



Estudio de la abundancia y citotoxicidad del
dinoflagelado bentónico *Gambierdiscus* sp. en las islas
de Ibiza y Menorca (Islas Baleares)

Estudo da abundancia e citotoxicidade do
dinoflaxelado bentónico *Gambierdiscus* sp. nas illas
Eivissa e Menorca (Illas Baleares)

Study of the abundance and cytotoxicity of the benthic
dinoflagellate *Gambierdiscus* sp. in the islands of Ibiza
and Menorca (Balearic Islands).

Clara Bel Rojas
Tutor y cotutor externos: Jorge Diogène Fadini y David Mann
Junio 2021



Máster en
Biología
Marina



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudio de la abundancia y citotoxicidad del dinoflagelado bentónico
Gambierdiscus sp. en las islas de Ibiza y Menorca (Islas Baleares)

Estudo da abundancia e citotoxicidade do dinoflaxelado bentónico
Gambierdiscus sp. nas illas Eivissa e Menorca (Illas Baleares)

Study of the abundance and cytotoxicity of the benthic dinoflagellate
Gambierdiscus sp. in the islands of Ibiza and Menorca (Balearic Islands).

Facultad de Ciencias (Universidade da Coruña)

IRTA Sant Carles de la Ràpita

Autorizan:

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Máster realizado por Clara Bel Rojas durante el curso académico 2020-2021.

Jorge Diogene

Fadini - DNI

47873072K (SIG)

Firmado digitalmente
por Jorge Diogene
Fadini - DNI 47873072K
(SIG)

Fecha: 2021.06.24
21:00:43 +02'00'

Firmado en
2021.

, a de junio de

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor de TFM, Jorge Diogène, y a mi cotutor, David Mann, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo y por su apoyo, guía y confianza.

También agradecer la inestimable ayuda de María Rey, por orientarme y ayudarme durante todo el proceso de la realización del trabajo.

Agradecer también a todos los técnicos e investigadores de IRTA Sant Carles de la Ràpita, en especial a Núria Sagrista, Greta Gaiani y Rosa Trobajo que para determinadas tareas su ayuda ha sido imprescindible.

Realizar las prácticas y el TFM en IRTA Sant Carles de la Ràpita me ha aportado una gran satisfacción tanto a nivel académico como personal.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	5
2.1. <i>Objetivo general</i>	5
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. <i>Área de estudio</i>	6
3.2. <i>Recolección de muestras</i>	7
3.3. <i>Estimación de la abundancia de Gambierdiscus spp. y otros dinoflagelados epífitos marinos (Coolia spp., Fukuyoa sp., Ostreopsis spp. y Prorocentrum spp.)</i>	8
3.4. <i>Aislamiento celular y condiciones de cultivo</i>	8
3.5. <i>Crecimiento de Gambierdiscus</i>	9
3.6. <i>Estudio morfológico de las células cultivadas de Gambierdiscus</i>	10
3.7. <i>Obtención de pellet de cultivos de Gambierdiscus y extracción de ADN</i>	11
3.8. <i>Procedimientos de amplificación por PCR y secuenciación del ADN</i>	12
3.9. <i>Toxicidad de Gambierdiscus</i>	12
3.9.1. <i>Preparación y extracción</i>	12
3.9.2. <i>Evaluación de la toxicidad tipo CTX</i>	13
3.10. <i>Quistes</i>	14
3.10.1. <i>Inducción de quistes a partir de cultivos de Gambierdiscus sp.</i>	14
3.10.2. <i>Aislamiento de quistes de dinoflagelados marinos a partir de muestras de sedimento</i>	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. <i>Distribución y abundancia de Gambierdiscus spp. y otros dinoflagelados epífitos marinos</i>	15
De los macrófitos más abundantes en el lugar de muestreo, se tomaron tres muestras (3 tipos de macrófitos). En la Tabla 1 se muestra cuáles se recolectaron, cuantas muestras y en qué isla.....	19
4.2. <i>Crecimiento de Gambierdiscus australes</i>	22
4.3. <i>Identificación especie</i>	24
4.3.1. <i>Identificación molecular</i>	24
4.3.2. <i>Morfología de Gambierdiscus australes</i>	24
4.4. <i>Toxicidad de Gambierdiscus</i>	25
4.5. <i>Quistes</i>	27
4.5.1. <i>Inducción de quistes a partir de cultivos</i>	27
4.5.2. <i>Aislamiento de quistes de muestras de campo</i>	28
4. CONCLUSIONES	29
5. BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

Los dinoflagelados del género *Gambierdiscus* producen ciguatoxinas (CTXs) que se bioacumulan principalmente en peces y ocasionalmente en invertebrados y son responsables de la intoxicación humana conocida como intoxicación por ciguatera (CP), muy extendida en las regiones tropicales, subtropicales y recientemente algunas zonas templadas del mundo. La presencia de estas microalgas en una zona costera es una indicación del riesgo potencial de CP. En este estudio *Gambierdiscus* spp. y otros géneros de dinoflagelados potencialmente tóxicos (*Coolia* spp., *Ostreopsis* spp., *Prorocentrum* spp.) previamente considerados como asociados o potencialmente asociados a la ciguatera, fueron muestreados en las islas Baleares de Ibiza y Menorca. Se estimó su abundancia y distribución en cinco puntos de Ibiza y seis de Menorca. Se identificaron dos cepas de *Gambierdiscus* spp. también muestreadas en las dos islas como *G. australes* mediante identificación molecular y el estudio de su morfología. En las curvas de crecimiento de las dos cepas, no se observaron diferencias significativas y se mostraron curvas de crecimiento típicas en condiciones de cultivo, obtuvieron un rango de 0,12-0,13 div· día⁻¹. Se evaluó la toxicidad tipo CTX mediante un ensayo con células neuro-2a, donde las cuantificaciones de toxicidad oscilaron entre 25,28 y 59,2 fg CTX1B equiv. · célula⁻¹ con límites de cuantificación (LOQ) entre 17,86- 35,73 fg · célula⁻¹. También se intentó inducir quistes con tratamientos a distintas temperaturas y condiciones de luz, pero no se observaron. *G. australes* es una de las especies más criotolerantes del género, capaces de mantenerse vivas a menos de 15 °C. Se aislaron posibles quistes de dinoflagelados a partir de muestras de sedimento que, hasta el momento, permanecen a de 24 °C y condiciones de luz: oscuridad 12:12h con medio ES 36 ‰ a la espera de si germinan.

Palabras clave: dinoflagelado, ciguatera, *Gambierdiscus*, crecimiento, toxicidad.

ABSTRACT

Dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus* produce ciguatoxins (CTXs) that bioaccumulate mainly in fish and occasionally in invertebrates and are responsible for the human intoxication known as ciguatera poisoning (CP), which is widespread in tropical, subtropical and recently some temperate regions of the world. The presence of these microalgae in a coastal area is an indication of the potential risk of CP. In this study *Gambierdiscus* spp. and other potentially toxic dinoflagellate genera (*Coolia* spp., *Ostreopsis* spp., *Prorocentrum* spp.) previously considered to be associated or potentially associated with ciguatera, were sampled in the Balearic Islands of Ibiza and Menorca. Their abundance and distribution were estimated at five locations in Ibiza and six in Menorca. Two strains of *Gambierdiscus* spp. also sampled in the two islands were identified as *G. australes* by molecular identification and the study of their morphology. In the growth curves of the two strains, no significant differences were observed, and they showed typical growth curves under culture conditions, obtaining a range of 0.12-0.13 div · day⁻¹. CTX-like toxicity was evaluated using a neuro-2a cell assay, where toxicity quantifications ranged from 25.28 to 59.2 fg CTX1B equiv. cell⁻¹ with limits of quantification (LOQ) between 17.86- 35.73 fg cell⁻¹. Attempts were also made to induce cysts with treatments at different temperatures and light conditions, but no cysts were observed. *G. australes* is one of the most cryotolerant species of the genus, capable of remaining alive below 15 °C. Possible dinoflagellate cysts were isolated from sediment samples that, so far, remain at 24 °C and light conditions: darkness 12:12h with ES 36 ‰ medium waiting to see if they germinate.

Key words: dinoflagellate, ciguatera, *Gambierdiscus*, toxicity, growth.

1. INTRODUCCIÓN

Gambierdiscus (Adachi y Fukuyo, 1979) (Dinophyceae) son dinoflagelados marinos bentónicos que crecen en hábitats de aguas poco profundas (<50 m), y se ha descrito que proliferan donde las temperaturas anuales oscilan entre 21°C y 31°C (el óptimo entre 23°C y 29°C) (Litaker *et al.*, 2010), con salinidades altas y estables y niveles de luz del 10% de la luz incidente. Viven adheridos a diferentes sustratos como macroalgas, corales, rocas y arenas (Kibler *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2013; Tudó *et al.*, 2020). Existe una gran variabilidad en estas características, lo que probablemente refleja las diferencias específicas de cada especie (Litaker *et al.*, 2010).

En la actualidad, el género *Gambierdiscus* cuenta con 16 especies descritas, con su identificación genética, incluido el ribotipo relativo, vinculada a la descripción morfológica correspondiente. (Adachi y Fukuyo, 1979; Faust, 1995; Chinain *et al.*, 1999; Litaker *et al.*, 2009; Fraga *et al.*, 2011; Aligizaki *et al.*, 2010; Kuno *et al.*, 2010; Nishimura *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2015; Nishimura *et al.*, 2014; Fraga y Rodríguez, 2014; Fraga *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2018). Dos antiguas especies de *Gambierdiscus*, *G. ruetzleri* Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland y Testerand, y *G. yasumotoi* M.J. Holmes, fueron transferidas al nuevo género *Fukuyoa* Gomez, Qiu, Lopes y Lin (Gomez *et al.*, 2015), junto con una tercera especie, *F. paulensis* Gomez, Qiu, Lopes y Lin.

Gambierdiscus, se notificó por primera vez en regiones tropicales y subtropicales del Mar Caribe, el Pacífico y el Océano Índico, pero más recientemente, también en regiones templadas- cálidas. En las Islas Canarias (Fraga *et al.*, 2011), en zonas como la isla de Creta, donde se constituye el primer registro de este género en el Mar Mediterráneo (Aligizaki y Nikolaidis, 2008), y las Islas Baleares, donde se detectó *G. australes* (Tudó *et al.*, 2018). También en el océano Atlántico noroccidental (Litaker *et al.*, 2009), el Atlántico sudoccidental (Nascimento *et al.*, 2015), el mar Rojo (Catania *et al.*, 2017), el mar de Japón (Jang *et al.*, 2018) y el océano Pacífico Sur (Kohli *et al.*, 2014).

Gambierdiscus es un género que produce múltiples metabolitos secundarios, entre los que se incluyen las ciguatoxinas (CTXs) (Chinain *et al.*, 2010), poliéteres lipofílicos que se unen a los canales de sodio activados por voltaje (VGSC), inhibiendo así el proceso de su inactivación y provocando de esta forma un aumento del sodio intracelular (Hidalgo *et al.*, 2002; Nicholson

y Lewis, 2006). Además, las CTXs son inhibidores de los canales de potasio (Inserra et al., 2017). Las CTX en peces o invertebrados son responsables de la intoxicación humana conocida como intoxicación por ciguatera (CP) (Ragelis, 1984; Bagnis, 1993), muy extendida en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Yoshimatsu et al., 2014). Estas toxinas entran en la red trófica a través del pastoreo de herbívoros y detritívoros, se biotransforman a lo largo de las redes alimentarias y se bioacumulan en diferentes niveles tróficos, llegando finalmente a los humanos (Yasumoto et al., 1977; Bravo et al. 2019). Se estima que la CP afecta entre 25.000 y 500.000 personas al año (Bagnis, 1993). Los síntomas de intoxicación pueden ser muy diversos y parecen depender de una combinación de la cantidad de toxina consumida, el conjunto de toxinas presentes en el pescado contaminado y la susceptibilidad del individuo. Los más comunes incluyen alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares y neurológicas. En algunos casos, las alteraciones neurológicas y cardiovasculares pueden durar meses o años (Friedman et al., 2017). Se ha establecido una relación entre el aumento de las temperaturas del mar y la aparición la ciguatera, ya que los mayores casos de ciguatera se registran en zonas de temperaturas del agua más cálidas (Tester et al., 2010; Parsons 2012). En el Mar Mediterráneo, no se ha demostrado la presencia de CTX en los peces, ni casos confirmados de CP (Tudó et al., 2020).

Por todo esto, el aislamiento y el cultivo de especies tóxicas de *Gambierdiscus* es deseable para obtener fuentes fiables de toxinas responsables de la intoxicación por ciguatera de los peces (CFP) con el fin de proporcionar materiales de referencia y estándares purificados para los análisis químicos y los bioensayos (Rhodes et al., 2014).

A parte de CTXs, *Gambierdiscus* también puede producir otras toxinas, como el ácido gambierico, el gambierol y las maitotoxinas (MTXs) (Fraga et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estimar la abundancia y distribución de *Gambierdiscus* en varios puntos de las islas de Ibiza y Menorca, y evaluar el crecimiento y la toxicidad de varias cepas de *Gambierdiscus australes*.

2.2. *Objetivos específicos*

- Estimar la abundancia de cinco dinoflagelados marinos (*Fukuyoa* sp., *Gambierdiscus* sp., *Coolia* sp., *Ostreopsis* sp. y *Prorocentrum* sp.) y su distribución en varios puntos de las islas de Ibiza y Menorca.
- Evaluar la dinámica de crecimiento de dos cepas de *G. australes* para el cálculo de la abundancia celular (células · mL⁻¹), la tasa de crecimiento (r) de cada réplica (expresada en unidades de divisiones · día⁻¹), las duplicaciones por día (K; duplicaciones · día⁻¹) y el tiempo de duplicación (Td; días⁻¹).
- Identificar la especie: caracterizar morfológica y genéticamente tres cepas de *Gambierdiscus* sp.
- Evaluar la toxicidad tipo CTX (responsables de la intoxicación por ciguatera) mediante un ensayo de exposición de estas toxinas a células neuro-2a.
- Inducir la formación de quistes sometiendo a cultivos de *Gambierdiscus* sp. a distintas temperaturas e intensidad de luz y también modificando el medio.
- Aislar quistes de dinoflagelados marinos a partir de muestras de sedimento de las Islas Baleares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. *Área de estudio*

Ibiza (38°59'N 1°26'E) y Menorca (39°58'00"N 4°05'00"E) son dos islas pertenecientes al archipiélago balear situadas en el mar Mediterráneo, frente a la costa oriental de la Península Ibérica (E3°1'46.13" N39°36'35.71") (Figura 1). Este archipiélago presenta una estrecha plataforma continental que rodea una costa rocosa, con ocasionales praderas de hierbas marinas sobre un fondo fangoso biogénico (Tudó et al., 2020). Este estudio se va a centrar en muestras tomadas en 5 puntos de la isla de Ibiza (Cala Longa, Cala Llenya, Cala San Vicente, Cala Salada, Porroig) y 6 puntos en la isla de Menorca (Sa Caleta, Sant Adeonat, Cala Torrent-Binibeca, Na

Macaret, Cala Viola, Cala Morell). También se usó una muestra de Ibiza tomada en octubre de 2018 para el proyecto EuroCigua.



Figura 1. Estaciones de muestreo en las Islas Baleares (Mar Mediterráneo). Puntos de muestreo de Ibiza: 1) Cala Longa, 2) Cala Llenya, 3) Cala San Vicente, 4) Cala Salada, 5) Porroig; Puntos de muestreo de Menorca: 1) Sa Caleta, 2) Sant Aeonat, 3) Cala Torrent-Binibeca, 4) Na Macaret, 5) Cala Viola, 6) Cala Morell.

3.2. *Recolección de muestras*

Las muestras de este estudio fueron recolectadas por el equipo de IRTA Sant Carles de la Ràpita y forman parte del proyecto CIGUARISK (actualmente en curso).

Durante el mes de octubre de 2020, en Ibiza y Menorca el agua se encontraba a una temperatura de entre 19,03°C y 22,6°C, cerca de las temperaturas óptimas para las especies de *Gambierdiscus*. En cada punto de muestreo, se recogieron tres tipos de muestras: de 3 macroalgas distintas, raspado de roca y sedimento, a 1-6 m de profundidad. Las macroalgas fueron identificadas morfológicamente en el campo a nivel de género y, más tarde, a nivel de especie. Cada muestra fue suavemente recogida para evitar el desprendimiento de

dinoflagelados con una botella de plástico y se agitó manualmente en 850-1750 mL para que se liberasen los dinoflagelados asociados a los sustratos. Después, se tamizó a través de mallas de 300 μm para eliminar los materiales gruesos y se almacenaron 125 mL en dos botellas. Una botella sin tratar para posteriormente poder aislar las células vivas y otra donde se añadió solución de lugol al 3% para su observación en el laboratorio. A parte de la temperatura y salinidad, también se registraron el pH y el oxígeno (% y $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) utilizando una sonda multiparamétrica y se registraron las coordenadas. Las muestras se transportaron al laboratorio, donde las botellas que contenían lugol se guardaron en una cámara a 5°C y las muestras sin tratar se incubaron a 23-24°C y un periodo de luz: oscuridad 12:12 h.

3.3. *Estimación de la abundancia de Gambierdiscus spp. y otros dinoflagelados epífitos marinos (Coolia spp., Fukuyoa sp., Ostreopsis spp. y Prorocentrum spp.)*

Las especies de *Gambierdiscus* muestran preferencia por los macrófitos algales (Ballantine et al., 1985). Por eso, desde finales de la década de 1970 se emplea una metodología estandarizada para estimar la abundancia de *Gambierdiscus* basada en el muestreo de macrófitos (Yasumoto et al., 1980), explicada en el punto (3.2.). Al mismo tiempo, las macroalgas se secan con papel de filtro y se pesan para que las densidades celulares de *Gambierdiscus* puedan expresarse como células $\cdot \text{g}^{-1}$ peso húmedo (*blotted dry weight*) de las algas.

Para la estimación de la abundancia de estos géneros de dinoflagelados (Figura 5), se tomaron las muestras almacenadas a 5°C ya fijadas con lugol 3% y se usó el método de Utermohl (1958) para sedimentarlas. Se sedimentó 10 ml de cada muestra durante mínimo 10 h, añadiendo una o dos gotas de calcofluor (Sigma) para poder visualizarlo con facilidad y poder hacer el recuento con la ayuda de un microscopio de fluorescencia invertido. Previo a la sedimentación, las muestras se aclimataron.

3.4. *Aislamiento celular y condiciones de cultivo*

El aislamiento y el cultivo de especies tóxicas de *Gambierdiscus* es deseable para obtener fuentes fiables de toxinas responsables de la intoxicación por ciguatera de los peces (CFP) con el fin de proporcionar materiales de referencia y estándares purificados para los análisis químicos y los bioensayos. (Rhodes et al., 2014)

Los aislamientos se realizaron, a partir de las muestras de campo sin tratar almacenadas a 23-24°C, lo más rápido posible en un periodo de tres semanas tras el transporte. Se observaron las muestras bajo un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) y se aislaron células de *Gambierdiscus* por el método capilar (Hoshaw y Rosowski, 1973) para realizar cultivos clonales. Primero, se aisló cada célula, eliminando cualquier otra célula microalgal diferente antes de hacer la transferencia final, donde cada célula se inoculó en un pozo de una placa de cultivo (Nunc) de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific) que contenían un 1 mL de medio ES (Provasoli, 1968) modificado.

Para la preparación de este medio, primero hay que elaborar los stocks primarios usados para enriquecer el agua de mar natural. Se basa en una solución de nitratos (NaNO₃), fosfatos (HNa₂PO₄), metales (EDTA, Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo) y vitaminas (Tiamina, Biotina, Vitamina B12). Estos se preparan por separado; se pesan los componentes y se disuelven en agua milli-Q autoclavada en una placa agitadora aplicando calor. Cuando ya están disueltos, dentro de la cabina de flujo laminar, se filtran y se guarda la solución en tubos estériles para almacenarlos en el congelador a -80 °C. Para la preparación del medio, se sacaron los stocks primarios del congelador unas horas antes y se añadieron en agua de mar natural estéril volúmenes determinados para tener la concentración adecuada en el medio de cultivo. El agua de mar se ajustó a una salinidad de 36. Las botellas con el medio se almacenaron a 4 °C.

Después de 2-3 semanas, las células que se encontraban en los pocillos de la placa de cultivo se transfirieron a tubos de vidrio de fondo redondo de 28 mL (Thermo Fisher Scientific) donde había 10 mL de medio. En cuanto a las condiciones en que se mantienen los cultivos, deben estar en cámaras a una temperatura, luz y humedad determinadas. En caso de los cultivos con los que se trabajó en este estudio, a una temperatura de $24 \pm 0,5$ °C, que entra dentro del rango de temperatura óptima para *Gambierdiscus* (Yoshimatsu et al., 2014), y una iluminación en un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 h por tubos fluorescentes de luz blanca y con una intensidad de luz de 70 $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ medida con un luxómetro (Tempel Group).

3.5. Crecimiento de *Gambierdiscus*

Para el análisis de la dinámica de crecimiento, se seleccionaron dos cepas de *G. australes* (IRTA-CC-143: aislada de una muestra tomada en Sant Adeonat, Menorca, en 2018; IRTA-CC-296: aislada de una muestra tomada en Cala Longa, Ibiza, a finales de octubre de 2020) de la

colección de algas. Estas cepas, que estaban en tubos de vidrio de fondo redondo de 28 mL (Thermo Fisher Scientific) con el mismo medio y condiciones comentadas anteriormente, primero se escalaron a frascos de cultivo celular de 50 mL (Thermo Fisher Scientific) y se dejaron crecer durante 3-4 semanas. Después de este tiempo, se calculó el volumen necesario que había que tomar de cada cepa para inocular un nuevo cultivo con una concentración inicial de $100 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ en 500 mL de medio ES modificado (ES36 ‰) en frascos Fernbach de 1,5 L, por triplicado. Se usaron Fernbach porque estos presentan una superficie grande, preferible para el crecimiento de *Gambierdiscus*.

Cada 3-4 días, a la misma hora, se realizaron cuatro recuentos de cada réplica. Para los muestreos, se homogeneizó manualmente el cultivo agitando el frasco 20 veces y también con la ayuda del pipeteador Pipetus (Hirschmann), aspirando y liberando el cultivo con una pipeta estéril, con cuidado de no dañar las células, para que las que se encontraban en el fondo del frasco se desprendieran. Se pipeteó dos veces 1,1 mL de cada réplica (entre cada pipeteado se volvió a homogeneizar) con una micropipeta automática, transfiriendo cada pipeteado en diferentes tubos Eppendorf de 1,5 ml (Thermo Fisher Scientific) y conservándolo con solución de yodo de Lugol al 3%. Después, de cada uno de estos tubos Eppendorf, se realizaron 2 recuentos bajo observación en un microscopio de luz invertido (Nikon Eclipse TS100) utilizando una cámara de recuento Kolkwitz de 0,5 mL (Hydro-bios, Altenholz, Germany). La razón por la cual se tomaron 1,1 mL fue porque al tener que hacer 2 recuentos (de cada Eppendorf) y al ser la cámara de recuento de 0,5 mL, tomar 1 mL hubiese sido muy justo.

Para cada día y réplica, se estimó la media de la abundancia celular ($\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$) y la desviación típica (SE). A partir de las curvas de crecimiento de cada réplica y tomando la fase exponencial, también se calculó la tasa de crecimiento (r) (expresada en unidades de divisiones $\cdot \text{día}^{-1}$) y las duplicaciones por día (K) (duplicaciones $\cdot \text{día}^{-1}$) (Guillard, 1973). También se definieron distintas fases de crecimiento (fase de latencia, fase exponencial o logarítmica y fase estacionaria).

3.6. Estudio morfológico de las células cultivadas de *Gambierdiscus*

El estudio morfológico se realizó primero hasta nivel de género a partir de las muestras (ver apartado 3.2). Una vez aisladas las células, se identificaron mediante análisis genético. Cuando los cultivos pasaron los ± 20 días, las células se tiñeron con calcofluor (Fritz y Triemer,

1985). Las medidas de las células microalgales se basaron en el sistema de tabulación descrito en Fraga et al. (2014). Se midieron la longitud de la célula (D) refiriéndose a la distancia ventral-dorsal, la anchura celular (W) como la distancia transdiamétrica que es la distancia más larga entre los lados opuestos del cingulo, por otra parte, teniendo en cuenta la segunda placa antiapical (2'''), su longitud (L) y su anchura (W). Las dimensiones de las células se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). Estas medidas se realizaron sobre fotografías sacadas con un microscopio de epifluorescencia (LEICA DMLB y Nikon Eclipse TE2000- S) equipado con una cámara Olympus (Olympus DP70), y se midieron con el software ImageJ.

Para la caracterización morfológica, las cepas fueron aclimatadas para evitar la variación inducida por el estrés durante el periodo de adaptación a las condiciones de laboratorio (Bomber et al., 1989).

3.7. Obtención de pellet de cultivos de *Gambierdiscus* y extracción de ADN.

Los cultivos en crecimiento exponencial de las cepas nombradas anteriormente, IRTA-CC-143 y IRTA-CC-296 de *G. australes*, se agitaron suavemente y se cosecharon en tubos Falcon de centrifuga de 50 mL (Thermo Fisher Scientific). Se añadió lugol 3% y se centrifugaron inmediatamente a 2500 rpm, durante 25 minutos a 20° C. Al terminar, se descartó el sobrenadante hasta dejar 2 mL, se resuspendió, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. Se guardaron los pellets en tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 ml (Thermo Fisher Scientific) y se almacenaron a -20 °C. (Fraga et al., 2016).

Se utilizó el mini Kit Invitrogen (Thermofisher) para la extracción de ADN. Se sacaron las muestras de pellet que estaban a -20 °C en el congelador para que se descongelaran.

Para la *rotura de células*, se añadieron 200 μ l de tampón de lisis BBL (1M NaCl + 70Mm Tris + 30Mm EDTA pH 8,0) en el Eppendorf y se resuspendieron los pellets pipeteando. Después estos se pasaron a tubos de rosca cónicos de 2 mL donde se habían puesto Dynabeads, gránulos magnéticos que atrapan el ADN. Estos tubos se introdujeron en un homogeneizador Mini-Beadbeater 30 - 40 segundos y después se centrifugaron a 3700 rpm durante 1 minuto. Todo el sobrenadante se pipeteó en un Eppendorf y se descartó con las Dynabeads dentro. En el Eppendorf donde se tiene el sobrenadante, se añadió 200 μ l de Dynabeads DNA direct (invitrogen/marrón) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo,

se pusieron los tubos Eppendorf en una gradilla magnética durante 2 min, se sacó y eliminó el sobrenadante. Se colocaron los Eppendorf con el pellet en una gradilla “normal” donde se añadieron 200 µl de tampón de lavado. Se volvieron a introducir en la gradilla magnética y se eliminó otra vez el sobrenadante. Los dos pasos anteriores se repitieron de nuevo, y una vez lavado se le añadió 30 µl de tampón de resuspensión (del kit usado). Después de homogeneizar, se añadieron los Eppendorfs en el Thermoblock (con agua) y se incubó a 65 °C durante 5 min. Se volvió a introducir en la gradilla magnética para coger el sobrenadante (ADN). Se guardó a -20 °C (Reverté et al., 2018).

Tras la extracción, se cuantificó el ADN genómico y se comprobó su pureza con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20 °C (Tudó et al., 2020).

3.8. *Procedimientos de amplificación por PCR y secuenciación del ADN*

Se amplificó la región D1-D3 por PCR utilizando los cebadores D1R y LSU B (Litaker et al., 2009; Fraga et al. 2011). Cada mezcla de reacción de 25 µL contenía dNTPs, MgCl₂, primers (forward y reverse), Taq polimerasa, DMSO y ADN. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente Mastercycler Nexus (Eppendorf, España) donde estuvieron 2 horas en ciclos de 95 °C iniciales, 50 °C y 70 °C. Cada reacción de PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, donde en pocillos se añadió el ADN Ladder y ADN con tinción para poder visualizarlo. Los productos purificados fueron enviados para ser secuenciados por una empresa externa (Sistemas Genómicos, LLC, Valencia, España). Las secuencias consenso obtenidas a partir de ambas lecturas para cada cepa se editaron manualmente utilizando BioEdit v7.0.5.2 y se depositaron en GenBank (Tudó et al., 2020).

3.9. *Toxicidad de Gambierdiscus*

3.9.1. *Preparación y extracción*

Las cepas anteriormente mencionadas (IRTA-CC-143 y IRTA-CC-296) y una tercera (IRTA-CC-218), se cultivaron para la caracterización de CTXs en frascos Fernbach de 1,5 L y en botellas de vidrio de 5 L. Se cultivaron 4 réplicas de cada cepa (3 cultivos de 1L y 1 cultivo de 4 L) bajo un régimen de luz: oscuridad 12:12 h en medio ES (Provasoli, 1968) y 36 ‰. Cuando los cultivos llegaron a la fase estacionaria temprana, se agitaron manualmente para

soltar las células que estaban pegadas al fondo y se filtraron a través de filtros de nylon de 10 μm para cosechar las células. Estos filtros se guardaron con metanol en viales de vidrio y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Antes de filtrar, se tomaron alícuotas de cada réplica y se fijaron con lugol para calcular la concentración celular con una cámara de recuento Kolkwitz de 0,5 mL bajo el microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100).

Para la extracción, se colocaron los viales (con los filtros y el MeOH) durante 1 hora en un baño ultrasónico Branson 5510 (Thermo Fisher Scientific) para que las células se desprendieran de los filtros. Una vez lavados los filtros, las células junto con el MeOH se extrajeron cuatro veces: tres veces en MeOH bajo sonicación 15 min y centrifugación a $600 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. La última extracción se realizó con el mismo proceso, pero con MeOH: H₂O, y se almacenó en otro recipiente a parte. Se evaporaron los extractos en el Buchi (Thermo Fisher Scientific) a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a un volumen final de MeOH y MeOH: H₂O aproximado a los 4 mL. Finalmente, se filtró a través de filtros de jeringa de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ PTFE y se almacenó en viales de 4 mL dentro del congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Fraga et al. 2016, Reverté et al., 2018)

3.9.2. Evaluación de la toxicidad tipo CTX

Se evaluó la presencia de actividad de las CTXs mediante el ensayo de exposición de células N2a y NG108-15 (neuroblastoma de ratón) con O/V (ouabaína/veratridina) a extractos de *G. australes*. Este ensayo se utiliza para detectar compuestos bioactivos dirigidos a los canales de sodio activados por voltaje (VGSC) (Cañete y Diogène, 2008; Reverté et al., 2018). La exposición de las células neuro-2a a los extractos de *G. australes* se realizó siguiendo el protocolo descrito en Reverté et al. (2018). Las células neuro-2a se sembraron en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Después de 24 horas, se añadieron ouabaína y veratridina (O/V) a una concentración final de $140\text{ }\mu\text{M}$ y $14\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente, y luego se añadieron $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada muestra (diluciones seriadas de los extractos de *G. australes*) a cada pozo por triplicado. Después de 24 horas, se midió la viabilidad de las células. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un espectrómetro de placa automatizado (Synergy HT, Biotek, USA) (Cañete y Diogène, 2008; Tudó et al., 2020).

De esta forma, para cada ensayo se obtuvo una curva de calibración de la viabilidad celular con el estándar. Se crearon curvas dosis-respuesta (Figura 7) utilizando el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., EE. UU.) (Reverté et al., 2018).

3.10. *Quistes*

La descripción y clasificación de los quistes de dinoflagelados se basan en las características de la pared y el período de latencia, que es el período en el ciclo de vida de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y la actividad física se suspenden temporalmente por inhibición. Anderson y Wall (1978) describieron dos tipos de formas bentónicas en el ciclo de vida de los dinoflagelados; un quiste de doble pared, considerado como un quiste latente en reposo con un período de latencia obligatorio, y un quiste no inactivo (es decir, sin un período de inactividad obligatorio), con una pared delgada de una sola capa, denominado como un quiste ecdisal, de película o temporal. Sin embargo, estudios más recientes han revelado que algunos dinoflagelados producen quistes asexuales en reposo y que las etapas del ciclo de vida tanto sexual como asexual pueden conducir a la formación de quistes ecdisales) (Figueroa et al., 2006).

3.10.1. *Inducción de quistes a partir de cultivos de Gambierdiscus sp.*

Para la inducción de quistes se seleccionaron tres cepas de *Gambierdiscus* sp. (IRTA-CC-225, IRTA-CC-263, IRTA-CC-266). Para los tratamientos a distintas temperaturas (10°C, 18°C, 24°C: el control, 29± °C) y a distinta intensidad de luz (de luz: oscuridad 12:12h (control), “low light” y oscuridad), cada cepa se inoculó en 2 pozos distintos de una placa de cultivo (Nunc) de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific) que contenían un volumen de 8 mL de medio ES (Provasoli, 1968), con salinidad de 36. Se monitorizaron cada 4-5 días en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100). En caso de observar células consideradas como quistes putativos, estos se aislarían y transferirían en placas de cultivo (Nunc) de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific) con medio ES 36‰ (Provasoli, 1968) (Fraga et al., 2016).

3.10.2. *Aislamiento de quistes de dinoflagelados marinos a partir de muestras de sedimento*

A partir de las muestras de sedimento tomadas en las islas de Ibiza y Menorca (3.2) y almacenadas a 4-5°C en la oscuridad para evitar la germinación de los quistes, se siguió el

protocolo descrito por Matsuoka y Fukuyo (2000), modificando algunos pasos. Se procesaron submuestras de 2 cm de sedimento de la capa más superficial. A este sedimento, se le añadió agua de mar filtrada y se sonicó durante 1-2 min al mínimo de potencia. De esta forma, los quistes se desagregan, se rompen los aglomerados. Las muestras se vertieron por varios tamices, desde el de mayor apertura de malla (250 μm), a uno intermedio de 80 μm y finalmente a el de menor (20 μm).

Con el resto de submuestra que se queda en la malla de 20 μm , se separaron las partículas pesadas de las ligeras (donde pueden estar los quistes de dinoflagelados). Se prepararon soluciones de politungstato de sodio (SPT) según las instrucciones del fabricante: a una densidad de aproximadamente 2,4 g cm^{-3} , disolviendo 75 g de SPT en 25 ml de agua Milli-Q. La suspensión de agua de mar/sedimento se colocó en capas sobre la solución de SPT (3 mL) teniendo cuidado de no perturbar la interfaz de densidad. Los gradientes completados se centrifugaron a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la interfaz podía reconocerse debido a la acumulación de material orgánico y quistes. El material recuperado se pipeteó directamente en un tubo nuevo y se centrifugó a 1000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y lo restante que es donde se supone que deberían estar los quistes. Se transfirió a una placa de Petri con un poco de agua de mar filtrada y se observó bajo el microscopio inverso (Nikon Eclipse TS100) (Bolch, 1997).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Distribución y abundancia de *Gambierdiscus* spp. y otros dinoflagelados epífitos marinos

En la isla de Ibiza se identificaron *Gambierdiscus* spp. en los cinco puntos de muestreo, aunque los patrones de abundancia variaron significativamente (Figura 3). El punto donde se registró una mayor abundancia media fue en Cala Longa, donde se obtuvo un valor de 102 células $\cdot \text{g}^{-1}$ peso húmedo macrófito. *Gambierdiscus* spp. presentó una abundancia relativa del 19,2% en este punto (Figura 2)

Por el contrario, donde se registró la abundancia más baja fue en Porroig, con 18 células $\cdot \text{g}^{-1}$ peso húmedo macrófito. Por lo general, en Ibiza *Gambierdiscus* spp. juntamente con *Fukuyoa* spp., fueron los géneros con menor abundancia media presentaron. Éste último, no se

observó ni en Cala Llenya ni en Cala Salada y su mayor abundancia media fue en Porroig con 9 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito. En los dos puntos restantes, Cala Longa y Cala San Vicente, apenas llegó a 1 célula· g⁻¹ peso húmedo macrófito.

En cuanto a *Prorocentrum* spp., *Coolia* spp. y *Ostreopsis* spp., los tres registraron una mayor abundancia en Cala Salada (637 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito, 499 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito y 1919 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito, respectivamente) (Figura 3).

El punto de Ibiza con mayor abundancia total de dinoflagelados fue en Cala Salada, con un total de 3.134 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito. El dinoflagelado más abundante fue *Ostreopsis* spp., representando un 61 % del total muestreado (Figura 2).

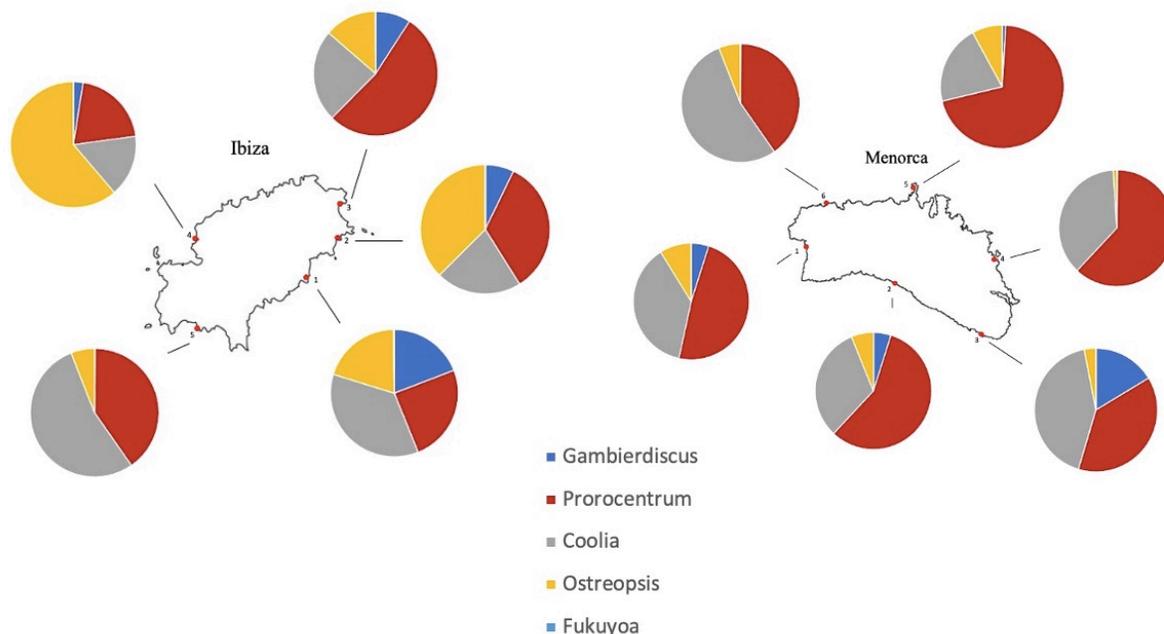


Figura 2. Abundancia media relativa de especies de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, *Coolia*, *Ostreopsis* y *Fukuyoa* en los puntos de muestreo de la isla de Ibiza (1) Cala Longa, 2) Cala Llenya, 3) Cala San Vicente, 4) Cala Salada, 5) Porroig), y Menorca (1) Sa Caleta, 2) Sant Adeonat, 3) Cala Torrent-Binibeca, 4) Na Macaret, 5) Cala Viola, 6) Cala Morell).

En Menorca también se pudo observar *Gambierdiscus* spp. en todos los puntos de muestreo. Donde se registró una mayor abundancia fue en Cala Torrent-Binibeca, donde representó un 16,4 % del total, con 162 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito. Por tanto, comparando la abundancia máxima a la que llegó *Gambierdiscus* spp., esta fue mayor en Menorca.

Por lo contrario, en Cala Morell la concentración fue de 5 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito, siendo el punto de muestreo con menor presencia de *Gambierdiscus* spp. de las dos islas. El género con menor abundancia volvió a ser *Fukuyoa* spp., el cual solo tuvo presencia en Sa Caleta y en Cala Morell, con un valor menor de un 0,07% y 0,03% del total muestreado, respectivamente.

Prorocentrum spp., *Coolia* spp. y *Ostreopsis* spp. fueron los que presentaron mayor abundancia, oscilando valores entre el 13 y el 70%, siendo *Prorocentrum* spp. el que obtuvo el valor más alto, en Cala Viola, con un valor de 2.550 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito (Figura 3). También fue el más abundante en todos los puntos de muestreo excepto en Cala Morell donde *Coolia* spp. presentó más abundancia (1.551 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito).

El punto de Menorca con mayor abundancia total de dinoflagelados fue en Cala Viola, con un total de 3.628 células· g⁻¹ peso húmedo macrófito, un poco mayor a la de Ibiza.

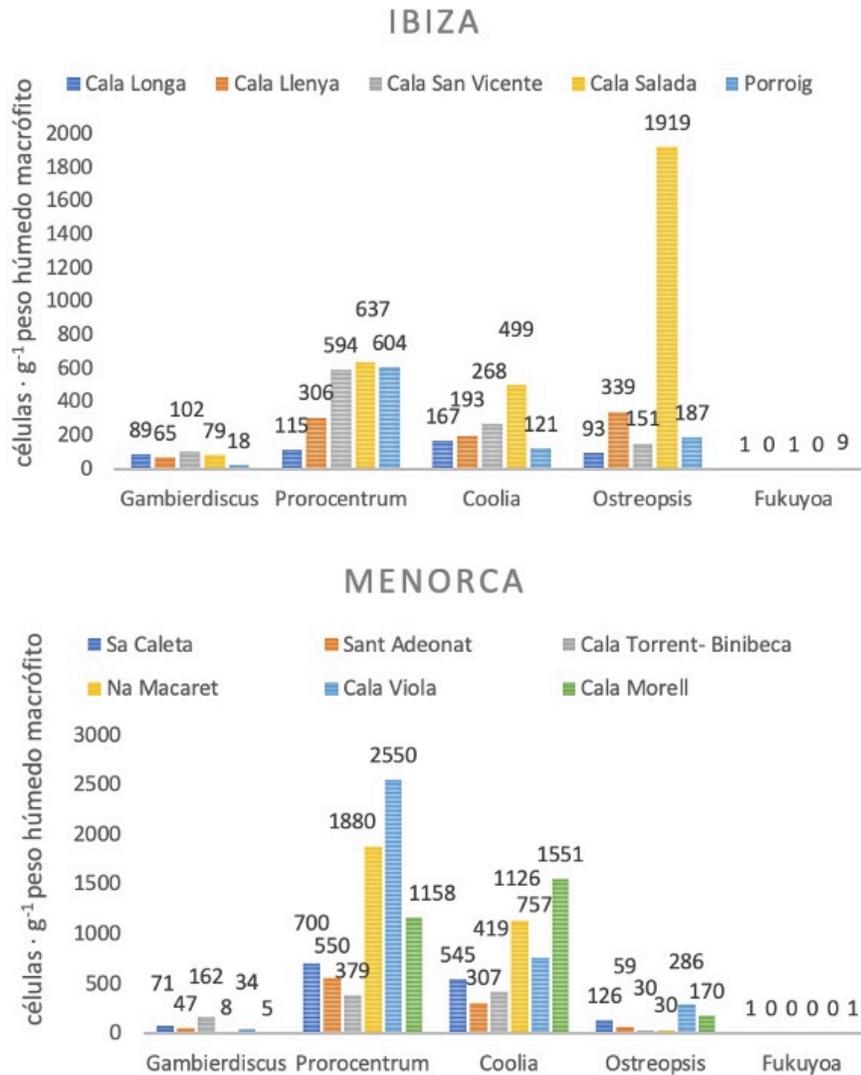


Figura 3. Abundancia y distribución de los distintos géneros de dinoflagelados en distintos puntos de las islas de Ibiza y Menorca.

Como se ha explicado anteriormente, el método de muestreo fue por recolección de macrófitos. Es por tanto importante evaluar y comparar las abundancias de los distintos dinoflagelados según el macrófito, y ver si la diferencia o semejanza es significativo o no. Pero hay que tener en cuenta que este tipo de muestreo presenta varios inconvenientes. El primero es que las células de *Gambierdiscus* se distribuyen de forma muy irregular, incluso en distancias pequeñas, y suelen presentar coeficientes de variación entre réplicas que van del 33 a más del 150%.

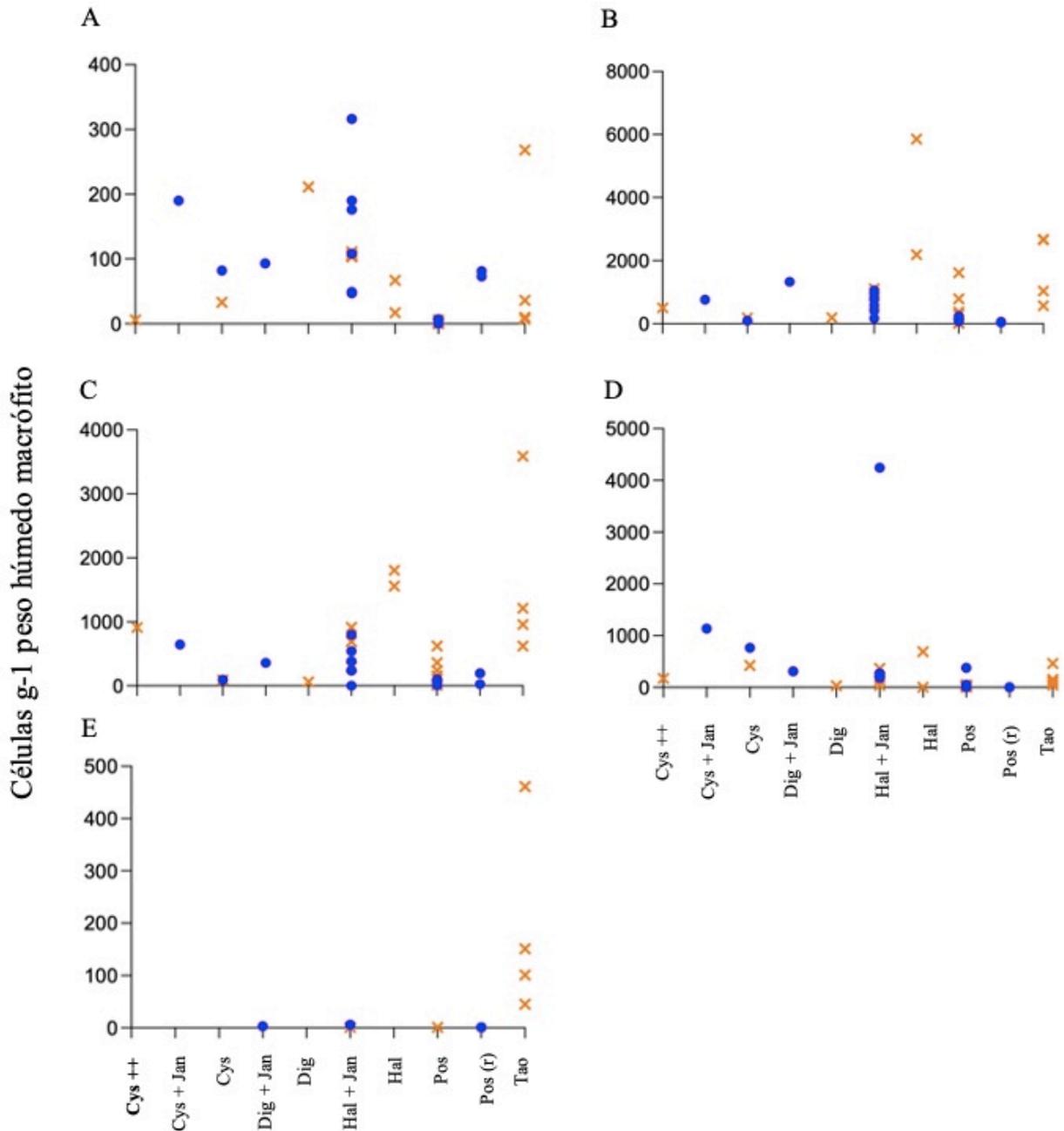
El segundo inconveniente es que los macrófitos presentan morfologías muy diferentes que afectan al número de células · g⁻¹ peso húmedo macrófito. Las algas que tienen una relación superficie/volumen mayor son potencialmente capaces de contener más células · g⁻¹ que los macrófitos con menor relación. Como resultado, las especies de macrófitos presentes, su abundancia relativa y la forma en la que se muestran los macrófitos entre sí, pueden influir significativamente en las estimaciones de abundancia de *Gambierdiscus* spp. obtenidas en un lugar concreto.

De los macrófitos más abundantes en el lugar de muestreo, se tomaron tres muestras (3 tipos de macrófitos). En la Tabla 1 se muestra cuáles se recolectaron, cuantas muestras y en qué isla.

Macrófitos	Código	Ibiza	Menorca
<i>Cystoseira sensu lato2</i> (2), <i>Jania adhaerens</i> (1), <i>Anadyomene stellata</i> (3)	Cys ++		1
<i>Cystoseira sensu lato2</i> (2), <i>Jania adhaerens</i> (1)	Cys + Jan	1	
<i>Cystoseira sensu lato1</i> (2)	Cys	1	1
<i>Digenea simplex</i> (1), <i>Jania adhaerens</i> (1)	Dig + Jan	1	
<i>Digenea simplex</i> (1)	Dig		1
<i>Halopteris scoparia</i> (2), <i>Jania adhaerens</i> (1)	Hal + Jan	6	3
<i>Halopteris scoparia</i> (2)	Hal		2
<i>Posidonia oceanica</i> (4)	Pos	4	6
<i>Posidonia oceanica</i> (rizoma) (4)	Pos (r)	2	
<i>Taonia atomaria</i> (2)	Tao		4

Tabla 1. Número de muestras y especies de macrófitos recogidos en cada isla. Entre paréntesis se indica el tipo de macrófito (1: alga roja; 2: alga parda; 3: alga verde; 4: planta marina). El código se utiliza en la Figura 5 para indicar la especie de macrófito.

Figura 4. Abundancia de los diferentes géneros de dinoflagelados en diferentes tipos de macrófito de las dos islas, Ibiza (círculos azules) y Menorca (X naranja). *Gambierdiscus* (A), *Prorocentrum* (B), *Coolia* (C), *Ostreopsis* (D), *Fukuyoa* (E). Véanse los códigos de los macrófitos en la Tabla 1.



Sobre la abundancia de dinoflagelados en los distintos tipos de muestreo, se observó que *Fukuyoa* es el género que presentó menos diversidad (también porque solo se encontró en

algunos puntos), pero presentó más células $\cdot g^{-1}$ peso húmedo en el alga parda *Taonia atomaria*. *Ostreopsis spp.* presenta gran diversidad ya que se observó en todos los tipos de macrófitos, pero la abundancia en estas es baja (Figura 4). *Gambierdiscus spp.*, como *Prorocentrum spp* y *Coolia spp.*, mostró gran diversidad (en cuanto a los macrófitos a los que se une) pero no sigue ningún patrón de distribución, es muy irregular. En cambio, los otros dos géneros parece que sean más abundantes en algas pardas y en la isla de Menorca (Figura 4).

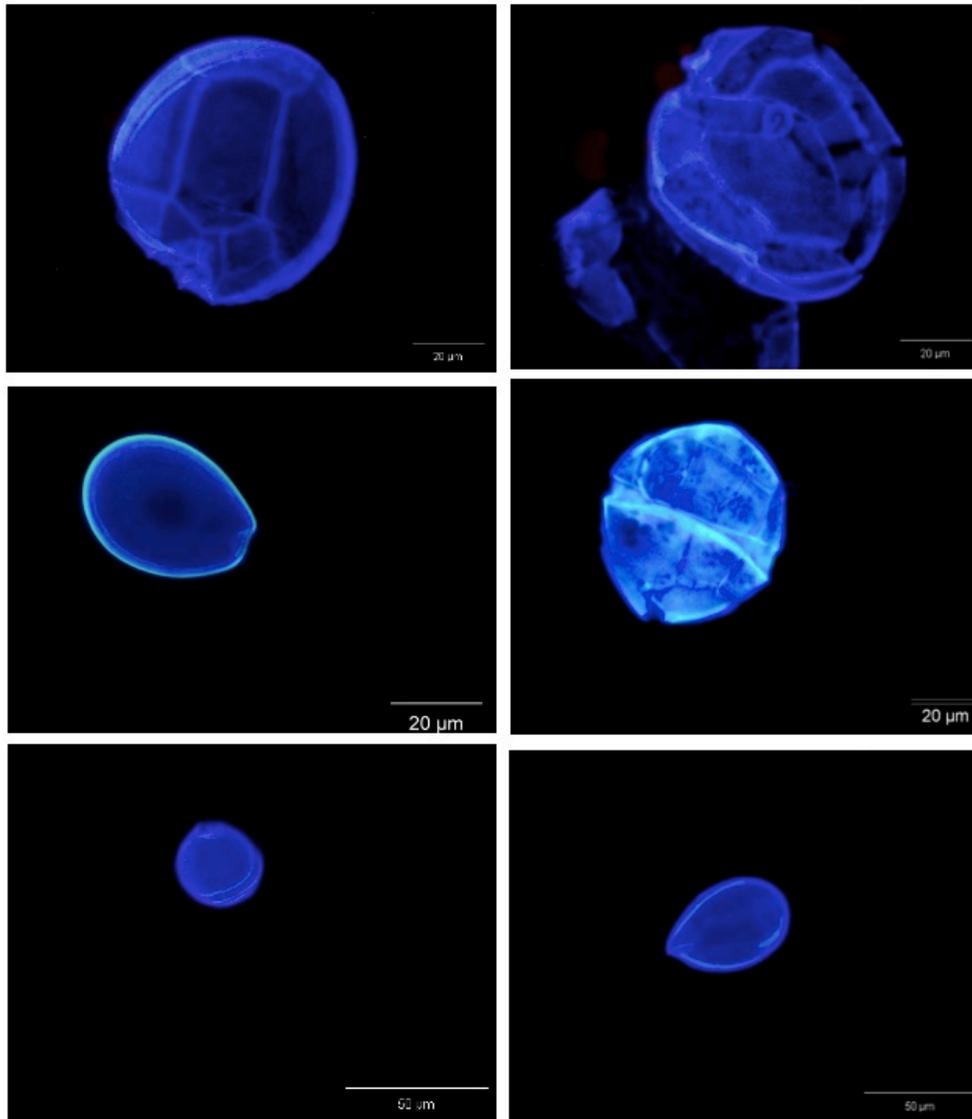


Figura 5. Fotografías (x40) tomadas con Leica DMLB equipada de cámara Olympus DP70: (de arriba a bajo, izq. a derecha) Arriba: *Gambierdiscus australes* (hipoteca y epiteca); Medio: *Prorocentrum sp.*; *Fukuyoa paulensis* (cedida por María Rey, IRTA); Abajo: *Coolia sp.*; *Ostreopsis sp.*

4.2. Crecimiento de *Gambierdiscus australes*

Las dos cepas de *G. australes* estudiados mostraron curvas de crecimiento típicas en condiciones de cultivo (Figura 6). No se observaron diferencias significativas entre las réplicas de cada cepa. Si se observó una pequeña diferencia en la concentración de células $\cdot \text{ml}^{-1}$ entre las dos cepas. En IRTA-CC 143 se llegó a una concentración máxima de 8.400 células $\cdot \text{ml}^{-1}$, mientras que en IRTA-CC 296 la concentración máxima fue de 5.460 células $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Ambas cepas presentaron etapas de adaptación (latencia) largas. No fue hasta el día 24-25 que se pudo observar un claro salto en la concentración celular, iniciando así la fase exponencial como es el caso en Tudó et al. (2020) donde también entraron en fase exponencial entre los días 20-23.

Con la fase exponencial se pudo extraer las divisiones por día, es decir, la tasa de crecimiento; las duplicaciones por día (K) y el tiempo de duplicación (Td) (Tabla 2).

Cepa	Especie	Max. conc.	Tasa crecimiento (r, divisiones día ⁻¹)	k	Td
IRTA-CC-143	<i>G. australes</i>	6945	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.03	7.71 ± 1.74
IRTA-CC-296	<i>G. australes</i>	4485	0.12 ± 0	0.15 ± 0.04	6.58 ± 2.33

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de *G. australes* (n = 2) de las Islas Baleares. Medias de las tres réplicas de: conc. máx. = rendimiento celular máximo (células $\cdot \text{mL}^{-1}$); r = tasa de crecimiento (divisiones $\cdot \text{día}^{-1}$) \pm desviación estándar (SD); K= duplicaciones por día (duplicaciones $\cdot \text{día}^{-1}$) \pm SD; Td = tiempo de duplicación (días⁻¹) \pm SD.

Las últimas fases no están representadas en los gráficos debido a que los cultivos se cosecharon en la fase estacionaria para el análisis molecular y de toxicidad.

La tasa de crecimiento (Tabla 2) de las cepas estudiadas se encuentran dentro del rango descrito por Xu et al. (2016), que es de 0,01 a 0,55 div. - día⁻¹. En algunos estudios, relacionan las altas tasas de división con la alta producción de toxinas por célula (Chinain et al., 2010; Reverté et al., 2018), pero en este estudio no se relacionó.

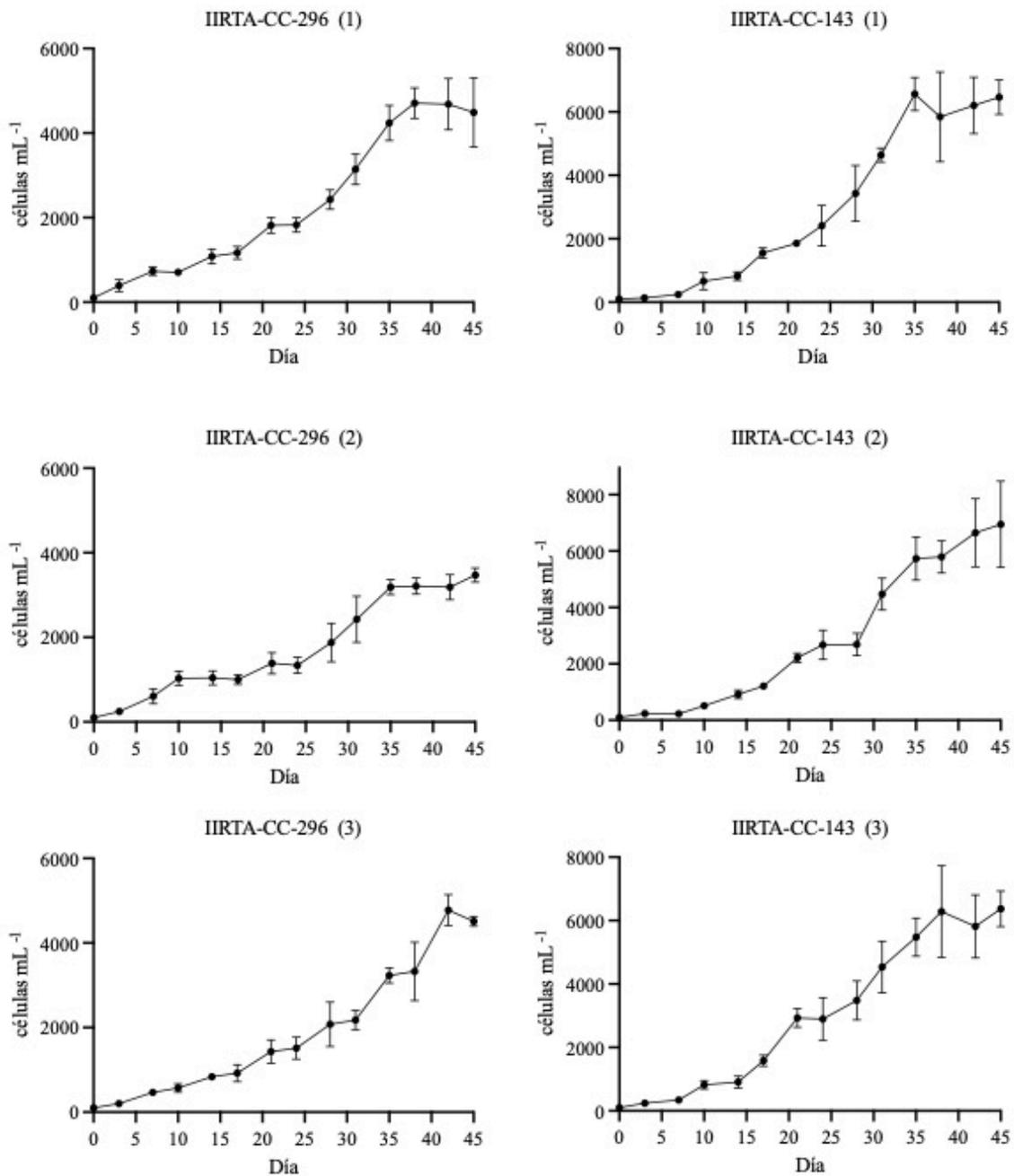


Figura 6. Curvas de crecimiento de *G. australes* de las dos cepas cultivadas con medio ES (Provasoli, 1968) modificado, salinidad de 36. Tres réplicas por cepa. Cada punto representa la media \pm desviación estándar (SE) de cuatro contajes.

4.3. Identificación de las especies

4.3.1. Identificación molecular

La identificación a nivel de especie se realizó para tres cepas de *Gambierdiscus* utilizando la región D1-D3 (LSU ADNr) (Chinain et al. 1999, Litaker et al., 2009). Las secuencias se cotejaron en GenBank utilizando las búsquedas de similitud de secuencias BLAST (National Center for Biotechnology Information) y obtuvieron la mayor identidad y similitud con *Gambierdiscus australes*.

4.3.2. Morfología de *G. australes*

La identificación de las especies de *Gambierdiscus* utilizando su morfología es muy difícil, ya que las descripciones se basan en sutiles diferencias en la morfología de la placa calcárea que son en su mayoría cuantitativas y se superponen en gran medida (Adachi y Fukuyo, 1979; Fraga et al., 2011). Por esta razón, primero se identificó morfológicamente el género y posteriormente se hizo un análisis molecular. Para complementar su identificación se examinó la morfología de tres cepas cultivadas de *G. australes*.

Las células de este estudio mostraron similitudes morfológicas con otras de la misma especie descritas en estudios anteriores. El tamaño de las células (D y W) (Tabla 3) están dentro del rango descrito por Litaker et al. (2009), 63.8 – 77.4 (D) y 55.2 – 73.8 (W). Y también por el descrito por Bravo et al. (2019). El tamaño (L y W) de la placa 2^{'''} (Tabla 3), fueron menores a los descritos por Tudó et al. (2020), pero entran en el rango. Todas las medidas tomadas fueron mayores que los de Rhodes et al. (2014b), Chinain et al. (1999) y Litaker et al. (2009).

Especie	Célula			Placa 2 ^{'''}		
	D ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)	W ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)	D:W ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)	L ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)	W ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)	L:W ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$)
<i>Gambierdiscus australes</i>	68,85 \pm 5,40	65,75 \pm 5,27	1,04 \pm 0,07	45,09 \pm 2,77	25,20 \pm 2,22	1,78 \pm 0,19

Tabla 3. Los valores representan la media de las medidas de los especímenes examinados, (Se) indica la desviación estándar, n = 30 (medidas célula), n= 23 (medidas placa 2^{'''}). Medida de la longitud de la célula (D) se refiere a la distancia ventral-dorsal, la anchura de la célula (W) se refiere al transdiámetro a través de la longitud de la célula, la longitud de la placa 2^{'''} (L) y la anchura de la placa 2^{'''} (W).

4.4. Toxicidad de *Gambierdiscus*.

La presencia de CTX se ha querido probar en varias ocasiones en *Gambierdiscus* spp., (Larsson et al., 2018), pero hasta la fecha solo se ha podido confirmar en *G. australes*, *G. pacificus*, *G. polynesiensis* y *G. excentricus* (Chinain et al., 2010).

En este trabajo, las cepas de *G. australes* presentaron una actividad intermedia similar a la CTX con cuantificaciones que oscilaban entre 25,28 y 59,2 fg CTX1B equiv. – célula⁻¹ (Tabla 4). Se repitió el ensayo en tres ocasiones, pero solo en el primero se pudo cuantificar toxina en dos de las cepas. En los otros ensayos hubo mucho efecto matriz en las células, lo que indica que los resultados negativos pueden deberse a que se usó una nueva línea de células (también células neuro-2a) por lo que eran más sensibles a la toxicidad.

Especie	Cepa	Isla	Abundancia celular (células · mL ⁻¹)	Toxicidad (fg CTX1B equiv. · células ⁻¹)
<i>Gambierdiscus australes</i>	IRTA-CC-143	Menorca	824,16 · 10 ³	59,2
<i>Gambierdiscus australes</i>	IRTA-CC-218	Menorca	240,16 · 10 ³	-
<i>Gambierdiscus australes</i>	IRTA-CC-296	Ibiza	537,5 · 10 ³	25,28

Tabla 4. Especie, código de la cepa, origen, concentración celular de los cultivos en el momento de la cosecha (células · mL⁻¹), valores de toxicidad tipo CTX expresados en femtogramos (fg) de CTX1B equiv. · célula⁻¹).

Comparando las cuantificaciones obtenidas con los valores para *G. australes* del Océano Pacífico (40 fg CTX1B equiv. · célula⁻¹) y del Océano Atlántico (31-107 fg CTX1B equiv. – célula⁻¹) reportadas por Rossignoli et al. (2020) y Rhodes et al. (2017), respectivamente, se observó como la cuantificación se acercaba al rango descrito. También entran en las concentraciones obtenidas por Tudó et al. (2020), que oscilaron entre 1,4 y 380 fg CTX1B equiv · célula⁻¹. En cambio, si comparamos con otros estudios como el de Reverté et al. (2018) en el Océano Atlántico, donde los valores oscilaron entre 200 y 697 fg CTX1B equiv. · célula⁻¹, los cuantificados en este estudio son muy bajos.

Estas diferencias tan grandes en la cuantificación se pueden deber a las distintas condiciones en que fueron aclimatadas las cepas. Excepto la cepa IRTA-CC-143 de este estudio, que justamente presenta la mayor cuantificación (59,2 fg CTX1B equiv. · célula⁻¹), las otras dos

no fueron aclimatadas durante un año como en el caso de las cepas de Reverté et al. (2018). A esto hay que sumarle también el hecho de que en Reverté et al. (2018) la irradiación de los fotones fue menor, una bomba suministró la aireación y el recipiente era un matraz de fondo redondo de 3 L. Por lo tanto, la producción y cuantificación de toxinas diferentes podría deberse en parte a las distintas condiciones de cultivo.

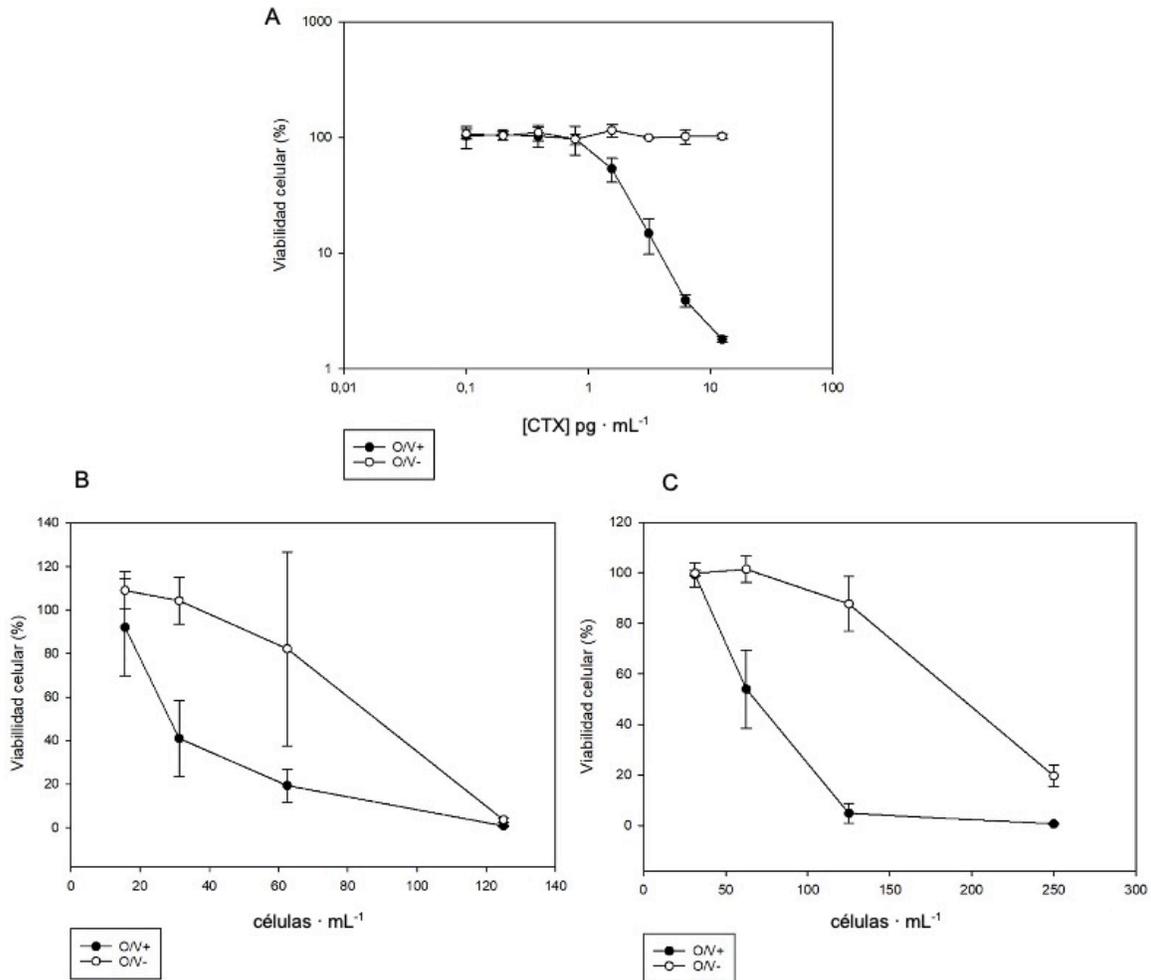


Figura 7. Curvas dosis-respuesta de las células neuro-2a expuestas a (A) un estándar de CTX1B, (B) extracto de *G. australes* IRTA-CC-143, y (C) extracto de *G. australes* IRTA-CC-296. O/V+: células neuro-2a expuestas al extracto microalgal con el tratamiento de ouabaína y veratridina. O/V-: células neuro-2a expuestas al extracto de microalgas sin el tratamiento de ouabaína y veratridina. Cada punto es la media de triplicados y las barras representan la división estándar (SE).

En cuanto a las curvas dosis-respuesta, estas muestran los efectos de las toxinas de *G. australes* sobre las células neuro-2a expuestas. En la Figura 7 se puede observar como en las células que presentaban ouabaína/veratridina (+O/V) se necesita menos cantidad de toxina para causar una mayor mortalidad. Esto se debe a que mientras la ouabaína se une a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, bloqueándola e impidiendo el eflujo de sodio, la veratridina aumenta la permeabilidad al Na⁺ mediante la unión selectiva a los canales de sodio activados por voltaje (VGSC), bloqueándolos en posición abierta. La exposición de las células neuro-2a a estos compuestos da lugar a un aumento de la concentración intracelular de Na⁺, que es aún mayor en presencia de CTX, lo que provoca una mayor mortalidad celular.

4.5. Quistes

4.5.1. Inducción de quistes a partir de cultivos.

Teniendo en cuenta las características para describir quistes en dinoflagelados (véase apartado 3.10), se sabe que al menos 48 especies forman quistes de paredes delgadas como parte de su ciclo de vida, asociados con condiciones muy diferentes, tanto en cultivo como en la naturaleza (Bravo et al., 2010). Hasta ahora no se han reportado quistes de *Gambierdiscus* en la naturaleza. De hecho, los ciclos de vida de los dinoflagelados relacionados con la ciguatera bentónica son poco conocidos (Fraga et al., 2016). Es por esta razón que los informes sobre los quistes de *Gambierdiscus* son muy escasos en la literatura. En un estudio de Fraga et al. (2016), se consideraron algunas células de *G. toxicus* como quistes tecdos debido a su parecido con las células vegetativas inmóviles y también por el hecho de que germinaron después de su aislamiento en medio. También estudios como Hokama et al. (1996), con los que Fraga et al. (2016) coincidió, donde en cultivos de la misma especie observaron células con paredes gruesas y translúcidas, núcleos centrales densos y de color marrón oscuro a los que consideraron quistes. Estos tipos de quistes se han observado también en otros géneros y tienen un tiempo de supervivencia que va de días a meses (Bravo y Figueroa, 2014). Los factores que determinan el enquistamiento a largo o corto plazo aún se desconocen para muchas especies de dinoflagelados (Bravo et al., 2010).

Teniendo en cuenta descripciones como las anteriores y las características principales para la descripción y clasificación de los quistes (ver 3.10), se observaron los cultivos de

Gambierdiscus sp. (es probable que se traten de *G. australes*, pero se debería hacer un estudio genético) comentados anteriormente (3.10.1). No se observaron diferencia entre las cepas; tanto IRTA-CC-225, IRTA-CC-263, como IRTA-CC-266 mostraron los mismos efectos a los tres tratamientos distintos.

Ninguna de las condiciones a las que estuvieron sometidos los cultivos durante 3 meses, mostró lo que en un principio era el objetivo de esta parte del estudio, el inducir quistes celulares. Pero asimismo se describirá brevemente lo observado en ese tiempo. Cada 4 días se observaban diferentes características como la morfología de las células, la pigmentación, el movimiento y el crecimiento. En los cultivos a distintas temperaturas (todos en período luz: oscuridad 12:12h), a parte del control (24°C), las células en 18°C mostraron un crecimiento y una morfología normal y en las de 28-29°C parece que el crecimiento fue mayor y más rápido, pero mostraron una peor pigmentación. Según Kibler (2012) y Xu (2016), por debajo de 15 °C es muy raro que las células sobrevivan, pero en este estudio las células a 10°C se mantuvieron vivas durante 5 semanas, presentaban una morfología aparentemente normal, pero dejaron de reproducirse y mostraron menos movimiento. Esta característica termofisiológica de *G. australes* podría conferir a esta especie la capacidad de persistir en las Islas Baleares en invierno cuando la temperatura del agua desciende a 13 ° C (Tudó et al., 2020). En los cultivos a 24°C y luz: oscuridad 12:12h, las células en menos intensidad de luz (“low light”: 15-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparadas con el control (40- 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) crecieron menos, pero presentaban menos malformaciones. Las células a oscuridad presentaban un tamaño muy inferior y no crecieron.

4.6.2. Aislamiento de quistes de muestras de campo

De las submuestras explicadas en el apartado 10.1.2, se aislaron lo que podrían ser posibles quistes de dinoflagelados y se transfirieron en placas de 24 pozos con medio ES (Provasoli,1968). Durante 3 semanas no se vio ningún signo de que fueran a germinar. Hasta el momento estos cultivos permanecen en la cámara de 24°C y luz: oscuridad 12:12h. Se debería seguir observando a ver como evoluciona.

4. CONCLUSIONES

Gambierdiscus y otros géneros de dinoflagelados potencialmente tóxicos (*Prorocentrum*, *Ostreopsis*, *Coolia*), previamente considerados como asociados o potencialmente asociados a la ciguatera, fueron muestreados en las islas Baleares de Ibiza y Menorca. De las muestras tomadas en cinco puntos de Ibiza y seis puntos de Menorca, se documentaron en todos. A parte de estos géneros, también se identificó *Fukuyoa* spp. en algunos puntos de ambas islas. En Ibiza, *Gambierdiscus* spp. y *Fukuyoa* spp. fueron los que menos abundancia presentaron. Para *Gambierdiscus* spp. se obtuvo un rango de abundancia de 18- 102 células · g⁻¹ peso húmedo macrófito. La máxima se registró en Cala Longa y la mínima en Porroig. El punto de Ibiza con mayor abundancia total de dinoflagelados fue en Cala Salada (3.134 células · g⁻¹ peso húmedo macrófito). En Menorca, *Fukuyoa* spp. y *Gambierdiscus* spp. volvieron a ser las menos abundantes. Este último, tuvo una abundancia de 5 – 162 células · g⁻¹ peso húmedo macrófito. El de mayor siendo Cala Torrent-Binibeca y de menor, Cala Morell. El punto de Menorca con mayor abundancia total de dinoflagelados fue en Cala Viola, con un total de 3.628 células · g⁻¹ peso húmedo macrófito, un poco mayor a la de Ibiza. El muestreo por recolección de macrófitos presenta varios inconvenientes, se observó que *Gambierdiscus* spp. se distribuyen de forma muy irregular, incluso en distancias pequeñas. Para ampliar este estudio, se podría hacer uno donde se estudien las abundancias de las microalgas a lo largo del tiempo en ciclos anuales (incluyendo otros meses). A partir de los recuentos de las microalgas en los macrófitos, también se podría cuantificar las poblaciones de microalgas tóxicas en una zona determinada de la costa teniendo datos sobre la cobertura vegetal.

Se identificaron *Gambierdiscus* spp. de las Islas Baleares de Ibiza y Menorca como *Gambierdiscus australes*. En las curvas de crecimiento de las dos cepas, no se observaron diferencias significativas y se mostraron curvas de crecimiento típicas en condiciones de cultivo, (con fases exponencial y estacionaria un poco atrasadas). Se obtuvo un rango de 0,12-0,13 div · día⁻¹.

Las cuantificaciones de toxicidad oscilaron entre 25,28 y 59,2 fg CTX1B equiv. célula⁻¹. El límite de cuantificación (LOQ) entre 17,86- 35,73 fg/célula. A partir de la toxicidad

evaluada en los cultivos y los datos anteriores, se podría estimar el riesgo de ciguatera a nivel de microorganismos en una zona particular.

No se consiguió inducir quistes con los tratamientos a distintas temperaturas y condiciones de luz, pero se observó como *G. australes* es una de las especies más criotolerantes del género, capaces de mantenerse vivas a menos de 15 °C.

Hasta el momento los posibles quistes de dinoflagelados, aislados de muestras de sedimento, permanecen en la cámara de 24°C y luz: oscuridad 12:12h con medio ES 36 ‰. Se debería seguir observando a ver como evoluciona.

5. BIBLIOGRAFÍA

Adachi, R., & Fukuyo, Y. (1979). The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 45(1), 67-71.

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... & Cárdenas, P. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.

Anderson, D. M., & Wall, D. (1978). Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms 1, 2, 3. *Journal of phycology*, 14(2), 224-234.

Bagnis R. (1993). Ciguatera fish poisoning. In: Falconer IR, eds. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, New York. 105–115.

Bolch, C. J. S. (1997). "The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments". *Phycologia*. 36 (6): 472–478.

Bomber, J. W., Rubio, M. G., & Norris, D. R. (1989). Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera: substrate specificity and nutrition. *Phycologia*, 28(3), 360-368.

Bravo, I., Figueroa, R. I., Garces, E., Fraga, S., & Massanet, A. (2010). The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(3-4), 166-174.

Bravo, I., & Figueroa, R. I. (2014). Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms*, 2(1), 11-32.

Bravo, I., Figueroa, R. I., & Fraga, S. (2014). Cellular and nuclear morphological variability within a single species of the toxicogenic dinoflagellate genus *Gambierdiscus*: Relationship to life-cycle processes. *Harmful Algae*, 40, 1-8.

Bravo, I., Rodriguez, F., Ramilo, I., Rial, P., & Fraga, S. (2019). Ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in a subtropical region of North Atlantic Ocean (Canary Islands): Morphological characterization and biogeography. *Toxins*, 11(7), 423.

Cañete, E., & Diogène, J. (2008). Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma× glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*, 52(4), 541-550.

Catania, D., Richlen, M. L., Mak, Y. L., Morton, S. L., Laban, E. H., Xu, Y., ... & Berumen, M. L. (2017). The prevalence of benthic dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the central Red Sea. *Harmful algae*, 68, 206-216.

Chinain, M., Faust, M. A., & Pauillac, S. (1999). Morphology and molecular analyses of three toxic species of Gambierdiscus (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*, 35(6), 1282-1296.

Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., Pauillac, S., 2010. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* 56, 739–750.

Chinain, M., Gatti, C. M., Roué, M., & Darius, H. T. (2020). Ciguatera-causing dinoflagellates in the genera Gambierdiscus and Fukuyoa: Distribution, ecophysiology and toxicology. *Dinoflagellates: Morphology, Life History and Ecological Significance*; Subba Rao, DV, Ed, 405-457.

Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcé's, E., 2006. Multiples routes of sexuality in *Alexandrium taylori* (Dinophyceae) in culture. *J. Phycol.* 42, 1028–1039.

Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., & Zapata, M. (2011). *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae*, 11, 10-22.

Fraga, S., & Rodríguez, F. (2014). Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist*, 165(6), 839-853.

Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., & Bravo, I. (2016). *Gambierdiscus balechii* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae*, 58, 93-105.

Fritz, L., Triemer, R.E., 1985. A Rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21, 662–664.

Friedman, M. A., Fernandez, M., Backer, L. C., Dickey, R. W., Bernstein, J., Schrank, K., ... & Fleming, L. E. (2017). An updated review of ciguatera fish poisoning: clinical, epidemiological, environmental, and public health management. *Marine drugs*, 15(3), 72.

Fritz, L., & Triemer, R. E. (1985). A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates 1. *Journal of phycology*, 21(4), 662-664.

Gómez, F., Qiu, D., Lopes, R. M., & Lin, S. (2015). *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *PLoS One*, 10(4), e0119676.

Guillard, R. R. (1973). Division rates. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, pp. 289-312.

Hidalgo, J., Liberona, J. L., Molgó, J., & Jaimovich, E. (2002). Pacific ciguatoxin-1b effect over Na⁺ and K⁺ currents, inositol 1, 4, 5-triphosphate content and intracellular Ca²⁺ signals in cultured rat myotubes. *British journal of pharmacology*, 137(7), 1055-1062.

Hoshaw, R. W., & Rosowski, J. R. (1973). Methods of Microscopic Algae in Stein, JR, ed., Handbook of phycological methods.

Jang, S. H., Jeong, H. J., & Du Yoo, Y. (2018). *Gambierdiscus jejuensis* sp. nov., an epiphytic dinoflagellate from the waters of Jeju Island, Korea, effect of temperature on the growth, and its global distribution. *Harmful Algae*, 80, 149-157.

Kibler, S.R., Litaker, R.W., Holland, W.C., Vandersea, M.W., Tester, P.A., 2012. Growth of eight *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species: effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* 19, 1–14.

Kohli, G. S., Neilan, B. A., Brown, M. V., Hoppenrath, M., & Murray, S. A. (2014). Cob gene pyrosequencing enables characterization of benthic dinoflagellate diversity and biogeography. *Environmental microbiology*, 16(2), 467-485.

Larsson, M.E., Laczka, O.F., Tim Harwood, D., Lewis, R.J., Himaya, S.W.A., Murray, S.A., Doblin, M.A., 2018. Toxicology of *Gambierdiscus* spp. (dinophyceae) from tropical and temperate Australian waters. *Mar. Drugs* 16, 1–19.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Chinain, M., Holmes, M. J., ... & Tester, P. A. (2009). Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, 48(5), 344-390.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., ... & Tester, P. A. (2010). Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, 56(5), 711-730.

Matsuoka, K., & Fukuyo, Y. A. S. U. W. O. (2000). Technical guide for modern dinoflagellate cyst study. *WESTPAC-HAB, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan*, 47.

Nicholson, G. M., & Lewis, R. J. (2006). Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs*, 4(3), 82-118.

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (2014). Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp. nov. (Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. *Journal of Phycology*, 50(3), 506-514.

Parsons, M. L., Aligizaki, K., Bottein, M. Y. D., Fraga, S., Morton, S. L., Penna, A., & Rhodes, L. (2012). *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful algae*, 14, 107-129.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In *Cultures and Collections of Algae. Proceedings of US-Japan Conference, Hakone, September 1966*. Japan Society of Plant Physiology.

Ragelis EP (1984). Ciguatera seafood poisoning: overview. In: Ragelis EP, eds. *Seafood Toxins*, American Chemical Society, Washington D.C. 22–36.

Reverté, L., Toldrà, A., Andree, K. B., Fraga, S., de Falco, G., Campàs, M., & Diogène, J. (2018). Assessment of cytotoxicity in ten strains of *Gambierdiscus australes* from Macaronesian Islands by neuro-2a cell-based assays. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2447-2461.

Rhodes, L., Harwood, T., Smith, K., Argyle, P., & Munday, R. (2014). Production of ciguatera toxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (Dinophyceae) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae*, 39, 185-190.

Rhodes, L., Harwood, T., Smith, K., Argyle, P., Munday, R., 2014b. Production of ciguatera toxin and maitotoxin by strains of *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus* and *G. polynesiensis* (Dinophyceae) isolated from Rarotonga, Cook Islands. *Harmful Algae* 39, 185–190.

Rhodes, L., Smith, K.F., Murray, S., Harwood, D.T., Trnski, T., Munday, R., 2017. The epiphytic genus *Gambierdiscus* (Dinophyceae) in the Kermadec Islands and Zealandia regions of the southwestern Pacific and the associated risk of ciguatera fish poisoning. *Mar. Drugs* 15 (7), 219.

Rossignoli, A. E., Tudó, A., Bravo, I., Díaz, P. A., Diogène, J., & Riobó, P. (2020). Toxicity characterisation of *Gambierdiscus* species from the Canary Islands. *Toxins*, 12(2), 134.

Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study (Matsuoka, K., & Fukuyo, Y. A. S. U. W. O. (2000). Technical guide for modern dinoflagellate cyst study. *WESTPAC-HAB, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan*, 47.)

Tester, P. A., Faust, M. A., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Chinain, M., Holmes, M., ... & Litaker, R. W. (2008). Taxonomic uncertainties concerning *Gambierdiscus toxicus*: proposed epitype. In *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae. ISSHA and IOC, UNESCO. Copenhagen* (pp. 269-271).

Tudó, À., Toldrà, A., Andree, K. B., Rey, M., Fernández-Tejedor, M., Campàs, M., & Diogène, J. (2018). First report of *Gambierdiscus* in the Western Mediterranean Sea (Balearic Islands). *Harmful Algae News*.

Tudó, À., Toldrà, A., Rey, M., Todolí, I., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., ... & Diogène, J. (2020). *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* as potential indicators of ciguatera risk in the Balearic Islands. *Harmful Algae*, 99, 101913.

Xu, Y., Richlen, M. L., Morton, S. L., Mak, Y. L., Chan, L. L., Tekiau, A., & Anderson, D. M. (2014). Distribution, abundance, and diversity of *Gambierdiscus* spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati. *Harmful Algae*, 34, 56-68.

Xu, Y., Richlen, M.L., Liefer, J.D., Robertson, A., Kulis, D., Smith, T.B., Parsons, M.L., Anderson, D.M., 2016. Influence of Environmental Variables on *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) Growth and Distribution. *PLoS ONE* 11 (4).

Yasumoto, T., Bagnis, R., Thevenin, S., Garcon, M. (1977). A Survey of Comparative Toxicity in the Food Chain of Ciguatera.

Yasumoto, T., Inoue, A., Ochi, T., Fujimoto, K., Oshima, Y., Fukuyo, Y., Adachi, R., Bagnis, R., 1980. Environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 1397–1404.

Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T., & Adachi, M. (2014). Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 35, 29-37.

