. *Harmful Algae* 9(3), 312-322.
- Escalera, L., Reguera, B., Takishita, K., Yoshimatsu, S., Koike, K., Koike, K., 2011. Cyanobacterial endosymbionts in the benthic dinoflagellate *Sinophysis canaliculata* (Dinophysiales, Dinophyceae). *Protist* 162(2), 304-314.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305(5682), 354-360.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39(4), 9.
- Fensome, R.A., Saldarriaga, J.F., "Max" Taylor, F.J.R., 1999. Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. *Grana* 38, 66-80.
- Fernández, M.L., Miguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogène, J., Yasumoto, Y., 2002. Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. *Inst. Esp. Oceanogr.*
- Fernández, M.L., Reguera, B., González-Gil, S., Míguez, A., 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon* 48(5), 477-490.
- Ferrario, M., Hernández-Becerril, D.U., Garibotti, I., 2004. Morphological study of the marine planktonic diatom *Chaetoceros castracanei* Karsten (Bacillariophyceae) from Antarctic waters, with a discussion on its possible taxonomic relationships. *Bot. Mar.* 47, 349-355.
- Fleming, L.E., Backer, L.C., Kirkpatrick, B., Clark, R., Dalpra, D., Johnson, D.R., Bean, J.A., Cheng, Y.S., Benson, J., Squicciarrini, D., Abraham, W.M., Pierce, R., Zaias, J., Naar, J., Weisman, R., Bossart, G., Campbell, S., Wanner, A., Harrington, M., Van De Bogart, G., Baden, D.G., 2004. An epidemiologic approach to the study of aerosolized Florida red tides, In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, pp. 508-510.
- Flewelling, L.J., Naar, J.P., Abbott, J.P., Baden, D.G., Barros, N.B., Bossart, G.D., Bottein, M.-Y.D., Hammond, D.G., Haubold, E.M., Heil, C.A., Henry, M.S., Jacocks, H.M., Leighfield, T.A., Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Van Dolah, F.M., Landsberg, J.H., 2005. Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435(7043), 755-756.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae*, 1-13.
- Franca, S., Pinto, L., Alvito, P., Sousa, I., Vasconcelos, V., Doucette, G.J., 1996. Studies on prokaryotes associated with PSP producing dinoflagellates, In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 347-350.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Nishiwaki, S., Winyar, B., Sugimura, T., 1991. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ. Health Perspect.* 93(1663450), 211-214.



Fukami, K., Nishijima, T., Ishida, Y., 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358(1-3), 185-191.

Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., Y. Hata, T., 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 2321–2326.

Fux, E., Gonzalez-Gil, S., Lunven, M., Gentien, P., Hess, P., 2010. Production of diarrhetic shellfish poisoning toxins and pectenotoxins at depths within and below the euphotic zone. *Toxicon* 56(8), 1487-1496.

Fux, E., Smith, J.L., Tong, M., Guzmán, L., Anderson, D.M., 2011. Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon* 57(2), 275-287.

Gallacher, S., Flynn, K.J., Franco, J.M., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., 1997. Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1), 239-245.

Garcés, E., Alacid, E., Bravo, I., Fraga, S., Figueroa, R.I., 2013. *Parvilucifera sinerae* (Alveolata, Myzozoa) is a Generalist Parasitoid of Dinoflagellates. *Protist* 164(2), 245-260.

Garcés, E., Zingone, A., Montesor, M., Reguera, B., Dale, A.W., 2002. LIFEHAB: Life histories of microalgal species causing harmful blooms, In: Environment and Sustainable Development Programme, E.C. (Ed.). European Commission, Brussels, p. 189.

García-Cuetos, L., Moestrup, Ø., Hansen, P.J., Daugbjerg, N., 2010. The toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* harbors permanent chloroplasts of cryptomonad origin, not kleptochloroplasts. *Harmful Algae* 9, 25-38.

García-Varela, M., Nadler, S.A., 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40(1), 61-72.

Garrison, T., 2009. *Essentials of Oceanography*. Yolanda Cossio.

Geohab, 2006. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Harmful Algal Blooms in Eutrophic Systems, In: Glibert, P. (Ed.). IOC and SCOR, Paris and Baltimore, p. 74.

Glibert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G., 2005a. The Global Complex Phenomena of Harmful Algal Blooms. *Oceanography* 18(2), 136-147.

Glibert, P.M., Seitzinger, S., Heil, C.A., Burkholder, J.M., Parrow, M.W., Codispoti, L.A., Kelly, V., 2005b. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanography* 18(2), 198-209.

Godhe, A., Cusack, C., Pedersen, J., Andersen, D.M., Bresnan, E., Cembella, A.D., Dahl, E., Diercks, S., Elbrächter, M., Edler, L., Galluzzi, L., Gescher, C., Gladstone, M., Karlson, B., Kulis, D., Legresley, M.M., Lindahl, O., Marin, R., Mcdermott, G., Medlin, L.K., Naustvoll, L.J., Penna, A., Töbe, K., 2007. Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of cell densities. *Harmful Algae* 6, 56-72.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285(5760), 66-66.



- Gómez, F., 2005. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Bot. Croat.* 64(1), 129-212.
- González-Gil, S., Pizarro, G., Paz, B., Velo-Suárez, L., Reguera, B., 2011. Considerations on the toxigenic nature and prey sources of *Phalacroma rotundatum*. *Aquat. Microb. Ecol.* 64(2), 197-203.
- Grossart, H.-P., 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 1-11.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32(3), 234-236.
- Guillou, L., Nezan, E., Cueff, V., Erard-Le Denn, E., Cambon-Bonavita, M.-A., Gentien, P., Barbier, G., 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts. *Protist* 153(12389812), 223-238.
- Gustafson, D., Stoecker, D., Johnson, M., Van Heukelem, W., Sneider, K., 2000. Cryptophyte algae are robbed of their organelles by the marine ciliate *Mesodinium rubrum*. *Nature* 405(6790), 1049-1052.
- Hackett, J., Maranda, L., Yoon, H., Bhattacharya, D., 2003. Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). *J. Phycol.* 39(2), 440-448.
- Hackett, J., Scheetz, T., Yoon, H., Soares, M., Bonaldo, M., Casavant, T., Bhattacharya, D., 2005. Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis. *BMC Genomics* 6(1), 80.
- Hackett, J.D., Anderson, D.M., Erdner, D., Bhattacharya, D., 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* 91(10), 1523-1515-1534.
- Hackett, J.D., Tong, M., Kulis, D.M., Fux, E., Hess, P., Bire, R., Anderson, D.M., 2009. DSP toxin production de novo in cultures of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae) from North America. *Harmful Algae*(8), 873-879.
- Hallegraeff, G.M., 2004. Harmful algal blooms: a global overview, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, 2nd ed. UNESCO, Paris, pp. 25-49.
- Hallegraeff, G.M., Lucas, I.a.N., 1988. The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *Phycologia* 27(1), 25-42.
- Handy, S., Bachvaroff, T., Timme, R., Coats, D.W., Kim, S., Delwiche, C.F., 2009. Phylogeny of four Dinophysiacean genera (Dinophyceae, Dinophysiales) based on rDNA sequences from single cells and environmental samples. *J. Phycol.* 45, 1163-1174.
- Hansen, F.C., Witte, H.J., Passarge, J., 1996. Grazing in the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: size selectivity and preference for calcified *Emiliania huxleyi* cells. *Aquat. Microb. Ecol.* 10(1), 307-313.
- Hansen, P., Fenchel, T., 2006. The bloom-forming ciliate *Mesodinium rubrum* harbours a single permanent endosymbiont. *Mar. Biol. Res.* 2(3), 169-177.



Hansen, P., Moldrup, M., Tarangkoon, W., Garcia-Cuetos, L., Moestrup, Ø., 2012. Direct evidence for symbiont sequestration in the marine red tide ciliate *Mesodinium rubrum*. *Aquat. Microb. Ecol.* 66(1), 63-75.

Hansen, P.J., 1991. *Dinophysis*: a planktonic dinoflagellate genus which can act both as a prey and a predator of a ciliate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69, 201-204.

Hansen, P.J., Nielsen, L.T., Johnson, M., Berge, T., Flynn, K.J., 2013. Acquired phototrophy in *Mesodinium* and *Dinophysis* – A review of cellular organization, prey selectivity, nutrient uptake and bioenergetics. *Harmful Algae* 28(0), 126-139.

Hart, M.C., Green, D.H., Bresnan, E., Bolch, C.J., 2007. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. *Harmful Algae* 6(2), 271-287.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270(1512), 313-321.

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., De Waard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270(Suppl 1), S96-S99.

Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8(1), 3-13.

Hold, G.L., Smith, E.A., Birkbeck, T.H., Gallacher, S., 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36(2-3), 223-234.

Horiguchi, T., 1995. *Heterocapsa circularsquama* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol. Res.* 43, 129-136.

Horiguchi, T., 2006. Algae and their chloroplasts with particular reference to the dinoflagellates. *Paleontol. Res.* 10(4), 299-309.

Hou, J., Huang, B., Hu, J., Lin, L., Hong, H., 2008. Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters. *J. Appl. Phycol.* 20(1), 35-46.

Hu, T., Doyle, J., Jackson, D.M., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Chemical Communications*, 39-44.

Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6), 673-687.

Imai, H., Chang, K.-H., Kusaba, M., Nakano, S.-I., 2009. Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. *J. Plankton Res.* 31(2), 171-178.



- Imai, I., 1989. Cyst formation of the noxious red tide flagellate *Chattonella marina* (Raphidophyceae) in culture. *Mar. Biol.* 103, 235-239.
- Ishida, K.-I., Green, B.R., 2002. Second- and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: Phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. *Evolution* 99(14), 9294-9299.
- Ito, E., Suzuki, T., Oshima, Y., Yasumoto, T., 2008. Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. *Toxicon* 51(18241906), 707-716.
- Jacobson, D.M., 1999. A Brief History of Dinoflagellate Feeding Research. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(4), 376-381.
- Jacobson, D.M., Andersen, R.A., 1994. The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. *Phycologia* 33(2), 97-110.
- Jaén, D., Mamán, L., Domínguez, R., Martín, E., 2009. First report of *Dinophysis acuta* in culture. *Harmful Algae News* 39, 1-2.
- James, K.J., Bishop, A.G., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M., Yasumoto, T., 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J. Chromatogr. A* 844(1-2), 53-65.
- James, K.J., Bishop, A.G., Gillman, M., Kelly, S.S., Roden, C., Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., 1996. The diarrhoeic shellfish poisoning toxins of *Dinophysis acuta*: identification and isolation of Dinophysistoxin-2 (DTX-2). *Ecotoxicology Research Unit*, 1-13.
- Janson, S., 2004. Molecular evidence that plastids in the toxin-producing dinoflagellate genus *Dinophysis* originate from the free-living cryptophyte *Teleaulax amphioxeia*. *Environmental microbiology* 6(10), 1102-1106.
- Janson, S., Graneli, E., 2003. Genetic analysis of the psbA gene from single cells indicates a cryptomonad origin of the plastid in *Dinophysis* (Dinophyceae). *Phycologia* 42(5), 473-477.
- John, E.H., Davidson, K., 2001. Prey selectivity and the influence of prey carbon:nitrogen ratio on microflagellate grazing. *J Exp Mar Bio Ecol* 260(1), 93-111.
- Jorgensen, E., 1923. Mediterranean Dinophysiaceae. *Rep. Dan. Oceanogr. Exped.* 2(J2), 1-48.
- Jürgens, K., Güde, H., 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series* 112(1-2), 169 - 188.
- Kamikawa, R., Masuda, I., Demura, M., Oyama, K., 2009. Mitochondrial group II introns in the raphidophycean flagellate *Chattonella* spp. suggest a diatom-to-*Chattonella* lateral group II intron transfer. *Protist*.
- Kamikawa, R., Nishimura, H., 2009. Analysis of the mitochondrial genome, transcripts, and electron transport activity in the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycol. Res.*



- Kamiyama, T., Suzuki, T., 2009. Production of dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-2 by a culture of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 8(2), 312-317.
- Kavanagh, S., Brennan, C., O'connor, L., Moran, S., Salas, R., Lyons, J., Silke, J., Maher, M., 2010. Real-time PCR Detection of *Dinophysis* Species in Irish Coastal Waters. *Mar. Biotechnol.* 12(5), 534-542.
- Kellmann, R., Neilan, B.A., 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. *J. Phycol.* 43(3), 497-508.
- Kellmann, R., Stüken, A., Orr, R.J.S., Svendsen, H.M., Jakobsen, K.S., 2010. Biosynthesis and Molecular Genetics of Polyketides in Marine Dinoflagellates. *Marine Drugs* 8(4), 1011-1048.
- Ki, J.-S., Han, M.-S., 2005. Efficient 5' ETS walking from conserved 18S rDNA sequences of the dinoflagellates *Alexandrium* and *Akashiwo sanguinea* (Dinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 17(6), 475-481.
- Kim, J.H., Lee, K.J., Suzuki, T., Kang, Y.S., Ho Kim, P., Song, K.C., Lee, T.S., 2010. Seasonal Variability of Lipophilic Shellfish Toxins in Bivalves and Waters, and Abundance of *Dinophysis* spp. in Jinhae Bay, Korea. *J. Shellfish Res.* 29(4), 1061-1067.
- Kim, M., Kim, S., Yih, W., Park, M.G., 2012a. The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* can retain plastids of multiple algal origins at the same time. *Harmful Algae* 13(0), 105-111.
- Kim, M., Nam, S.W., Shin, W., Coats, D.W., Park, M.G., 2012b. *Dinophysis Caudata* (Dinophyceae) sequesters and retains plastids from the mixotrophic ciliate prey *Mesodinium Rubrum*. *J. Phycol.* 48(3), 569-579.
- Kim, S.-H., Kim, G., 1999. Cell-cell recognition during fertilization in the red alga, *Aglaothamnion oosumiense* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 398-399(0), 81-89.
- Kirchner, M., Wichels, A., Seibold, A., Sahling, G., Schütt, C., 2001. New and potentially toxic bacterial isolates from *Noctiluca scintillans* (Dinoflagellata), In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 379-382.
- Kirkpatrick, B., Colbert, D.E., Dalpra, D., Newton, E.a.C., Gaspard, J., Littlefield, B., Manire, C., 2004. Florida red tides, manatee brevetoxicosis, and lung models, In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, pp. 491-493.
- Kodama, M., 1990. Possible links between bacteria and toxin production in algal blooms, In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Amsterdam, pp. 52-61.
- Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T., Miwatani, T., 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 28(6), 707-714.
- Kofoed, C.A., Skogsberg, T., 1928. The Dinophysoideae, *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, Harvard, pp. 1-766.



- Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1981. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56(2–3), 197-204.
- Koike, K., Sekiguchi, H., Kobiyama, A., Takishita, K., Kawachi, M., Koike, K., Ogata, T., 2005. A novel type of kleptoplastidy in *Dinophysis* (Dinophyceae): presence of haptophyte-type plastid in *Dinophysis mitra*. *Ann. Anat.* 156(2), 225-237.
- Koukaras, K., 2004. *Dinophysis* blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea). *J. Plankton Res.* 26(4), 445-457.
- Kremp, A., Anderson, D.M., 2004. Lectin binding patterns of *Scrippsiella lachrymosa* (Dinophyceae) in relation to cyst formation and nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 307, 165-181.
- Kudela, R.M., Lane, J.Q., Cochlan, W.P., 2008. The potential role of anthropogenically derived nitrogen in the growth of harmful algae in California, USA. *Harmful Algae* 8, 103-110.
- Kudela, R.M., Seeyave, S., Cochlan, W.P., 2010. The role of nutrients in regulation and promotion of harmful algal blooms in upwelling systems. *Progress in Oceanography* 85(1–2), 122-135.
- Lafay, B., Ruimy, R., Rausch De Traubenberg, C., Breitmayer, V., Gauthier, M.J., Christen, R., 1995. *Roseobacter algicola* sp.nov., a New Marine Bacterium Isolated from the Phycosphere of the Toxin-Producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(2), 290-296.
- Lagos, N., 1998. Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biol. Res.* 31(10029901), 375-386.
- Lagos, N., Andrinolo, D., 2000. Paralytic shellfish poisoning (PSP): toxicology and kinetics., In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, New York, pp. 203–215.
- Lajeunesse, T.C., Lambert, G., Andersen, R.A., Coffroth, M.A., Galbraith, D.W., 2005. *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *J. Phycol.* 41(4), 880-886.
- Larsen, J., Moestrup, O., 1992. Potentially Toxic Phytoplankton 2. Genus *Dinophysis* (Dinophyceae). ICES Identification Leaflets for Plankton 180, 1-12.
- Larsen, K., Petersen, D., Wilkins, A.L., Samdal, I.A., Sandvik, M., Rundberget, T., Goldstone, D., Arcus, V., Hovgaard, P., Rise, F., Rehmann, N., Hess, P., Miles, C.O., 2007. Clarification of the C-35 Stereochemistries of Dinophysistoxin-1 and Dinophysistoxin-2 and Its Consequences for Binding to Protein Phosphatase. *Chem. Res. Toxicol.* 20(6), 868-875.
- Lassus, P., Bardouil, M., 1991. Le Complexe *Dinophysis acuminata*: Identification des espèces le long des côtes Françaises. *Cryptogamie, Algologie* 12(1), 1-9.
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., 2011. Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs, *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551*. FAO, Rome, p. 337.
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by High-Performance Liquid Chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51, 877-881.



- Lenaers, G., Scholin, C., Bhaud, Y., Saint-Hilaire, D., Herzog, M., 1991. A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrhophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8. *J. Mol. Evol.* 32(1), 53-63.
- Lewis, J., Kennaway, G., Franca, S., Alverca, E., 2001. Bacterium-dinoflagellate interactions: investigative microscopy of *Alexandrium* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* 40((3)), 280-285.
- Lin, S., 2011. Genomic understanding of dinoflagellates. *Res. Microbiol.* 162(6).
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Miranda, L., 2006a. Development of a Dinoflagellate-Oriented PCR Primer Set Leads to Detection of Picoplanktonic Dinoflagellates from Long Island Sound. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8), 5626-5630.
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Zhuang, Y., Miranda, L., 2009. High-Level Diversity of Dinoflagellates in the Natural Environment, Revealed by Assessment of Mitochondrial *cox1* and *cob* Genes for Dinoflagellate DNA Barcoding. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(5), 1279.
- Lin, S., Zhang, H., Jiao, N., 2006b. Potential utility of mitochondrial cytochrome b and its mRNA editing in resolving closely related dinoflagellates: a case study of *Prorocentrum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 42(3), 646-654.
- Lin, S., Zhang, H., Spencer, D., Norman, J., Gray, M., 2002. Widespread and extensive editing of mitochondrial mRNAs in dinoflagellates. *J. Mol. Biol.* 320(4), 727-740.
- Litaker, W.R., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Lutzoni, F.M., Yonish, B.A., West, M.A., Black, M.N.D., Tester, P.A., 2007. Recognizing Dinoflagellate Species Using Its rDNA Sequences. *J. Phycol.* 43(2), 344-355.
- Lovejoy, C., Bowman, J.P., Hallegraef, G.M., 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8), 2806-2813.
- Lucas, I.a.N., Vesik, M., 1990. The fine structure of two photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). *J. Phycol.* 26(2), 345-357.
- Mackenzie, L., 1991. Toxic and noxious phytoplankton in Big Glory Bay, Stewart Island, New Zealand. *J. Appl. Phycol.* 3, 19-34.
- Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A., 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4(1), 75-85.
- Mackenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mounfort, D., White, D., 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand, In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 74-77.
- Madl, J.E., Duncan, C.G., Stanhill, J.E., Tai, P.Y., Spraker, T.R., Gulland, F.M., 2013. Oxidative Stress and Redistribution of Glutamine Synthetase in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) with Domoic Acid Toxicosis. *J. Comp. Pathol.*



- Maki, T., Imai, I., 2001. Relationships between intracellular bacteria and the bivalve killer dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Fisheries Science* 67(5), 794-803.
- Mann, K.H., Lazier, J.R.N., 2006. Dynamics of marine ecosystems: biological-physical interactions in the oceans, 3rd ed. Blackwell Pub., Malden, MA.
- Marcaillou, C., Mondeguer, F., Gentien, P., 2005. Contribution to toxicity assessment of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 17, 155-160.
- Marín, I., Aguilera, A., González-Gil, S., Reguera, B., Abad, J.P., 2001. Genetic analysis of three species of *Dinophysis* causing diarrhetic shellfish outbreaks in Galicia (NW Spain), In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.L., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 222-225.
- Marin, I., Reguera, B., 2011. Dinoflagelados tóxicos marinos: aspectos ecológicos, sanitarios y filogenéticos. *Actualidad SEM* 51, 45-48.
- Martel, C.M., 2009. Conceptual Bases for Prey Biorecognition and Feeding Selectivity in the Microplanktonic Marine Phagotroph *Oxyrrhis marina*. *Microb. Ecol.* 57(4), 589-597.
- Martins, C.A., Alvito, P., Tavares, M.J., Pereira, P., Doucette, G.J., Franca, S., 2003. Reevaluation of production of paralytic shellfish toxin by bacteria associated with dinoflagellates of the Portuguese coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5693-5698.
- Matz, C., Jurgens, K., 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2), 814-820.
- Matz, C., Jurgens, K., 2005. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2), 921-929.
- Mazzillo, F.F.M., Ryan, J.P., Silver, M.W., 2011. Parasitism as a biological control agent of dinoflagellate blooms in the California Current System. *Harmful Algae* 10(6), 763-773.
- Mcquoid, M.R., Godhe, A., Nordberg, K., 2002. Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *Eur. J. Phycol.* 37, 191-201.
- Miles, C.O., 2007. Pectenotoxins, Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. Blackwell Publishing, pp. 159-186.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., Mackenzie, A.L., Beuzenberg, V., Towers, N.R., 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43(15037023), 1-9.
- Minnhagen, S., Janson, S., 2006. Genetic analyses of *Dinophysis* spp. support kleptoplastidy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57(1), 47-54.
- Minnhagen, S., Kim, M., Salomon, P., Yih, W., Granéli, E., Park, M., 2011. Active uptake of kleptoplastids by *Dinophysis caudata* from its ciliate prey *Myrionecta rubra*. *Aquat. Microb. Ecol.* 62(1), 99-108.



- Moeller, H.V., Johnson, M.D., Falkowski, P.G., 2011. Photoacclimation in the phototrophic marine ciliate *Mesodinium rubrum* (Ciliophora). *J. Phycol.* 47(2), 324-332.
- Moestrup, Ø., García-Cuetos, L., Hansen, P.J., Fenchel, T., 2012. Studies on the genus *Mesodinium* I: ultrastructure and description of *Mesodinium chamaeleon* n. sp., a benthic marine species with green or red chloroplasts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(1), 20-39.
- Moita, M., Sobrinho-Gonçalves, L., Oliveira, P., Palma, S., Falcao, M., 2006. A bloom of *Dinophysis acuta* in a thin layer off North-West Portugal. *Afr. J. Mar. Sci.* 28(2), 265-269.
- Molitor, C., Inthavong, B., Sage, L., Geremia, R.A., Mouhamadou, B., 2010. Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 302(1), 76-84.
- Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48, 549-552.
- Murray, S., De Salas, M., Luong-Van, J., Hallegraeff, G., 2007. Phylogenetic study of *Gymnodinium dorsalisulcum* comb. nov. from tropical Australian coastal waters (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 55(2), 176-184.
- Myung, G., Kim, H.S., Park, J.S., Park, M.G., Yih, W., 2011. Population growth and plastid type of *Myrionecta rubra* depend on the kinds of available cryptomonad prey. *Harmful Algae* 10(5), 536-541.
- Myung, G., Kim, H.S., Park, J.W., Park, J.S., Yih, W., 2013. Sequestered plastids in *Mesodinium rubrum* are functionally active up to 80 days of phototrophic growth without cryptomonad prey. *Harmful Algae* 27(0), 82-87.
- Nagai, S., Nitshitani, G., Tomaru, Y., Sakiyama, S., Kamiyama, T., 2008. Predation by the toxic dinoflagellate *Dinophysis Fortii* on the ciliate *Myrionecta Rubra* and observation of sequestration of ciliate chloroplasts. *J. Phycol.* 44(4), 909-922.
- Nagai, S., Suzuki, T., Nishikawa, T., Kamiyama, T., 2011. Differences in the production and excretion kinetics of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 between cultures of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis fortii* isolated from western Japan. *J. Phycol.* 47(6), 1326-1337.
- Nagasaki, K., 2008. Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *J Microbiol.* 46(3), 235-243.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(36), 15103-15110.
- Nielsen, L.T., Krock, B., Hansen, P.J., 2013. Production and excretion of okadaic acid, pectenotoxin-2 and a novel dinophysistoxin from the DSP-causing marine dinoflagellate *Dinophysis acuta* – Effects of light, food availability and growth phase. *Harmful Algae* 23(0), 34-45.
- Nishitani, G., Nagai, S., Baba, K., Kiyokawa, S., Kosaka, Y., Miyamura, K., Nishikawa, T., Sakurada, K., Shinada, A., Kamiyama, T., 2010. High-level congruence of *Myrionecta rubra* prey and *Dinophysis* species plastid identities as revealed by genetic analyses of isolates from Japanese coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(9), 2791-2798.



- Nishitani, G., Nagai, S., Hayakawa, S., Kosaka, Y., Sakurada, K., Kamiyama, T., Gojobori, T., 2012. Multiple Plastids Collected by the Dinoflagellate *Dinophysis mitra* through Kleptoplastidy. Appl. Environ. Microbiol. 78(3), 813-821.
- Nishitani, G., Nagai, S., Sakiyama, S., Kamiyama, T., 2008a. Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis caudata* (Dinophyceae). Plankton & Benthos Research 3(2), 78-85.
- Nishitani, G., Nagai, S., Takano, Y., Sakiyama, S., Baba, K., Kamiyama, T., 2008b. Growth characteristics and phylogenetic analysis of the marine dinoflagellate *Dinophysis infundibulus* (Dinophyceae). Aquat. Microb. Ecol. 52(3), 209-221.
- Okamoto, O.K., Hastings, J.W., 2003. Novel dinoflagellate clock-related genes identified through microarray analysis. J. Phycol. 39(3), 519-526.
- Onji, M., Nakano, S.-I., Suzuki, S., 2003. Virus-like Particles Suppress Growth of the Red-Tide-Forming Marine Dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. Mar. Biotechnol. 5(5), 435-442.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., 1996. A Mini-review of Microbial Consortia: Their Roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. Microb. Ecol. 31(3), 225-247.
- Paerl, H.W., Valdes-Weaver, L.M., Joyner, A.R., Winkelmann, V., 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Pamlico Sound system, North Carolina. Ecol. Appl. 17(sp5), S88-S101.
- Palacios, L., Reguera, B., Franco, J.M., Marín, I., 2006. Phylogenetic diversity of bacteria associated with toxic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. Harmful Algae 2004. African Journal of Marine Science 28(2), 409-414.
- Papaefthimiou, D., Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2010. Exploring the identity of the Greek *Dinophysis* cf. *acuminata*. Harmful Algae 10(1), 1-8.
- Park, J.S., Myung, G., Kim, H.S., Cho, B.C., Yih, W., 2007. Growth responses of the marine photosynthetic ciliate *Myrionecta rubra* to different cryptomonad strains. Aquat. Microb. Ecol. 48(1), 83-90.
- Park, M., Kim, S., Kim, H., Myung, G., Kang, Y., 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. Aquat. Microb. Ecol. 45, 101-106.
- Park, M.G., Kim, M., 2010. Prey specificity and feeding of the thecate mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium duplocampanaeforme*. J. Phycol. 46(3), 424-432.
- Park, M.G., Kim, M., Kim, U., Yih, W., 2010. Does *Dinophysis caudata* (Dinophyceae) Have Permanent Plastids? J. Phycol. 46, 236-242.
- Park, M.G., Park, J.S., Kim, M., Yih, W., 2008. Plastid Dynamics During Survival Of *Dinophysis caudata* Without Its Ciliate Prey. J. Phycol. 44(5), 1154-1163.
- Perez, R., Liu, L., Lopez, J., An, T., Rein, K.S., 2008. Diverse bacterial PKS sequences derived from okadaic acid-producing dinoflagellates. Mar Drugs 6(2), 164-179.



- Pizarro, G., Paz, B., González-Gil, S., Franco, J.M., Reguera, B., 2009. Seasonal variability of lipophilic toxins during a *Dinophysis acuta* bloom in Western Iberia: Differences between picked cells and plankton concentrates. *Harmful Algae* 8(6), 926-937.
- Pohnert, G., Steinke, M., Tollrian, R., 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends Ecol. Evol.* 22(4), 198-204.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7), 1253-1256.
- Potvin, M., Lovejoy, C., 2009. PCR-based diversity estimates of artificial and environmental 18S rRNA gene libraries. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56(2), 174-181.
- Puel, O., Galgani, F., Dalet, C., Lassus, P., 1998. Partial sequence of the 24S rRNA and PCR assay of the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 597-604.
- Qiu, D., Huang, L., Liu, S., Lin, S., 2011. Nuclear, Mitochondrial and Plastid Gene Phylogenies of *Dinophysis miles* (Dinophyceae): Evidence of Variable Types of Chloroplasts. *PLoS one* 6(12), e29398.
- Raho, N., Pizarro, G., Escalera, L., Reguera, B., Marin, I., 2008. Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the "*Dinophysis acuminata* complex". *Harmful Algae* 7, 839-848.
- Raho, N., Rodríguez, F., Reguera, B., Marín, I., 2013. Are the mitochondrial *cox1* and *cob* genes suitable markers for species of *Dinophysis* Ehrenberg? *Harmful Algae* 28(0), 64-70.
- Reguera, B., 1991. Las Mareas Rojas. *Boletín Agropecuario* 21, 4-13.
- Reguera, B., 2002a. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas, In: Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B. (Eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, pp. 19-54.
- Reguera, B., 2002b. Small cells in *Dinophysis* spp: a life cycle strategy for phytoplankters with a holoplanktonic way of living. *Research in Enclosed Seas- 12*, European Commission EUR20361., Luxembourg.
- Reguera, B., Bravo, I., McCall, H., Reyero, M.I., 1996. Phased cell division and other biological observations on *Dinophysis* spp populations during *in situ* cell cycle studies., In: Yasumoto, Y., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 257-260.
- Reguera, B., Garcés, E., Pazos, Y., Bravo, I., Ramilo, I., González-Gil, S., 2003. Cell cycle patterns and estimates of *in situ* division rates of dinoflagellates of the genus *Dinophysis* by a postmitotic index. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 117-131.
- Reguera, B., González-Gil, S., 2001. Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 37(2), 318-333.
- Reguera, B., González-Gil, S., Delgado, M., 2007. *Dinophysis diegensis* is a life history stage of *Dinophysis caudata* (Dinophyceae, Dinophysiales) 1. *J. Phycol.* 43(5), 1083-1093.



- Reguera, B., González-Gil, S., Delgado, M., 2004. Formation of *Dinophysis dens* Pavillard and *D. diegensis* Kofoid from Laboratory incubations of *Dinophysis acuta* Ehrenberg and *D. caudata* Saville-Kent. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, pp. 440-442.
- Reguera, B., Pizarro, G., 2008. Planktonic dinoflagellates that contain polyether toxins of the old "DSP complex", In: Botana, L.M.E. (Ed.), Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection. CRC Press, London, pp. 257-284.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., Park, M.G., 2012. Harmful *Dinophysis* species: A review. Harmful Algae 14, 87-106.
- Rhodes, L.L., Haywood, A.J., Fountain, D.W., 1995. FITC-conjugated lectins as a tool for differentiating between toxic and non-toxic marine dinoflagellates. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 29(3), 359-365.
- Riisgaard, K., Hansen, P.J., 2009. Role of food uptake for photosynthesis, growth and survival of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 381, 51-62.
- Rizzo, P.J., 1991. The enigma of the dinoflagellate chromosome. J. Protozool 38(3), 246-252.
- Robba, L., Russell, S.J., Barker, G.L., Brodie, J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). Am. J. Bot. 93(8), 1101-1108.
- Rodríguez, F., Escalera, L., Reguera, B., Rial, P., Riobó, P., De Jesús Da Silva, T., 2012. Morphological variability, toxinology and genetics of the dinoflagellate *Dinophysis tripos* (Dinophysiaceae, Dinophysiales). Harmful Algae 13(0), 26-33.
- Ruiz-Sebastián, C., O'Ryan, C., 2001. Single-cell sequencing of dinoflagellate (Dinophyceae) nuclear ribosomal genes. Mol. Ecol. Notes 1, 329-331.
- Saccone, C., Gissi, C., Lanave, C., Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A., 2000. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. Gene 261(1), 153-159.
- Saldarriaga, J.F., Taylor, F.J.R., Keeling, P.J., Cavalier-Smith, T., 2001. Dinoflagellate Nuclear SSU rRNA Phylogeny Suggests Multiple Plastid Losses and Replacements. J. Mol. Evol. 53, 204-213.
- Saunders, G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360(1462), 1879-1888.
- Saunders, G.W., Hill, D.R.A., Sexton, J.P., Andersen, R.A., 1997. Small-subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods. Springer-Verlag, Wien.
- Schafer, H., Abbas, B., Witte, H., Muyzer, G., 2002. Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms. FEMS Microbiol. Ecol. 42(1), 25-35.



Schmid, C.E., Schroer, N., Müller, D.G., 1994. Female gamete membrane glycoproteins potentially involved in gamete recognition in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Plant Science* 102(1), 61-67.

Schnepf, E., 1993. From Prey via Endosymbiont to Plastid: Comparative Studies in Dinoflagellates, In: Lewin, R. (Ed.), *Origins of Plastids*. Springer US, pp. 53-76.

Schnepf, E., Elbrächter, M., 1988. Cryptophycean-like double membrane-bound chloroplast in the Dinoflagellate, *Dinophysis* Ehrenberg: evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. *Botanica Acta* 101(2), 196-203.

Schnepf, E., Elbrächter, M., 1999. Dinophyte chloroplasts and phylogeny - A review. *Grana* 38, 81-97.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(16), 6241-6246.

Scholin, C., Miller, P., Buck, K., Chavez, F., Harris, P., Haydock, P., Howard, J., Cangelosi, G., 1997. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.* 42(5), 1265-1272.

Scholin, C.A., Anderson, D.M., 1998. Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives, In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 253-257.

Schulman, L.S., Roszell, L.E., Mende, T.J., King, R.W., Baden, D.G., 1990. A new polyether toxin from Florida's red tide dinoflagellate *Ptychodiscus brevis*, In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Amsterdam, pp. 407-412.

Schweikert, M., Meyer, B., 2001. Characterization of intracellular bacteria in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cinctum*. *Protoplasma* 217, 177-184.

Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Lévesque, C.A., Moncalvo, J.-M., Louis-Seize, G., Hebert, P.D.N., 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(10), 3901-3906.

Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14(11), 53-64.

Shrestha, R.P., Weinstein, Y., Bar-Zvi, D., Arad, S., 2004. A glycoprotein noncovalently associated with cell-wall polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *J. Phycol.* 40, 568-580.

Silva, E.S., 1982. Relationship between dinoflagellates and intracellular bacteria. *Mar. Algae Pharmac. Sci*(2), 269-288.

Silva, E.S., Sousa, I., 1981. Experimental work on the dinoflagellate toxin production. *Arq. Inst. Nac. Saude.* 6, 381-387.

Simek, K., Chrzanowski, T.H., 1992. Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11), 3715-3720.



- Simon, N., Cras, A.L., Foulon, E., Lemee, R., 2009. Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biol.* 332(2-3), 159-170.
- Slifkin, M., Doyle, R.J., 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 197-218.
- Smith, J.L., Tong, M., Fux, E., Anderson, D.M., 2012. Toxin production, retention, and extracellular release by *Dinophysis acuminata* during extended stationary phase and culture decline. *Harmful Algae* 19(0), 125-132.
- Smith, M., Hansen, P.J., 2007. Interaction between *Mesodinium rubrum* and its prey: importance of prey concentration, irradiance and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 338, 61-70.
- Sommer, H., Whedon, W.F., Kofoid, C.A., Stohler, R., 1937. Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus *Gonyaulax*. *Arch. Pathol.* 24, 537-559.
- Spector, D.L., 1984. *Dinoflagellates*. Academic Press, Inc., p. 544.
- Stahl, P.D., Ezekowitz, R.A., 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10(1), 50-55.
- Stein, F.R., 1883. *Der Organismus der Infusioneiere. III.Abt. Der organismus der Arthrodelen Flagellaten*. W. Engelmann., Leipzig.
- Stern, R.F., Andersen, R.A., Jameson, I., Küpper, F.C., Coffroth, M.-A., Vaulot, D., Le Gall, F., Véron, B., Brand, J.J., Skelton, H., Kasai, F., Lilly, E.L., Keeling, P.J., 2012. Evaluating the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Candidate Dinoflagellate Barcode Marker. *PLoS one* 7(8), e42780.
- Stoecker, D.K., Johnson, M.D., De Vargas, C., Not, F., 2009. Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquat. Microb. Ecol.* 57, 279-310.
- Stoecker, D.K., Silver, M.W., Michaels, A.E., Davis, L.H., 1988. Obligatory mixotrophy in *Laboea strobila*, a ciliate which retains chloroplasts. *Mar. Biol.* 99(3), 415-423.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallop. *Journal of Chromatography A* 815, 155-160.
- Suzuki, T., Miyazono, A., Baba, K., Sugawara, R., Kamiyama, T., 2009. LC-MS/MS analysis of okadaic acid analogues and other lipophilic toxins in single-cell isolates of several *Dinophysis* species collected in Hokkaido, Japan. *Harmful Algae* 8(2), 233-238.
- Swofford, D.L., 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tachibana, K., Scheuer, P., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Endo, V., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of American Chemical Society* 103, 2469-2471.
- Takabayashi, M., Santos, S.R., Cook, C.B., 2004. Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *J. Phycol.* 40(1), 160-164.



Takahashi, Y., Takishita, K., Koike, K., Maruyama, T., Nakayama, T., Kobiyama, A., Ogata, T., 2005. Development of molecular probes for *Dinophysis* (dinophyceae) plastid: a tool to predict blooming and explore plastid origin. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.) 7(2), 95-103.

Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M., Ruegg, J.C., 1987. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.* 217(3036577), 81-84.

Takishita, K., Ishida, K.-I., Ishikura, M., Maruyama, T., 2005. Phylogeny of the psbC gene, coding a photosystem II component CP43, suggests separate origins for the peridinin- and fucoxanthin derivative- containing plastids of dinoflagellates. *Phycologia* 44(1), 26-34.

Takishita, K., Koike, K., Maruyama, T., Ogata, T., 2002. Molecular evidence for plastid robbery (Kleptoplastidy) in *Dinophysis*, a dinoflagellate causing diarrhetic shellfish poisoning. *Protist* 153(12389818), 293-302.

Takishita, K., Uchida, A., 1999. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of *psbA* from the dinoflagellates: origin of the dinoflagellate plastid. *Phycol. Res.*

Taylor, F.J.R., 1987a. Appendix: Taxonomy and classification. Blackwell & University of California Press.

Taylor, F.J.R., 1987b. General group characteristics, special features of interest and short history of dinoflagellate study. Blackwell & University of California Press.

Taylor, M., Hellberg, M., 2003. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299(5603), 107-109.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F.D.R., Jeanmougin, F.S., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24), 4876-4882.

Tillmann, U., Reckermann, M., 2002. Dinoflagellate grazing on the raphidophyte *Fibrocapsa japonica*. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 247-257.

Töbe, K., 2002. Investigations into the role of bacteria/dinoflagellate interactions in paralytic shellfish poisoning, Xth International Conference on Harmful Algae, Petersburg, Florida, USA.

Tomaru, Y., Mizumoto, H., Takao, Y., Nagasaki, K., 2009. Co-occurrence of DNA- and RNA-viruses infecting the bloom-forming dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on the Japan coast. *Plankton and Benthos Research* 4(4), 129-134.

Touzet, N., Raine, R., 2007. Discrimination of *Alexandrium andersoni* and *A. minutum* (Dinophyceae) using LSU rRNA-targeted oligonucleotide probes and fluorescent whole-cell hybridization. *Phycologia* 46(2), 168-177.

Toyofuku, H., 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1735-1745.

Ucko, M., Shrestha, R.P., Mesika, P., Bar-Zvi, D., Arad, S.M., 1999. Glycoprotein Moiety in the Cell Wall of the Red Microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) as the Biorecognition Site for the *Cryptothecodinium Cohnii*-Like Dinoflagellate. *J. Phycol.* 35(6), 1276-1281.



- Uribe, J.C., García, C., Rivas, M., Lagos, N., 2001. First report of diarrhetic shellfish toxins in magellanic fjords, southern Chile. *J. Shellfish Res.* 20(1), 69-74.
- Vale, P., 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon* 44(2), 123-134.
- Vale, P., Sampayo, M.A., 2002. Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon* 40, 979-987.
- Vale, P., Sampayo, M.a.M., Quilliam, M.A., 1998. DSP complex toxin profiles relation with *Dinophysis* spp occurrence and domoic acid confirmation by LC-MS in Portuguese bivalves, In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 503-506.
- Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S., Kwaik, Y.A., 1997. Identification of a Gal/GalNAc Lectin in the Protozoan *Hartmannella vermiformis* as a Potential Receptor for Attachment and Invasion by the Legionnaires' Disease Bacterium. *J. Exp. Med* 186(4), 537-547.
- Wang, C.H., Wang, Y.Y., Sun, Y.Y., Xie, X.T., 2003. Effect of antibiotic treatment on toxin production by *Alexandrium tamarense*. *Biomed. Environ. Sci.* 16(4), 340-347.
- Wang, D.-Z., 2008. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Marine Drugs* 6(2), 349-371.
- Watanabe, S., Toyohara, A., Suzaki, T., Shigenaka, Y., 1981. The Relation of Concanavalin A Receptor Distribution to the Conjugation Process in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of Protozoology* 28(2), 171-175.
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E., Hammond, R., 2008. Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar Drugs* 6(19005578), 431-455.
- Wong, J.T.Y., New, D.C., Wong, J.C.W., Hung, V.K.L., 2003. Histone-like proteins of the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* have homologies to bacterial DNA-Binding proteins. *Eukaryot. Cell* June, 646-650.
- Wootton, E.C., Zubkov, M.V., Jones, D.H., Jones, R.H., Martel, C.M., Thornton, C.A., Roberts, E.C., 2007. Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. *Environmental microbiology* 9(1), 216-222.
- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., Freitas, A.S.W.D., Falk, M., Foxall, R., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J Chem* 67, 481-490.
- Wright, J.L.C., Hu, T., McLachlan, J.L., Needham, J., Walter, J.A., 1996. Biosynthesis of DTX-4: Confirmation of a Polyketide Pathway, Proof of a Baeyer-Villiger Oxidation Step, and Evidence for an Unusual Carbon Deletion Process. *J. Am. Chem. Soc.* 118(36), 8757-8758.
- Wu, A., Song, S.-C., Tsai, M.-S., Herp, A., 2001. A Guide to the Carbohydrate Specificities of Applied Lectins-2, In: Wu, A. (Ed.), *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* —2. Springer US, pp. 551-585.



Yan, T., Zhou, M., Wang, Y., Yu, R., Li, J., 2004. The toxicity study on *Heterosigma akashiwo* using an artemia bioassay, In: Hall, S., Etheridge, S.M., Anderson, D.M., Kleindinst, J., Zhu, M., Zou, Y. (Eds.), Harmful Algae Management and Mitigation. Asia-Pacific Economic Cooperation, Singapore, pp. 220-225.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J., 1985. Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron* 41(6), 1019-1025.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44(11), 1249-1255.

Yasumoto, T., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46(11), 1405-1411.

Yoon, S.H., Hackett, J.D., Bhattacharya, D., 2002. A single origin of the peridinin-and fucxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. *Mol. Biol. Evol.* 99, 11724-11729.

Zhang, H., Bhattacharya, D., Lin, S., 2005. Phylogeny of dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 41(2), 411-420.

Zhang, H., Bhattacharya, D., Maranda, L., Lin, S., 2008. Mitochondrial *cob* and *cox1* genes and editing of the corresponding mRNAs in *Dinophysis acuminata* from Narragansett Bay, with special reference to the phylogenetic position of the genus *Dinophysis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(5), 1546-1554.

Zhang, H., Lin, S., 2005. Mitochondrial Cytochrome b mRNA Editing in Dinoflagellates: Possible Ecological and Evolutionary Associations? *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(6), 538-545.

Zingone, A., Montresor, M., Marino, D., 1998. Morphological variability of the potentially toxic dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyceae) and its taxonomic relationship with *D. pavillardii* and *D. acuminata*. *Eur. J. Phycol.* 33, 259-273.