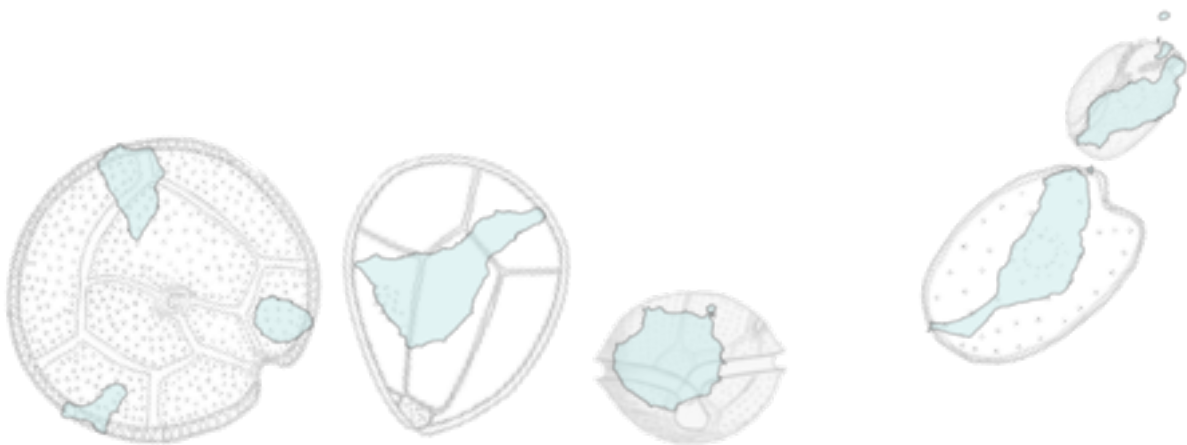


Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos en las Islas Canarias: métodos de muestreo, ecología y taxonomía

Juan Fernández Zabala



Doctorado en Calidad ambiental y Recursos naturales (DOCARNA)
Las Palmas de Gran Canaria
Junio 2024

FE DE ERRATAS

Tesis doctoral: "Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos en las Islas Canarias: métodos de muestreo, ecología y taxonomía"

Autor: Juan Fernández Zabala

Se han identificado dos erratas en la página 3 del documento. Estas correcciones no afectan la interpretación global del trabajo, pero son necesarias para asegurar la precisión taxonómica del contenido:

El término "**Ocrophyta**" debe ser sustituido por "**Dinoflagellata**".

El término "**Cyanophyta**" debe ser sustituido por "**Cyanobacteria**".



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Doctorado en Calidad Ambiental y Recursos Naturales (DOCARNA)

Tesis Doctoral

**Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos
en las Islas Canarias: métodos de muestreo, ecología
y taxonomía**

Juan Fernández Zabala

Director: Dr. Emilio Soler Onís

Codirectora: Dra. Ana Amorim

Firma doctorando

Firma director

Firma codirectora

Juan Fernández Zabala

Dr. Emilio Soler Onís

Dr. Ana Amorim

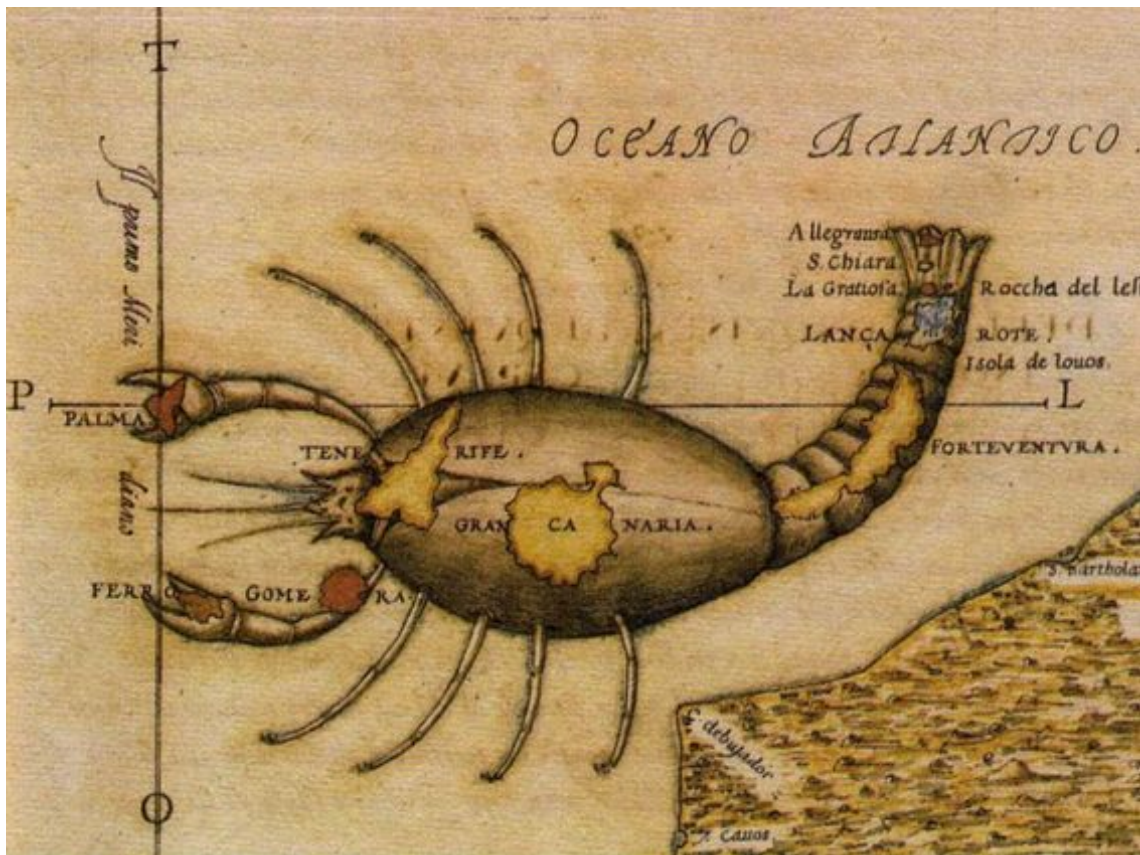
Las Palmas de Gran Canaria, a..... de.....de 2024.

**D. JESUS GARCÍA RUBIANO COORDINADOR DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CALIDAD AMBIENTAL Y
RECURSOS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA**

INFORMA,

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **"Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos en las Islas Canarias: métodos de muestreo, ecología y taxonomía"** presentada por el doctorando D. Juan Fernández Zabala y dirigida por el Doctor Emilio Soler Onís, y la Doctora Ana Amorim.

Y para que conste, y a efectos de lo previsto en el Artículo 25 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 27/01/2023) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a..... de.....de dos mil veinticuatro.



Portada. Representación de un mapa de las Islas Canarias en el que se muestra las islas que conforman el archipiélago sobre los cinco géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos presentes en la región, y que han sido objeto de estudio en esta tesis. El mapa es una emulación del mapa realizado en el siglo XVI por Leonardo Torriani, en el cual este ingeniero italiano quiso mostrar la benignidad del clima de las Islas poniéndolas bajo el signo de Cáncer, el signo zodiacal asociado al agua y que ya el poeta romano Ovidio relacionó con climas templados y territorios fértiles. El mapa de Torriani muestra como un cangrejo que recoge la humedad de los vientos alisios es el causante de la fortuna de las Islas. En el mapa que se muestra en la portada, el clima de las Islas vendría a ser, a su vez, el causante de la diversidad de géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos presentes en el archipiélago canario. Fuente: Barrera, J. M. P., 2020. Surcando mares de papel y tinta. la presencia de Canarias en el cartelismo naval comercial (1883-1960) (i). Revista de historia canaria, (202), 287-320.

A Teo...

En memoria de Rogelio...

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a la persona que me ha acompañado todos estos años. Gracias por todo Emilio. El camino ha sido largo y a veces complicado. En nuestra memoria quedan decenas de viajes a las islas, viajes a otros archipiélagos y países, varios congresos, infinitos muestreos, tres mudanzas de laboratorio, muchas discusiones y también alegrías. ¡Al fin hemos llegado! ¡Gracias!

Me gustaría agradecer también todo el apoyo y conocimiento que he recibido de mis codirectores. Ana Amorim ha sido un pilar fundamental en esta tesis. Gracias Ana por aceptar la codirección, tu experiencia ha nutrido el contenido de este trabajo. Gracias también por tu cercanía y cariño. A Rogelio Herrera por sus consejos y sus enseñanzas en el mar. En muchos sentidos contribuiste a que este estudio este hoy aquí plasmado, pero fuiste antes de poder ver el resultado. Gracias allá donde estés.

Del mismo modo, mi agradecimiento a todas las personas que han estado estos años en mi entorno científico y que han aportado su granito de arena a esta tesis. Fernando Tuya sin duda ha aportado una duna completa. Gracias Fer por estar siempre ahí y por ser uno de los responsables de que de una manera u otra yo empezara esta tesis. A Ana Sofía Ramírez por abrirme las puertas de la biología molecular. Trabajar junto a ti estos años ha sido todo un placer. Gracias también al resto de personas buenas que me he encontrado en el IUSA por acogerme. A Alicia Ojeda, pionera de los estudios sobre dinoflagelados en Canarias, por darme buenos consejos en el comienzo e inspirar a los que venimos detrás. A Elisa Berdalet por sus consejos, su sabiduría y su humildad. Aunque lejos, siempre has estado cerca. A Patricia Tester por inspirar y mejorar mi trabajo en relación al muestreo de dinoflagelados bentónicos. A Miriam Torres, tutora de esta tesis, y May Gómez, directora del grupo de investigación EOMAR al que pertencí durante años, por su cercanía y disponibilidad para resolver cualquiera de los imprevistos que surgieron durante este tiempo.

Gracias también a las personas que han aportado su tiempo o sus datos de manera desinteresada en esta tesis. A Tamia Brito-Izquierdo (TRAGSATEC) y a los marineros (GMR Canarias) de la Reserva Marina "Punta de la Restinga-Mar de las Calmas" por su ayuda durante los muestreos llevados a cabo en la isla de El Hierro. A la Julia Pérez de Paz, Rosa Febles y Olga Fernández del Departamento de Biodiversidad Micro-Morfológica-Reproductiva del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" por facilitarnos el uso de microscopio electrónico. A Jorge Diogene, Angels Tudò (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, La Ràpita), Aitor Laza (Universidad del País Vasco, UPV/EHU), Helena David (Universidade de Lisboa) y Francisco Rodríguez (Instituto Español de Oceanografía de Vigo, IEO) por sus valiosas contribuciones al cuarto capítulo.

Me gustaría recordar también a todas aquellas personas que me he encontrado estos años, dedicados como yo a estudiar las maravillas del mar. Gracias en primer lugar a las personas con las que trabajé a pie de muelle. A Mireia por su amistad y su infinita disponibilidad y ayuda para mantener a salvo los cultivos. Un cachito de la tesis te corresponde. Gracias a todas las chicas de la Colección y Biotecnología por la ayuda y por todos los buenos momentos que hemos pasado. Quiero agradecer también a todas las personas que me he encontrado, más recientemente, en la parte alta del muelle. A Víctor por su amistad y por ser un apoyo durante el final de mi tesis, espero que yo también lo haya sido en la tuya ¡venga que ya queda menos! A Laura, Bea, Ale, Judith, Miranda, Andrej, Lucia, Sandra, Mine, Quique y al resto, por hacerme el final de este camino mucho más llevadero.

No puedo olvidarme de mi familia. Mi más profundo agradecimiento a Lola, la persona más especial de mi vida. Gracias Lola por tu apoyo todos estos años, tus consejos y tu entendimiento. Sin ti esta tesis nunca hubiese sido posible. Perdona también por todo el tiempo que te he robado. Te prometo que te lo devolveré. Gracias también a mis padres y a mi hermano. Espero que esta tesis os haga sentir orgullosos. Vuestra ayuda ha sido vital durante todos estos años. También tenemos que hacer cuentas del tiempo robado.

También me gustaría agradecer a mis amigos, muchos en Vitoria otros en Gran Canaria y Tenerife y algunos desperdigados por otros rincones España y del mundo. Gracias por el apoyo y por tratar intentar entender lo que he estado haciendo estos años. Aquí también saldaremos cuentas.

Por último, me gustaría agradecer a los proyectos INTERREG POMAC 2014-2020 MIMAR (MAC/4.6d/066) y MIMAR+ (MAC2/4.6d/249), los cuales han sustentado económicamente estas tesis desde su comienzo.

ÍNDICE

Presentación	V
Resumen.....	VII
Overview.....	IX
Glosario.....	XI
CAPÍTULO 1. Introducción general.....	1
Floraciones Algales Nocivas o HABs.....	3
HABs en las Islas Canarias.....	6
Generalidades de los dinoflagelados.....	13
Identificación y clasificación	17
Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos o BHABs.....	20
Diversidad.....	21
Aspectos relevantes sobre su ecología.....	25
Métodos de muestreo.....	27
Justificación y objetivos.....	31
Bibliografía.....	35
CAPÍTULO 2. Evaluación de la fiabilidad del “Método de Sustrato Artificial” para el muestreo de BHABs en la región macaronésica.....	45
Resumen del capítulo.....	49
1. Introducción.....	51
2. Material y Métodos.....	56
2.1. Área de estudio.....	56
2.2. Desarrollo de sustratos artificiales.....	59
2.3. Tiempo de colonización de los sustratos artificiales	61
2.4. Determinación del tamaño muestral de los sustratos artificiales.....	61

2.5. Abundancias celulares, variabilidad de la muestra y relación entre métodos.....	62
2.6. Procesamiento de muestras, identificación de especies de dinoflagelados y recuento celular.....	63
3. Resultados.....	65
3.1. Tiempo de colonización.....	65
3.2. Tamaño muestral.....	67
3.3. Abundancias celulares, variabilidad de las muestras y relación entre métodos.....	69
4. Discusión.....	76
4.1. Desarrollo de sustratos artificiales.....	76
4.2. Tiempo de colonización y tamaño muestral.....	78
4.3. Abundancias celulares, variabilidad de las muestras y relación entre métodos.....	80
Bibliografía.....	86
Material suplementario.....	92

CAPÍTULO 3. Distribución en profundidad de dinoflagelados epibentónicos potencialmente nocivos del sur de la isla de El Hierro, Islas Canarias....97

Resumen del capítulo.....	101
1. Introducción.....	103
2. Material y Métodos.....	106
2.1. Área de estudio y diseño del muestreo.....	106
2.2. Procesamiento de las muestras, identificación de las especies de dinoflagelados BHAB y recuento celular.....	111
2.3. Análisis de datos.....	113
2.3.1. Variación de la abundancia y distribución de los dinoflagelados BHAB con la profundidad a lo largo de los tiempos de muestreo.....	113

2.3.2. Efecto de los parámetros ambientales relacionados con la profundidad sobre los dinoflagelados BHAB.....	114
3. Resultados.....	115
3.1. Diversidad, abundancia celular y patrones de distribución vertical de los géneros de dinoflagelados BHAB a lo largo de los tiempos de muestreo.....	115
3.2. Influencia de los parámetros ambientales en la abundancia y distribución de los géneros de dinoflagelados BHAB.....	121
3.3. Abundancia y distribución vertical de las especies de <i>Gambierdiscus</i> a lo largo de los tiempos de muestreo.....	126
4. Discusión.....	129
4.1. Patrones de distribución vertical de dinoflagelados BHAB.....	129
4.2. Influencia de los parámetros ambientales en la distribución vertical de dinoflagelados BHAB en la isla de El Hierro.....	131
4.2.1. Movimiento del agua.....	131
4.2.2. Luz.....	134
4.2.3. Temperatura del agua.....	137
4.2.4. Otros parámetros ambientales.....	139
4.3. Variabilidad temporal en la abundancia celular y distribución vertical de <i>Gambierdiscus</i> spp.....	139
Bibliografía.....	146
Material suplementario.....	153
CAPÍTULO 4. El género <i>Coolia</i> Meunier en las Islas Canarias.....	155
Resumen del capítulo.....	157
1. Introducción.....	159
2. Material y Métodos.....	164
2.1. Recogida y tratamiento de muestras.....	164
2.2. Análisis Morfológicos.....	167
2.3. Extracción del ADN y amplificación por PCR.....	168

2.4. Análisis filogenético de las secuencias de la LSU del ADNr.....	168
3. Resultados.....	170
3.1. Diversidad de <i>Coolia</i> en las Islas Canarias.....	170
3.1.1. Análisis morfológicos.....	170
3.1.2. Análisis filogenéticos.....	180
3.2. Distribución de <i>Coolia</i> en las Islas Canarias.....	185
4. Discusión.....	188
4.1. Dificultades en la taxonomía del género <i>Coolia</i>	188
4.2. Diversidad y distribución de <i>Coolia</i> en las Islas Canarias.....	203
4.3. Distribución mundial de las especies de <i>Coolia</i> presentes en Canarias...207	
Bibliografía.....	212
Material suplementario.....	220
CAPÍTULO 5. Discusión final.....	221
Bibliografía.....	228
CONCLUSIONES GENERALES.....	231
ANEXO. Contribuciones científicas durante la tesis.....	235
1.Comunicaciones en congresos.....	237
2.Publicaciones en revistas.....	242

PRESENTACIÓN

La tesis doctoral que aquí se presenta con el título “Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos en las Islas Canarias: métodos de muestreo, ecología y taxonomía” ha sido dirigida por los doctores Emilio Soler Onís (Observatorio Canario de Algas Nocivas-FPCT-ULPGC) y Ana Amorim (Universidade de Lisboa), y se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado en Calidad Ambiental y Recursos Naturales (DOCARNA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Esta tesis doctoral supone parte de los resultados alcanzados dentro los proyectos europeos INTERREG POMAC 2014-2020 MIMAR (MAC/4.6d/066) y MIMAR+ (MAC2/4.6d/249) por el Observatorio Canario de Algas Nocivas-FPCT-ULPGC.

La tesis doctoral está estructurada en cinco capítulos. En el primer capítulo se presenta una introducción general que permite entender el contexto en el que se ha desarrollado la investigación. Los tres capítulos que siguen a la introducción general, es decir, los capítulos segundo, tercero y cuarto, comprenden el cuerpo de este documento, y corresponden con las tres hipótesis generales de estudio planteadas. Cada uno de estos capítulos supone una contribución científica original y está organizado de manera independiente siguiendo una estructura clásica que incluye los apartados de introducción, material y métodos, resultados, discusión y bibliografía correspondiente. En el momento de depósito de esta tesis doctoral, el segundo y tercer capítulo se encuentran ya publicados. En el quinto capítulo se presenta una pequeña discusión general en donde se evalúan, de forma conjunta, los resultados más relevantes obtenidos a lo largo de los tres capítulos anteriores. Por último, se exponen las conclusiones más importantes alcanzadas en esta tesis doctoral.

RESUMEN

Las proliferaciones algales nocivas bentónicas (BHABs, por sus siglas en inglés) son crecimientos de microalgas y cianobacterias, con frecuencia dinoflagelados, que se desarrollan en el fondo marino de zonas costeras y que pueden afectar a los ecosistemas y a la salud humana mediante la producción de toxinas o mucílagos, o ambos. Consideradas restringidas a áreas tropicales hasta finales del siglo pasado, en los últimos años los BHABs producidos por dinoflagelados parecen haberse vuelto más comunes en áreas subtropicales y templadas del planeta, aparentemente impulsados por el cambio climático y la actividad humana, pero también por una detección más efectiva de los mismos. Desde el año 2004, las Islas Canarias, un archipiélago situado frente a la costa noroeste de África, han suscitado un gran interés en la comunidad científica internacional por ser una de las regiones emergentes del planeta de este tipo de eventos. Esto es de especial preocupación para Canarias por la vinculación socioeconómica de su población al mar, por ser uno de los principales destinos de “turismo de playa” en Europa y por la notable biodiversidad marina que alberga. Por todo ello, existe una necesidad urgente por comprender mejor la diversidad y ecología de los organismos causantes de estos eventos en esta región.

A través de un conjunto de trabajos desarrollados en el mar entre 2017 y 2019, este estudio contribuye a responder algunas cuestiones básicas que resultan cruciales para avanzar en el estudio y seguimiento de los dinoflagelados BHAB en las Islas Canarias. La primera parte (capítulo 2) aborda la cuestión de cómo recoger muestras de dinoflagelados de manera adecuada para una estimación fiable de sus concentraciones celulares, lo que a su vez resulta esencial para estimar el riesgo asociado a sus proliferaciones. En la actualidad, la recolección de macrófitos supone el método más común. Sin embargo, estos presentan importantes desventajas; principalmente dificultan la normalización de las estimaciones de abundancia celular. Por este motivo, se comparó la idoneidad de este método para tal propósito con un método alternativo basado en el uso de sustratos artificiales. Los resultados obtenidos indicaron que, en general, el uso de sustratos artificiales proporciona estimaciones más precisas, permitiendo a su vez una comparación más realista de los resultados obtenidos en diferentes escalas espacio-temporales. El sustrato artificial es, por tanto, propuesto como

el método de referencia en la región. La segunda parte (capítulo 3) aborda la cuestión de en qué hábitats y bajo que condiciones ambientales proliferan los dinoflagelados BHAB en Canarias. El estudio y seguimiento de estos organismos se realizan de manera común en los primeros metros de la franja infralitoral tanto por su accesibilidad como por la disponibilidad de sustratos naturales, mientras que hábitats situados a mayores profundidades han permanecido inexplorados en la región. Por este motivo, se investigó la distribución vertical de la comunidad de dinoflagelados BHAB presente en el sur de la isla de El Hierro a lo largo de un año mediante el empleo de sustratos artificiales. Los resultados obtenidos indicaron que las poblaciones de algunos dinoflagelados encuentran condiciones más favorables para su crecimiento, principalmente menores niveles de movimiento del agua, en hábitats más profundos y durante períodos específicos del año, lo que sugiere la necesidad de reevaluar las estrategias de muestreo para una correcta estimación de las concentraciones celulares y la distribución de dinoflagelados BHAB en Canarias. Finalmente, la tercera parte (capítulo 4) aborda la cuestión de qué especies de dinoflagelados BHAB están presentes en el archipiélago. La mayoría de los estudios realizados en las Islas Canarias se han centrado en estudiar la diversidad de *Gambierdiscus* *Adachi* y *Fukuyo* por ser el principal género implicado en la ciguatera, el síndrome que en la actualidad representa el mayor riesgo para la salud asociado a estos eventos en la región. Sin embargo, se sabe que otros géneros BHAB están también presentes en el archipiélago. Este estudio se centró en estudiar la diversidad y distribución del *Coolia*, un género cuya taxonomía ha resultado controvertida en los últimos años por la presencia de una notable diversidad críptica. Como resultado, se identificaron un total de seis especies, algunas de ellas ampliamente distribuidas en la región. Este hallazgo, unido a los resultados obtenidos en estudios previos, sitúa a las Islas Canarias como la región del mundo con mayor diversidad de este género, lo que supone un aumento del número de especies potencialmente tóxicas que deben ser tenidas en consideración durante el estudio y seguimiento de BHABs en las Islas Canarias. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis son valiosos como base para el establecimiento de protocolos de seguimiento eficaces que permitan una alerta temprana de eventos BHAB en las Islas Canarias, posibilitando a su vez la toma anticipada de decisiones para una mejor evaluación y gestión de los riesgos asociados.

OVERVIEW

Benthic Harmful Algal Blooms (BHABs) are growths of microalgae and cyanobacteria, often dinoflagellates, that develop on the seafloor of coastal areas and can affect ecosystems and human health through the production of toxins or mucilages, or both. Considered restricted to tropical areas until the end of the last century, in recent years BHABs produced by dinoflagellates seem to have become more common in subtropical and temperate areas of the planet, apparently driven by climate change and human activity, but also by a more effective detection of their presence. Since 2004, the Canary Islands, an archipelago off the northwest coast of Africa, have generated great interest to the international scientific community as one of the planet's emerging regions for such events. This is of special concern for the Canary Islands because of the socioeconomic link of its population to the sea, because they are one of the main destinations for "beach tourism" in Europe and because of the remarkable marine biodiversity they harbor. For all these reasons, there is an urgent need to better understand the diversity and ecology of the organisms that cause these events in the region.

Through a set of works developed at sea between 2017 and 2019, this thesis contributes to answering some basic questions that are crucial to advance the study and monitoring of BHAB dinoflagellates in the Canary Islands. The first part of this study (chapter 2) addresses the question of how to collect dinoflagellate samples in an adequate way for a reliable estimation of their cell concentrations, which in turn is essential to estimate the risk associated with their proliferation. Currently, macrophyte collection is the most common method. However, these have significant disadvantages; mainly they make it difficult to standardize cell abundance estimates. For this reason, the suitability of this method for this purpose was compared with an alternative method based on the use of artificial substrates. Results indicated that, in general, the use of artificial substrates provides more accurate estimates, allowing a more realistic comparison of cell abundances obtained at different spatio-temporal scales. The artificial substrate is therefore proposed as the reference method in the region. The second part of this study (chapter 3) addresses the question of in which habitats and under

which environmental conditions BHAB dinoflagellates proliferate in the Canary Islands. The study and monitoring of these organisms are commonly carried out in the first meters of the infralittoral fringe, both for its accessibility and the availability of natural substrates. On the contrary, habitats located at greater depths have remained unexplored. For this reason, the vertical distribution of the BHAB dinoflagellate community present in the south of the island of El Hierro was investigated over a year using artificial substrates. The results obtained indicated that some dinoflagellate populations find more favorable conditions for their growth, mainly lower levels of water motion, in deeper habitats and during specific periods of the year, suggesting the need to reevaluate sampling strategies for the correct estimation of cell concentrations and distribution of BHAB dinoflagellates in the Canary Islands. Finally, the third part of this study (chapter 4) addresses the question of which species of BHAB dinoflagellates are present in the archipelago. Most of the studies carried out in the Canary Islands have focused on studying the diversity of *Gambierdiscus* Adachi & Fukuyo for being the main genus involved in ciguatera, the syndrome that currently represents the greatest risk to human health associated with these events in the region. However, other BHAB genera are also known to be present in the archipelago. This study focused on studying the diversity and distribution of *Coolia*, a genus whose taxonomy has been controversial in recent years due to the presence of remarkable cryptic diversity. As a result, a total of six species were identified, some of them widely distributed in the region. This finding, together with the results obtained in previous studies, places the Canary Islands as the region of the world with the greatest diversity of this genus, which means an increase in the number of potentially toxic species that should be taken into consideration during the study and monitoring of BHABs in the Canary Islands. Overall, the results obtained in this thesis are valuable as a basis for the establishment of effective monitoring protocols in the Canary Islands that allow early warning of BHAB events, enabling at the same time early decision making for better assessment and management of the associated risks.

GLOSARIO

Abióticos, factores. Componentes no vivos del medio ambiente que rodean a las especies que permiten su desarrollo y supervivencia.

Alelopatía. Fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen de manera positiva o negativa en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos.

Autótrofos, organismos. Organismos que tienen la capacidad de obtener la energía y los nutrientes a partir de materia inorgánica a partir de la luz solar (fotoautótrofos), o a través de procesos oxidativos de compuestos inorgánicos (quimiótrofos).

Bentónico. Que forma parte del bentos.

Bentos. En ecología, comunidad formada por los organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos.

Bióticos, factores. Componentes vivos del medio ambiente, así como las interacciones que se producen entre ellos.

Cadena trófica. Mecanismo de transferencia de materia orgánica y energía a través de las distintas especies de seres vivos (consumidos y consumidores) que componen una comunidad biológica o ecosistema.

Cebador. Cadena relativamente corta de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN en algunas técnicas de biología molecular como la PCR.

Clado. Cada una de las ramificaciones que se obtiene después de hacer un único corte en el árbol filogenético. Los clados terminales de un árbol filogenético corresponderían con las especies.

Ecología. Parte de la biología que estudia las relaciones de los seres vivos entre sí y con el entorno en el que viven.

Epibentónico: organismos o procesos que ocurren en la interfaz del fondo marino y el agua, especialmente en la zona litoral o bentónica cercana a la costa. Estos organismos habitan en la capa superficial del fondo o se adhieren a las superficies subacuáticas.

Eucariota. Organismo cuyas células se caracterizan por presentar un citoplasma compartimentado por membranas lipídicas y un núcleo celular organizado.

Fanerógama marina. Plantas superiores, es decir, aquellas con órganos diferenciados y tejidos vasculares, adaptadas a vivir en el mar y que son comunes en las aguas poco profundas de los mares templados y cálidos de todo el planeta. Sus densas formaciones, a menudo conocidas como praderas, constituyen ecosistemas marinos altamente productivos.

Fenología. Ciencia que estudia la relación entre los factores ambientales y los ciclos de vida de los seres vivos.

Filogenia molecular. Disciplina de la biología evolutiva que estudia las relaciones de parentesco entre las distintas especies o taxones mediante la comparación de caracteres moleculares (p. ej. secuencias de ADN) como caracteres taxonómicos.

Filogrupo. Agrupación de secuencias genéticas dentro de un árbol filogenético.

Fitoplancton. Conjunto de organismos de vida acuática que forman parte del plancton, y que se caracterizan por ser capaces de alimentarse de manera autótrofa mediante el proceso de la fotosíntesis.

Fotosíntesis. Proceso metabólico a través del cual algunos organismos son capaces de convertir la energía de la luz (solar) en energía química en forma de azúcares a partir de agua y dióxido de carbono, liberando a su vez oxígeno como subproducto.

Franja infralitoral. Zona que comprende los fondos marinos permanentemente sumergidos, desde el nivel inferior de la bajamar hasta la profundidad máxima compatible con el desarrollo de las algas fotófilas y las fanerógamas marinas. Su extensión depende directamente del grado de transparencia del agua, pudiendo situarse a 60 m de profundidad en aguas muy transparentes. En las costas atlánticas el límite inferior no suele sobrepasar los 15-20 m

Fronde. Porción erecta de las algas, que comprende la lámina y la estipe

Hábitat. En ecología, lugar cuyas condiciones son adecuadas para el desarrollo de un organismo, especie o comunidad, ya sea animal o vegetal.

Metabolito secundario. Compuestos orgánicos que no están directamente involucrados en las funciones vitales del organismo que los produce (a diferencia de los metabolitos primarios) pero que son de ayuda en funciones importantes como la protección, la competencia o las interacciones entre especies.

Microscopio electrónico de barrido (MEB). Microscopio que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz sobre la superficie externa de una muestra para formar una imagen de alta resolución de su superficie.

Macrófito. Organismos vegetales que se pueden ver a simple vista.

Monofilético. En filogenia, grupo de organismos que ha evolucionado a partir de una población ancestral común.

Plancton. Conjunto de organismos (animal, vegetal, bacteria, virus), en su mayoría microscópicos, que flotan a la deriva en los océanos y también en cuerpos de agua dulce como ríos o lagos.

Producción primaria. Producción de materia orgánica que realizan los organismos autótrofos, y que supone el punto de partida de la circulación de la energía y los nutrientes a través de las cadenas tróficas.

Polifilético. En filogenia, grupo de organismos que no han evolucionado a partir de una población ancestral común reciente y que por tanto está constituido por la unión artificial de ramas dispersas del árbol evolutivo.

Oligotróficas, aguas. Aguas pobres en nutrientes y, por tanto, de baja productividad.

PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa). Técnica de la biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias a partir de pequeñas cantidades de ADN de partida, lo que facilita la secuenciación de genes.

Ribotipo. Perfil genético basado en las diferencias en la secuencia del ADN ribosómico (rDNA), utilizado para clasificar y diferenciar (micro)organismos.

Taxonomía. Dentro de la biología, ciencia que trata de los principios para la ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.

Termociclador. Instrumento empleado en biología molecular que permite realizar de forma automatizada y secuencial los ciclos de temperaturas necesarios para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la amplificación del ADN.

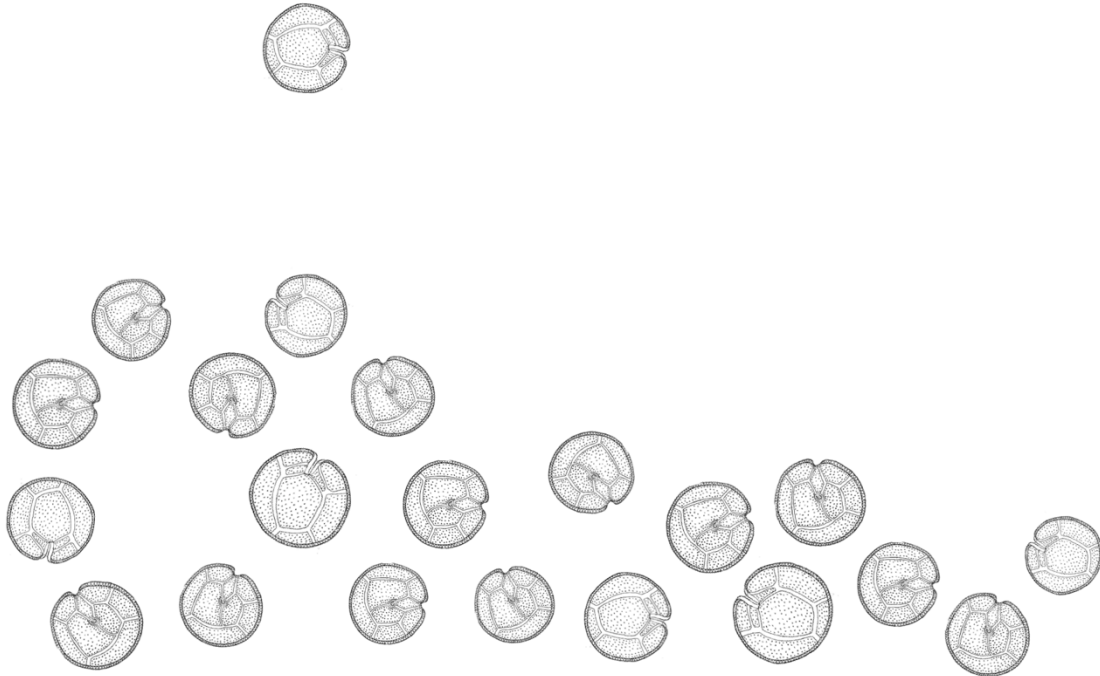
Ticoplanctónico, organismo. Organismo bentónico que temporalmente pueden aparecer suspendidos en la columna de agua (Steidinger y Baden, 1984).

Transecto. En ecología, muestreo caracterizado por la toma de datos en determinados recorridos prefijados.

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN GENERAL



Ilustraciones realizadas por Fukuyo y Adachi (1979) para la descripción de Gambierdiscus toxicus.

Floraciones algales nocivas o HABs

Floración Algal Nociva o HAB (*Harmful Algal Bloom*) es un término adoptado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (*Intergovernmental Oceanographic Commission*, IOC) de la UNESCO y aceptado internacionalmente para designar cualquier proliferación de microalgas, macroalgas o cianobacterias cuando, independientemente de su concentración, esta es percibida como dañina o perjudicial por el impacto negativo que produce en la salud pública, la acuicultura, el medio ambiente y las actividades recreativas (Reguera *et al.*, 2011). De acuerdo con la IOC-UNESCO, un número aproximado de 300 especies de diferentes grupos taxonómicos es capaz de formar HABs, aunque la mayoría de estas especies son dinoflagelados (Ocrophyta), diatomeas (Heterokontophyta) o cianobacterias (Cyanophyta). A menudo los HABs ocurren en ecosistemas marinos costeros, como resultado de una combinación compleja de mecanismos físicos, químicos y biológicos, y se considera que prácticamente todas las regiones costeras del mundo son susceptibles de verse afectadas por estos eventos (Anderson *et al.*, 2012). A pesar de ello, estos son también comunes en el océano abierto o en aguas continentales como lagos o embalses. Los HABs involucran, además, una variedad de mecanismos a través de los cuales producen sus impactos. Algunos son causados por especies que cuando proliferan producen discoloraciones en el agua que a menudo resultan inofensivas pero que, en condiciones excepcionales, como en bahías protegidas, pueden crecer tan densamente que causan la muerte indiscriminada de la vida acuática tras la depleción de oxígeno. Existen también HABs producidos por especies que, sin necesidad de alcanzar siempre elevadas concentraciones celulares, son capaces de sintetizar potentes toxinas que pueden llegar a los humanos por contacto, inhalación o a través de la cadena alimentaria, causándoles una variedad de síndromes respiratorios, gastrointestinales y neurológicos (Tabla I). De acuerdo con el listado taxonómico de referencia de microalgas nocivas de la IOC-UNESCO, 196 especies están consideradas en la actualidad como potencialmente tóxicas, de las cuales 160 son marinas (www.marinespecies.org/hab/). Por último, existen HABs producidos por especies que no son perjudiciales para el ser humano, pero que afectan a los peces y los invertebrados, especialmente en sistemas de acuicultura intensiva,

por el daño o obstrucción que pueden causar en sus branquias o por las toxinas que producen (Hallegraeff *et al.*, 2004).

Tabla I. Síndromes humanos causados por toxinas sintetizadas por microalgas y cianobacterias (adaptado de Lassus *et al.*, 2015).

Síndrome	Familia de toxinas	Organismo causante
Intoxicación por Azaspirácidos (<i>Azspiracid Shellfish Poisoning</i> , AZP)	Azaspirácidos (AZAs)	Dinoflagelados de los géneros <i>Amphidoma</i> y <i>Azadinium</i>
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> , ALS)	βmethyl-amino alanina	Dinoflagelado <i>Heterocapsa triqueta</i> y cianobacterias del género <i>Nostoc</i>
Intoxicación neurotóxica por consumo de marisco (<i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i> , NSP)	Brevetoxina (BTXs)	Dinoflagelados del género <i>Karenia</i>
Intoxicación por Ciguatera (<i>Ciguatera Poisoning</i> , CP)	Ciguatoxinas (CTXs)	Dinoflagelados del género <i>Gambierdiscus</i> y <i>Fukuyoa</i>
Intoxicación amnésica por consumo de marisco (<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i> , ASP)	Ácido Domoico (DA)	Diatomeas de los géneros <i>Nitzschia</i> y <i>Pseudo-nitzschia</i>
Toxicidad por aerosol (<i>Aerosol Toxicity</i> , AST)	Brevisulcenas	Dinoflagelado <i>Karenia brevisulcata</i>
Dermatotoxicidad (<i>Dermatotoxicity</i> , DDT)	Lynngbyatoxinas	Cianobacteria <i>Lynbya majuscula</i>
Hepatotoxicidad (<i>Hepatotoxicity</i> , HPT)	Nodularinas	Cianobacteria <i>Nodularia spumigena</i>
Intoxicación diarreica por consumo de marisco (<i>Diarrheic Shellfish Poisoning</i> , DSP)	Ácido Ocadáico (OA) y Dinophysistoxinas (DTXs)	Dinoflagelados del género <i>Dinophysis</i>
Toxicidad por aerosol (<i>Aerosol Toxicity</i> , AST) y Clupeotoxicidad (<i>Clupeotoxism</i> , CPT)	Palitoxinas (PTXs)	Dinoflagelados del género <i>Ostreopsis</i>
Intoxicación parálitica por consumo de marisco (<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i> , DSP)	Saxitoxinas (STXs)	Dinoflagelados del género <i>Alexandrium</i> y las especies <i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>Pyrodinium bahamense</i>

A pesar de que existen evidencias claras de que los HABs son eventos completamente naturales, que han ocurrido durante millones de años (p. ej. Koenigswald *et al.*, 2004 o Markham, 2017), en las últimas décadas la comunidad científica ha percibido un aumento en su frecuencia, intensidad y distribución a nivel mundial (Hallegraeff, 1993; Wells *et al.*, 2020), lo que ha causado un incremento paralelo de los estudios, programas de seguimiento, conferencias científicas, etc. Durante este tiempo, dos preguntas han sido repetidas con frecuencia: ¿Existe realmente un fenómeno de expansión? Y, en caso de existir, ¿qué lo está causando? (Lassus *et al.*, 2015). De este modo, la

realidad de este fenómeno se ha visto sometida a un intenso debate científico, motivado en gran medida por la falta de series de registros temporales para la observación de tendencias a largo plazo, lo que ha popularizado el uso del adjetivo “aparente” en la literatura científica al respecto. En general, este fenómeno se ha atribuido a procesos y mecanismos que son resultado del cambio climático, como el calentamiento del agua o el aumento de las tormentas, y de la actividad humana, como la eutrofización, la dispersión de especies por transporte de aguas de lastre o de animales destinados a la acuicultura o la alteración de hábitats costeros por obras litorales o sobrepesca (Hallegraeff *et al.*, 2004). Muchos autores han señalado también que, la percepción de expansión que tiene el ser humano, podría estar influenciada por una mayor utilización de recursos costeros donde los HABs producen sus impactos, así como por una mayor y mejor capacidad para su detección (p. ej. Wells *et al.*, 2020). En relación a esto, Hallegraeff *et al.* (2021) publicaron recientemente un estudio sin precedentes en el que se analizaron un número aproximado de 9500 eventos HAB de todo tipo registrados en diferentes partes del mundo entre 1985 y 2018. En él, no se encontraron evidencias suficientes que avalasen la existencia de una tendencia uniforme en el incremento y expansión de los HABs a nivel global. Por ello, estos autores sugirieron que nuestra percepción podría estar causada en buena medida por un aumento y mejora de nuestra capacidad para su detección, así como a una mayor sensibilidad a sus impactos como consecuencia de nuestra creciente necesidad por explotar los recursos marinos costeros en respuesta al incesante crecimiento de la población mundial. Sin embargo, Hallegraeff *et al.* (2021) si hallaron indicios de que los HABs están experimentando variaciones en su tendencia a nivel regional de aumento, disminución o estabilidad, que podrían estar influenciadas en algunos casos por factores como el calentamiento del agua o la eutrofización, así como variaciones de los tipos de HAB que impulsan esas tendencias dentro de una misma región. De esta forma, concluyeron que es necesario seguir realizando estudios ecológicos para cada región y especie, pues entender mejor la dinámica de estos eventos a nivel local hará posible una interpretación rigurosa de sus tendencias a nivel global.

HABs en las Islas Canarias

Hasta principios del siglo XXI, el conocimiento sobre los HAB en las Islas Canarias permaneció limitado a unas pocas citas de especies potencialmente nocivas, principalmente dinoflagelados y diatomeas, provenientes de estudios sobre la diversidad y la abundancia del fitoplancton de distintas zonas del archipiélago (Ojeda, 1985, 1996, 1998, 1999) (Fig. 1). La primera observación de un HAB en la región tuvo lugar en el año 2004, cuando se documentaron en la isla de Fuerteventura cinco casos de Ciguatera (CP) (Pérez-Arellano *et al.*, 2005), el síndrome alimentario no bacteriano que más personas afecta en el mundo cada año (entre 10 000 y 50 000 personas), y que se adquiere tras la ingestión de peces y animales marinos que portan toxinas (ciguatoxinas, CTXs) biomagnificadas y biotransformadas a través de las cadenas tróficas (revisado en Chinain *et al.*, 2021). Pocas semanas después, el género de dinoflagelado bentónico responsable de causar este síndrome, es decir, *Gambierdiscus*, fue citado en el archipiélago (Fraga *et al.*, 2004), lo que supuso una evidencia de que el pez implicado en los casos de CP podría haber acumulado CTXs en cadenas tróficas de aguas canarias. Durante el verano de aquel mismo año, se registraron también las primeras proliferaciones de la cianobacteria *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg ex Gomont en la zona oriental del archipiélago en forma de “manchas marrones”, tal y como las describieron los periódicos locales, tras un periodo de condiciones climáticas y oceanográficas inusuales (Ramos *et al.*, 2005). Las manchas fueron arrastradas por las corrientes hasta las costas de Tenerife y Gran Canaria, donde quedaron retenidas en playas, bahías y muelles. *T. erythraeum* está considerada una especie HAB debido a que, en condiciones excepcionales, sus floraciones pueden ser tan densas que causan la muerte indiscriminada de peces e invertebrados tras el consumo de oxígeno en ciertos lugares como bahías protegidas (Hallegraeff *et al.*, 2004), o crean incertidumbre entre los usuarios de zonas costeras recreativas, tanto por el aspecto visual, como por los olores que desprenden cuando estas alcanzan su fase terminal (Krishnan *et al.*, 2007). Algunas floraciones de *T. erythraeum* han sido relacionadas también con la producción de toxinas (Lassus *et al.*, 2015). Sin embargo, en aquella ocasión, las condiciones ambientales volvieron rápidamente a la normalidad,

favoreciendo la desaparición de las manchas en pocos días y limitando así su impacto potencial.

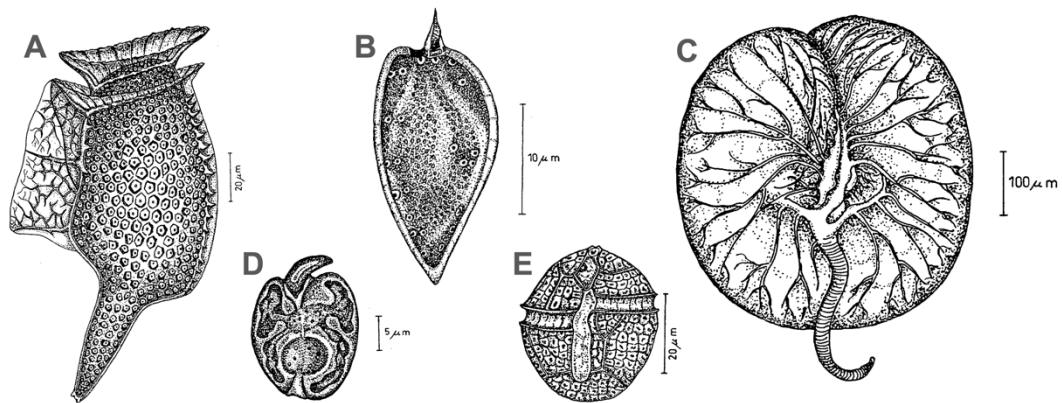


Figura 1. Ilustraciones de algunas de las primeras especies de dinoflagelados potencialmente nocivos identificadas en aguas de las Islas Canarias entre los años 1986 y 1996: **(A)** *Dinophysis caudata* Kent; **(B)** *Prorocentrum triestinum* Schiller; **(C)** *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoid; **(D)** *Amphidinium carterae* Hulburt; **(E)** *Protoceratium reticulatum* (Claparède y Lachmann) Bütschli. Adaptado de Ojeda (1998).

Tras un periodo de tres años sin registros de HABs, en 2008 tuvieron lugar nuevos eventos. A principios de aquel año se registró un nuevo fenómeno sin precedentes en la región; 12 delfines aparecieron muertos en la costa sur de Gran Canaria sin motivo aparente. Recientemente, Fernández *et al.* (2022) han atribuido estas muertes a la ingestión por parte de los cetáceos de peces que portaban brevetoxina, una toxina producida por especies del género de dinoflagelado planctónico *Karenia* Hansen y Moestrup que, aunque no se llegaron a observar durante el evento, se tiene constancia de su presencia en el archipiélago desde que fueran citadas por Ojeda y Soler-Onís (2013). Así, y de acuerdo con el estudio de Fernández *et al.*, (2022), la muerte de los cetáceos por dicha toxina supondría el primer y único registro de un suceso de tales características no solo en las Islas Canarias, si no en todo el continente europeo. A finales del año 2008, se registraron, además, 25 nuevos casos de CP en la isla de Tenerife (Boada *et al.* 2010).

En el año 2009, y tras descartar la naturaleza anecdótica de los casos de CP ocurridos en el año 2004, el Servicio Canario de Salud del Gobierno de Canarias estableció un sistema de vigilancia epidemiológica de la intoxicación por Ciguatera (SVEICC) con el propósito de prevenir nuevas intoxicaciones. Aquel mismo año tuvo lugar también el registro de un nuevo evento; una proliferación del dinoflagelado planctónico *Prorocentrum triestinum* Schiller en el interior del muelle deportivo de Pasito Blanco en el sur de Gran Canaria (García-Rojas, 2011). A pesar de que algunos autores como Ndhlovu *et al.* (2017) han documentado la capacidad de esta especie para crear zonas anóxicas en lugares confinados que pueden desencadenar grandes mortandades en la fauna marina tras la depleción de oxígeno, durante el evento registrado en el sur de Gran Canaria no se observó ningún impacto asociado.

Entre los años 2010 y 2011, se registraron las primeras floraciones de la cianobacteria bentónica tóxica *Lyngbya majuscula* Harvey Ex Gomont en Lanzarote y la Graciosa (Martin-García *et al.*, 2014). Desde entonces, las floraciones producidas por *Lyngbya* spp. han sido observadas de manera más o menos recurrente en las costas de las islas orientales del archipiélago, tal y como se indica más adelante, causando importantes regresiones de las praderas de *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, las cuales constituyen ecosistemas muy importantes para la región desde el punto de vista ecológico y económico por su función como refugio de un gran número de especies de interés comercial (Espino *et al.*, 2011). Además, algunos estudios han documentado también la capacidad que tiene esta especie de producir toxinas que causan efectos irritantes en la piel, ojos y sistema respiratorio (Lassus *et al.*, 2015). En el año 2011, tras un total de 38 casos de CP acumulados, la Dirección General de Pesca del Gobierno de Canarias estableció un Protocolo de actuación para el control oficial de la CTX, en el que se obligaba a realizar una prueba diagnóstica de su presencia en ciertas especies con un peso superior al establecido de manera previa a su comercialización. Asimismo, se registraron nuevas proliferaciones de *T. erytraerum* en las costas de Gran Canaria y Lanzarote que, en esta ocasión, sí obligaron a las autoridades al cierre temporal de algunas zonas de baño, a fin de prevenir su contacto con los bañistas. Por último, en el año 2011 se registró por primera vez una proliferación de *Noctiluca scintillans*

(Macartney) Kofoid y Swezy en la costa oriental de Fuerteventura, un dinoflagelado planctónico que, al igual que *T. erythraeum* y *P. triestinum*, puede provocar la muerte indiscriminada de la fauna marina tras la generación de zonas anóxicas en lugares confinados (Hallegraeff *et al.*, 2004). Sin embargo, en la costa de Fuerteventura, no se documentó ningún impacto.

En el año 2015, con un total de 107 casos acumulados y una incidencia anual media cercana a los 0,5 casos por 100 000 personas, la CP pasó a ser considerada una enfermedad de declaración obligatoria en las Islas Canarias (Dirección general de Salud Pública, 2023). En el año 2015 se produjo también el primer registro otro evento nunca antes observado en el archipiélago; la proliferación de un dinoflagelado HAB bentónico o BHAB en la costa oeste de Lanzarote, en aquel caso correspondiente al género *Ostreopsis* (Rodríguez *et al.*, 2017). Las floraciones de este género han sido relacionadas con intoxicaciones humanas tras el consumo de animales marinos en la región del Indo-Pacífico, así como con mortandades de fauna marina e intoxicación humana por aerosoles en el Mar Mediterráneo (referencias incluidas en Berdalet *et al.*, 2015). Sin embargo, ninguno de estos impactos fue documentado en la zona.

En la primera mitad del año 2016, tuvo lugar el segundo registro de una floración de *N. scitillans* en el archipiélago, en esta ocasión, cerca de la costa sur de Gran Canaria. Como sucedió en Fuerteventura, tampoco se observó ningún impacto asociado. A finales de aquel año, tuvo lugar una nueva floración de un dinoflagelado BHAB. Durante el Concurso internacional de Fotografía subacuática “Open FotoSub”, celebrado en el sur de El Hierro, se observó la presencia de una capa de color marrón que tapizaba el fondo marino. El análisis de las muestras recogidas indicó que se trataba del género *Gambierdiscus*, en concreto de la especie *Gambierdiscus caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester, que además resultó ser la más densa registrada hasta la fecha para este género en todo el mundo (Soler-Onís *et al.*, 2016). Conocidos los impactos producidos por *Gambierdiscus* en la región, la Dirección General de Recursos Pesqueros y Acuicultura del Ministerio de Medio Ambiente, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España declaró la prohibición

temporal de la pesca deportiva en la zona a fin de prevenir la captura de peces que pudieran haber ingerido CTXs sintetizadas durante dicha floración.

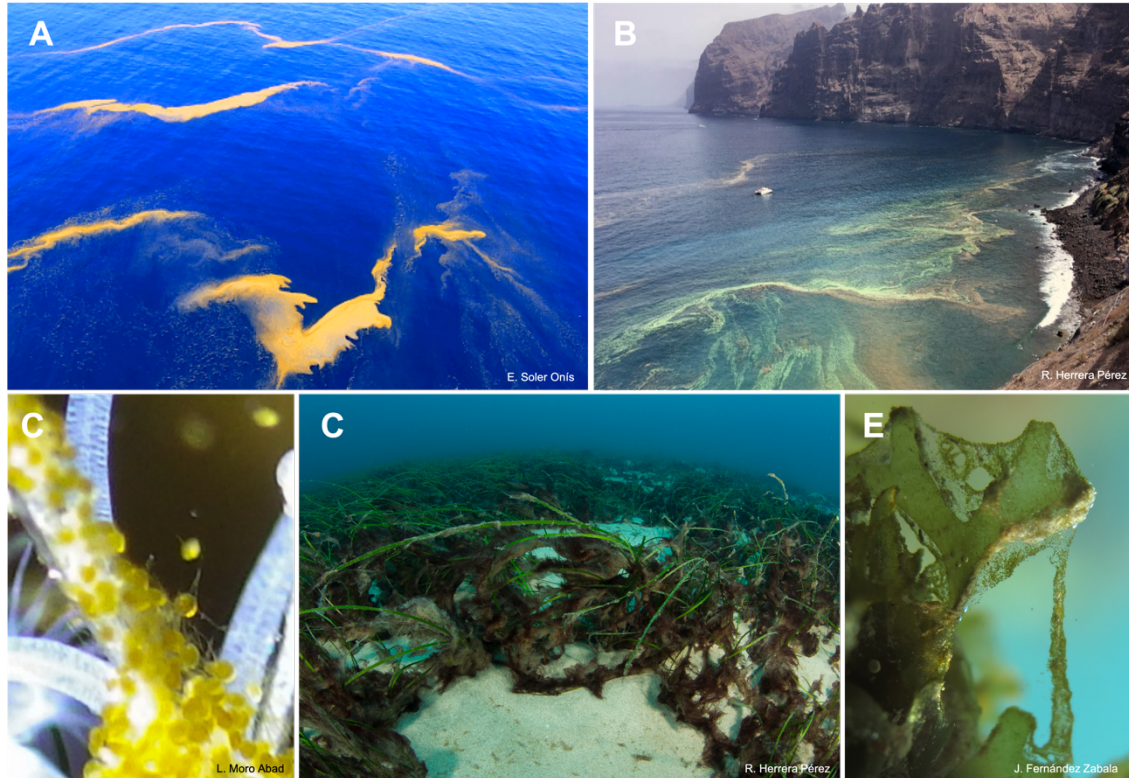


Figura 2. Ejemplos de HABs observados en las Islas Canarias durante la última década: **(A)** *N. scitillans*, sur de Gran Canaria, abril del 2016, **(B)** *T. erytraeum*, oeste de Tenerife, julio 2017, **(C)** detalle de *G. caribaeus* sobre *Halecium* sp., sur de El Hierro, octubre del 2016, **(D)** *L. majuscula* sobre *C. nodosa*, oeste de Fuerteventura, septiembre 2017 y **(E)** *Ostreopsis* spp. sobre *Dictyota* spp., este de Fuerteventura, octubre del 2017.

Tras casi dos décadas de registros de HABs en las Islas Canarias, en 2017 se puso en marcha el proyecto MIMAR (MAC/4.6d/066), con el objetivo principal de seguir, controlar y mitigar los cambios que se estaban produciendo en los ecosistemas marinos del archipiélago canario, así como en el resto de archipiélagos de la región macaronésica. Entre las acciones principales del proyecto, se estableció el estudio, control y seguimiento de especies productoras de HABs, y de las variables que determinan su distribución y favorecen su proliferación mediante bioprospecciones regulares a las islas. Uno de los

resultados más importantes de este proyecto fue la constitución del Observatorio Canario de Algas Nocivas (OCHAB) en el año 2019, fruto de un convenio de cooperación entre la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y el Gobierno de Canarias. A partir del año 2020, el proyecto MIMAR+ (MAC2/4.6d/249) tomó el relevo. En este nuevo proyecto se consolidaron y expandieron los avances en el conocimiento generado en MIMAR, se agruparon a los agentes interesados en toda la región bajo la cobertura de un Observatorio Marino dedicado a realizar una evaluación real de los impactos que están generando las especies introducidas e invasoras, los HABs y los cambios producidos por el calentamiento global y la actividad humana en los hábitats marinos, proponiendo metodologías comunes de seguimiento, control y mitigación.



Figura 3. Noticias en periódicos locales y nacionales documentando los impactos producidos por eventos HABs en las Islas Canarias.

Con el aumento de los esfuerzos de seguimiento, el registro de HABs en el archipiélago se ha visto incrementado de forma considerable en los últimos años. En el año 2017, se documentaron de nuevo floraciones de *T. erythraeum*, en las

costas de El Hierro, La Palma, La Gomera, Tenerife y Gran Canaria (Aristegui *et al.*, 2017) donde, en algunos casos, volvieron a conllevar el cierre temporal y preventivo de algunas zonas de baño. Aquel año se registraron también floraciones de *Gambierdiscus* spp. en la misma localidad de El Hierro donde Soler-Onís *et al.* (2016) documentaron la primera floración de este género el año anterior, así como nuevas floraciones en el sur de Tenerife, floraciones de *Lyngbya* spp. en las costas surorientales de Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote, y floraciones de *Ostreopsis* spp. en las costas surorientales de El Hierro, Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura (proyecto MIMAR). El año siguiente, las floraciones de *Ostreopsis* spp. continuaron registrándose en las costas surorientales de El Hierro, Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote, y las de *Gambierdiscus* spp. en El Hierro y en Fuerteventura (proyecto MIMAR). En el año 2018, se registraron por primera vez floraciones del dinoflagelado bentónico potencialmente tóxico *Coolia* en Tenerife y Fuerteventura (proyecto MIMAR). Hasta el momento, las floraciones de este género no se han podido asociar aún de manera directa a ningún impacto en el mar y, por ello, las únicas evidencias de su toxicidad provienen de ensayos experimentales realizados en condiciones de laboratorio (Lassus *et al.*, 2015). En el año 2019 se registraron de nuevo floraciones de *Ostreopsis* spp. y *Lyngbya* spp. en el sur de Tenerife, así como floraciones de *Gambierdiscus* spp. en el sur de El Hierro (proyecto MIMAR). Entre los años 2020 y 2021, las labores de seguimiento en el archipiélago se vieron afectadas como consecuencia de la alerta sanitaria internacional decretada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a causa de la pandemia de COVID-19. A pesar de ello, durante este tiempo se realizaron registros de floraciones de *Gambierdiscus* spp. en el sur de El Hierro, floraciones de *Ostreopsis* spp. en el noreste de Gran Canaria y floraciones de *Lyngbya* spp. en las costas surorientales de Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote (proyecto MIMAR+). En mayo del año 2022, tuvo lugar el registro de los últimos casos de CP en las Islas Canarias, con los que el número de casos contabilizados desde el año 2004 alcanzó un total de 131 (Dirección General de Salud Pública, 2023). Un mes más tarde, tuvo lugar también la detección más reciente de un HAB en el archipiélago, concretamente en la playa de Arinaga, Gran Canaria (proyecto MIMAR+), donde las masivas concentraciones de la especie *Ostreopsis* cf. *ovata* causaron la prohibición

preventiva del baño por parte de la Dirección General de Salud Pública del Gobierno de Canarias durante los días posteriores.

En conjunto, la investigación y el seguimiento de HABs realizado en las Islas Canarias durante casi veinte años ha demostrado que aproximadamente el 80% de las especies de microalgas y cianobacterias potencialmente nocivas presentes en la región son dinoflagelados (Proyectos MIMAR y MIMAR +). Las condiciones ambientales en las Islas Canarias parecen ser, además, particularmente favorables para la proliferación recurrente de especies bentónicas, las cuales ocurren a lo largo de todo el año y en toda la extensión del archipiélago.

Generalidades de los dinoflagelados

Los dinoflagelados son un grupo de microalgas unicelulares eucariotas con una variedad de adaptaciones ecológicas excepcionalmente amplia (Schnepf y Elbrächter, 1992). Esto les ha permitido estar presentes en todo tipo de hábitats acuáticos, desde zonas tropicales a zonas polares, aunque su mayor diversidad se encuentra en el mar (Gómez, 2012a). En la actualidad, se estima que existen entre 2000 y 2500 especies vivas, y se cree que muchas más permanecen aún por describir (Gómez, 2012a; 2012b). Además, existe una considerable diversidad de dinoflagelados fósiles, con más de 2500 especies descritas hasta la fecha (Taylor *et al.*, 2007), cuyo estudio resulta fundamental para entender la diversidad y las adaptaciones ecológicas de las especies vivas (Dale, 1996). Una de sus adaptaciones más importantes ha sido el desarrollo de una variedad de estrategias nutricionales. Aproximadamente la mitad de las especies son autótrofas, es decir, producen su propia materia orgánica a través de la fotosíntesis. La mayoría posee plastos derivados de una endosimbiosis secundaria con un alga roja, con tres membranas y clorofila a, c y peridininina como principales pigmentos fotosintéticos, lo que permite a la célula realizar la fotosíntesis en zonas donde la luz es limitada, como por ejemplo hábitats profundos. Otras tienen plastos derivados de una endosimbiosis terciaria con un

alga Prymnesiophyceae, que presentan una única membrana y pigmentos como la 19'-hexanoyloxy-fucoxantina y la 19'-butanoyloxy-fucoxantina. A diferencia de las primeras, estas especies son capaces de realizar la fotosíntesis en lugares donde la radiación lumínica es más intensa, como por ejemplo en aguas superficiales (Keeling, 2004). La otra mitad de especies son heterótrofas y carecen de plastos (Gómez, 2012a). Para llevar a cabo su nutrición, estas pueden ingerir directamente otros microorganismos (fagotrofia), digerirlos fuera de la célula usando un velo citoplasmático llamado *pallium*, absorber su material intracelular a través de un pedúnculo o extensión citoplasmática o absorber directamente materia orgánica disuelta en el medio (osmotrofia). Algunas especies heterótrofas también pueden adquirir los plastos (kleptoplastos) temporalmente de sus presas (Keeling *et al.*, 2004). Existen además especies mixótrofas, con plastos propios, pero con la capacidad de incorporar materia orgánica heterotróficamente en caso necesario (Jeong *et al.*, 2010). La mayoría de especies son de vida libre; viven dispersas en la columna de agua formando parte del fitoplancton, en el que representan, junto con las diatomeas, un componente mayoritario y fundamental para el mantenimiento de la vida en los ecosistemas acuáticos, o asociadas a sustratos del fondo de los sistemas acuáticos formando parte del microfítobentos. Otras establecen relaciones simbióticas con ciertos organismos, como la formada entre especies del género *Symbiodinium* Hansen y Daugbjerg y corales, en la que los primeros proveen con más del 95% de sus requerimientos nutricionales a los segundos recibiendo a cambio refugio (van Oppen, 2007). Existen también especies parásitas, algunas de organismos de interés comercial como ciertas especies de crustáceos, a los que pueden causar enfermedades que suponen importantes pérdidas económicas (p. ej. Stentiford y Shields, 2005). Los dinoflagelados presentan, además, ciclos de vida complejos, con una gran diversidad de estrategias reproductivas (Fig. 4). En general, las células se multiplican por división binaria (fase haploide). En condiciones favorables, este proceso puede ser muy rápido, y supone una de las claves por las cuales algunas especies son capaces de proliferar de forma masiva. Aunque menos conocida, la reproducción sexual (fase diploide) también existe, y parece ser, en comparación con la multiplicación vegetativa, mucho más diversa (Kremp, 2013). En algunos casos, el ciclo de vida de los dinoflagelados también puede incluir la formación de unas

estructuras conocidas como quistes. De forma general, se puede distinguir entre dos tipos; los quistes temporales, formados durante la etapa de multiplicación vegetativa con el objetivo de permitir que la población supere condiciones adversas breves, y los quistes de resistencia, formados habitualmente durante la fase final de una floración y entre cuyas funciones principales están la reposición y recombinación nuclear, la propagación o la dispersión de la especie. A diferencia de los primeros, los quistes de resistencia pueden permanecer latentes durante meses o años hasta volver a formar una célula vegetativa (Bravo y Figueroa, 2014).

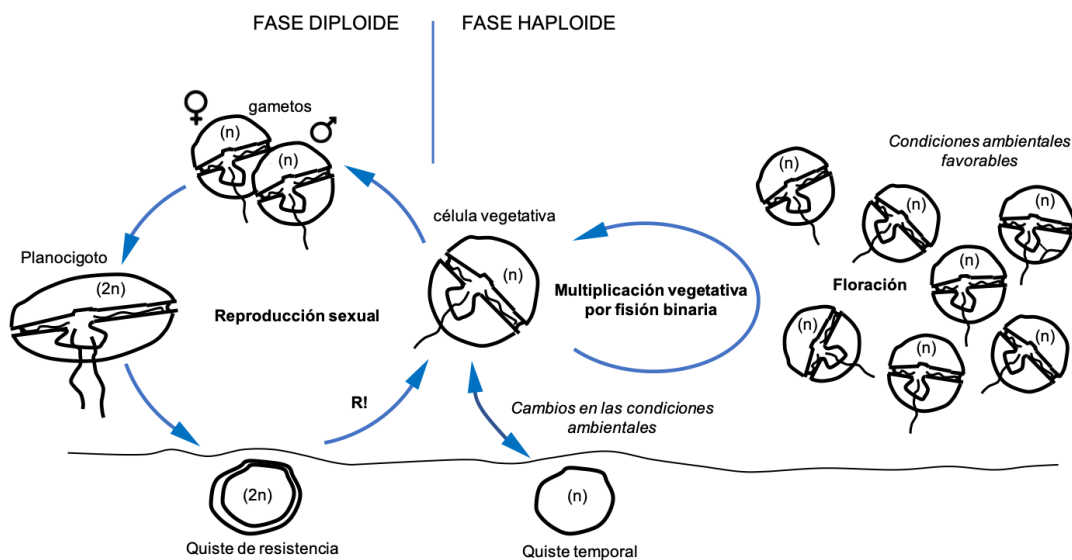


Figura 4. Esquema simplificado del ciclo de vida de un dinoflagelado.

Desde un punto de vista morfológico y ultraestructural, las células de los dinoflagelados poseen características únicas que las distinguen de otros grupos de eucariotas (Taylor *et al.*, 1987). Una de las más evidentes es la presencia de dos flagelos diferentes en forma y estructura (flagelos heterocontos), que confieren a la célula la capacidad de desplazarse con un característico patrón rotatorio. Esta característica fue el origen de la palabra “dinoflagelado”: del griego *δῖνος* (dinos), que significa «girar» o «dar vueltas», y del latín *flagellum*, o

«flagelo» (Bütschli, 1885). En la mayoría de especies, los flagelos emergen de la parte ventral de la célula y se alojan en dos ranuras o surcos. El cíngulo o surco transversal aloja el flagelo transversal y divide a la célula en una parte superior y otra inferior, mientras que el sulcus o surco longitudinal aloja el flagelo longitudinal y define la parte ventral de la célula (Fig. 5A). Los dinoflagelados que presentan esta disposición de los flagelos son los dinocoques (Fig. 5B). Unas pocas especies, la mayoría pertenecientes al género *Prorocentrum* Ehrenberg, carecen de estas ranuras, por lo que sus dos flagelos permanecen expuestos y emergen de una zona localizada en su parte apical conocida como área periflagelar (Taylor *et al.*, 2008). Los dinoflagelados que presentan esta disposición de los flagelos son los desmocontes (Fig. 5B). Otra característica reseñable de los dinoflagelados es su complejo revestimiento celular; el anphiesma (del griego εἶδη ἐνδύσης, que significa vestidura). En sus capas internas, el anphiesma presenta unas vesículas que, en algunos casos, contienen en su interior depósitos de celulosa (placas tecales), las cuales se disponen formando una especie de armadura rígida en los dinoflagelados armados o tecados. Por el contrario, en los dinoflagelados desnudos o atecados, estas vesículas están vacías o presentan cantidades reducidas de celulosa (Taylor, 1987) (Fig. 5A y B). Los dinoflagelados también presentan un núcleo característico; el dinocarión que, a diferencia del núcleo de otras células eucariotas, es grande, carece de histonas y presenta cromosomas que permanecen condensadas durante todo el ciclo celular (Fukuda y Suzuki, 2015) (Fig. 5A).

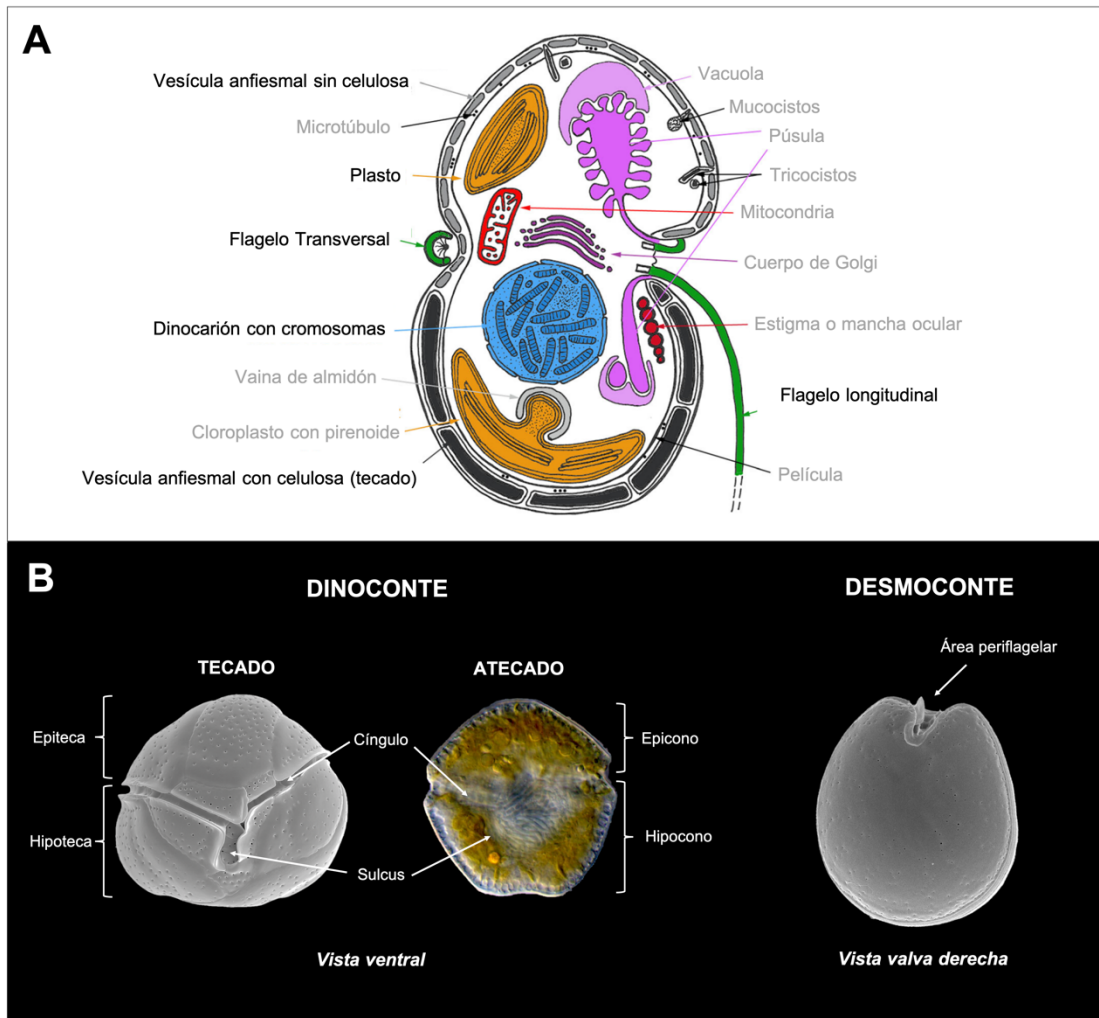


Figura 5. (A) Esquema de la ultraestructura de una célula general de dinoflagelado. Adaptado de Hoppenrath *et al.* (2017). **(B)** Visión general de la morfología de las células de los dinoflagelados tecados y atecados y disposición de los flagelos.

Identificación y clasificación

La identificación y clasificación de especies de dinoflagelados HAB es una rutina básica en cualquier estudio ecológico o programa de seguimiento, que permite distinguir a las especies nocivas de aquellas que no lo son. Tradicionalmente, esto se ha llevado a cabo de acuerdo a caracteres morfológicos presentes en las células vegetativas, detectables mediante microscopía óptica y, más recientemente, también mediante otras técnicas microscópicas como la microscopía electrónica de barrido (MEB). En general, el tamaño y la forma de

la célula se consideran características importantes para este propósito. Cuando está presente, la ornamentación de la superficie de la célula (poros, espinas, crestas, etc.) también puede ser usada (Hallegraeff *et al.*, 2004). En los dinoflagelados armados, el número, forma y disposición de las placas tecales, es decir, su tabulación, supone una característica principal (Taylor *et al.*, 1987). Por el contrario, la ausencia de placas tecales en las especies desnudas puede complicar considerablemente su identificación y clasificación, lo que hace necesario recurrir a otras características como son la posición del núcleo o la forma y número de los cloroplastos, cuando estos están presentes (Fraga *et al.*, 2014).

Durante las últimas décadas, la incorporación de las técnicas de biología molecular en el estudio de dinoflagelados, basadas en la medición y comparación de diferencias en la composición de ciertas secuencias de sus genomas, ha contribuido significativamente en la identificación y clasificación de especies. La técnica de “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) ha posibilitado la obtención de grandes cantidades de material genético de manera rápida y sencilla, facilitando significativamente la secuenciación del ADN (Litaker y Tester, 2002). La PCR ha dado paso a la aplicación de técnicas de filogenia molecular para la observación de relaciones evolutivas entre grupos de dinoflagelados. La creciente disponibilidad de secuencias en las bases de datos como *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), ha permitido a los taxónomos centrar la búsqueda de diferencias morfológicas directamente entre aquellos dinoflagelados que se sitúan más próximos en los árboles filogenéticos, es decir, que muestran una mayor relación evolutiva, lo que ha acelerado la identificación y clasificación de especies (Gómez *et al.*, 2011). En la actualidad, la mayoría de publicaciones taxonómicas incluyen análisis filogenéticos, las cuales apoyan, en muchos, casos la delimitación de especies hecha en base a sus caracteres morfológicos.

En ocasiones, el uso de técnicas moleculares también ha puesto de manifiesto la existencia de una variabilidad genética significativa dentro de una misma especie, lo que se ha considerado indicativo de la presencia de especies crípticas, es decir, especies tan similares que sus diferencias morfológicas

pueden resultar difíciles de observar (Fraga, 2014). La existencia de esta diversidad “oculta” puede atribuirse, en primer lugar, a que algunas descripciones fueron realizadas hace décadas con microscopios rudimentarios, y carecen de información suficiente para una determinación fiable de las especies. En otros casos, las descripciones son realizadas por taxónomos que, aún contando con microscopios modernos, no consideran o no conceden la importancia suficiente a pequeños y sutiles detalles que son exclusivos de una especie. Ambas situaciones han dado lugar a que especies diferentes hayan sido identificadas y clasificadas sistemáticamente en estudios posteriores de acuerdo a una misma descripción. Además, la escasez de datos de campo, el muestreo insuficiente a nivel espacio-temporal en ciertas regiones, la baja abundancia de ciertas especies o las dificultades para establecer y mantener cultivos son también factores que podrían haber contribuido a mantener esta diversidad oculta (Verma *et al.*, 2016). Una vez reconocida la existencia de una diversidad críptica dentro de una especie, un análisis morfológico más exhaustivo ha permitido, en muchos casos, la descripción de nuevas especies y una mejor delimitación de la especie “original” (p. ej. Verma *et al.*, 2016). Cuando esto sucede, las especies crípticas pasan a ser consideradas pseudocrípticas, lo que significa que estas pueden ser identificadas a través de su morfología, aunque siempre será recomendable apoyar la identificación con la perspectiva genética (Mann y Evans, 2008; Lundholm *et al.*, 2012). En cambio, cuando las diferencias morfológicas no se consiguen observar (p. ej. Fraga *et al.*, 2008), el conjunto de especies crípticas debe considerarse como diversidad de genotipos y no como especies separadas (Guiry, 2012; Hoppenrath *et al.*, 2017).

Dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos o BHABs

Tradicionalmente, los HABs más estudiados han sido los producidos por especies del fitoplancton (Spector, 1984), mientras que el estudio de los producidos por especies del microfítobentos o BHABs es más reciente. Esto no quiere decir que no existiera un conocimiento previo de los organismos implicados en estos eventos, pues las primeras especies bentónicas (p. ej. *Amphidinium operculatum* Claparède y Lachmann, *Coolia monotis* Meunier o *Ostreopsis siamensis* Schmidt) fueron descritas entre finales del siglo XIX y principios del XX. Lo que ocurrió fue sencillamente que el ser humano tardó más tiempo en relacionarlos con los impactos que hoy en día sabemos que producen y, por tanto, en considerarlos como especies formadoras de HABs. Probablemente, esto fue en gran parte debido a que las proliferaciones bentónicas son más difíciles de detectar que las planctónicas, pues a menudo estas son menos densas y extensas, producen discoloraciones menos vistosas, o simplemente no las producen y, lo más importante, se desarrollan en el fondo marino, alejadas de nuestros ojos y también de nuestros satélites.

El inicio del estudio de los BHABs puede situarse a finales de 1970, cuando Yasumoto *et al.* (1977) señalaron a un dinoflagelado bentónico, descrito poco después como *Gambierdiscus toxicus* por Adachi y Fukuyo (1979), como el responsable de producir las toxinas que causan la CP en zonas tropicales del planeta. Desde aquel momento, la comunidad científica comenzó a interesarse por el estudio de la biología, taxonomía, ecología, toxicología, etc. de esta especie. Al mismo tiempo, otras especies presentes en los mismos hábitats que *G. toxicus*, como por ejemplo *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo o *Prorocentrum concavum* Fukuyo, se convirtieron en sospechosas de participar en este síndrome (p. ej. Morton y Faust, 1997 o Tindall y Morton, 1998). Sin embargo, dado que la CP se encontraba restringida a áreas tropicales como el mar Caribe y algunas zonas del Océano Pacífico, su investigación fue limitada y poco relevante en el mundo occidental. En los últimos años, muchos estudios han documentado la presencia de especies bentónicas potencialmente nocivas y, en algunos casos, de los BHABs que estas producen (principalmente especies de los géneros *Gambierdiscus* y *Ostreopsis*) en zonas subtropicales y templadas

del planeta, donde eran poco comunes o nunca antes habían sido observadas, como Brasil, Nueva Zelanda, Japón, las costas del Mar Mediterráneo o la región macaronésica (GEOHAB, 2012). Precisamente, las intoxicaciones que tuvieron lugar en las Islas Canarias en el año 2004 supusieron el primer registro en la historia de la CP del consumo de un animal capturado fuera del área que había sido considerada como endémica hasta la fecha (Chinain *et al.*, 2021). Durante este tiempo, el aumento de los estudios, junto con la mejora de las técnicas microscópicas, moleculares, etc. ha permitido observar la existencia de una considerable biodiversidad de especies bentónicas con capacidad para producir potentes biotoxinas o mucílagos, o ambos, que pueden alterar el funcionamiento normal de los ecosistemas y afectar de manera negativa la salud humana y animal (Berdalet *et al.*, 2015; Durán-Riveroll *et al.*, 2019).

Diversidad

Durante años, diversos autores como Saburova *et al.* (2009) han recopilado la diversidad de dinoflagelados bentónicos marinos a escala local, lo que ha permitido tener una idea aproximada del número de especies dentro de este grupo. En el año 2014, Hoppenrath *et al.* recopilaron por primera vez en una guía la diversidad mundial de dinoflagelados bentónicos marinos, contabilizando un total de 190 especies agrupadas en 45 géneros. A pesar de que este número no ha sido aún actualizado, es probable que, debido al ritmo de la investigación en los últimos años, este sea significativamente superior en la actualidad. En este sentido, la autora de dicha guía ya reconoció, tan solo tres años después, la existencia de al menos 30 nuevas especies aún sin describir (Hoppenrath *et al.*, 2017). A pesar de ello, la diversidad de dinoflagelados bentónicos puede considerarse baja en comparación con la de sus homólogos planctónicos, pues apenas una de cada siete especies pertenece a este grupo (Gómez, 2012). Sin embargo, la proporción de dinoflagelados potencialmente tóxicos resulta significativamente mayor en los hábitats bentónicos ($\approx 1/5$) que en los planctónicos ($\approx 1/25$), lo que pone de manifiesto la relevancia de este conjunto de especies dentro del fenómeno HAB. Aunque las razones que expliquen la

presencia de una mayor proporción de especies tóxicas en los ambientes bentónicos aún no se comprenden completamente, algunos investigadores como Cembella (2003), han sugerido que la competencia química podría ser un factor importante. De acuerdo con este autor, en comparación con los ambientes planctónicos, en los bentónicos las especies están limitadas por el espacio y la difusión de moléculas es menor, lo que favorece la competencia química. En estos ambientes, algunas especies podrían inhibir el crecimiento y la reproducción de otras especies al producir compuestos tóxicos, lo que les otorgaría una ventaja competitiva en la lucha por los recursos limitados. Además, Cembella (2003) sugiere que el hecho de que los ambientes bentónicos estén más expuestos que los planctónicos a factores de estrés ambiental, como por ejemplo las fluctuaciones diarias de temperatura que ocurren en una charca intermareal, podría haber aumentado la presión selectiva sobre las especies que en ellos habitan en favor de aquellas capaces de producir compuestos tóxicos. En la actualidad, un número aproximado de 40 especies bentónicas pertenecientes a 6 géneros, es decir, *Gambierdiscus*, *Fukuyoa*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Amphidinium*, están consideradas como productoras potenciales de biotoxinas (Tabla II). En muchos casos, estos géneros comparten los mismos hábitats, por lo que no resulta raro observarlos juntos cuando se analiza una muestra bajo el microscopio (Fig. 6).

Tabla II. Listado de especies de dinoflagelados bentónicos consideradas en la actualidad como tóxicas o potencialmente tóxicas, toxinas y síndromes y/o síntomas que producen. La información procede de revisiones bibliográficas de Hoppenrath *et al.* (2014), Lassus *et al.* (2015), Tester y Kibler (2018), Tester *et al.* (2020) y el listado taxonómico de referencia de microalgas nocivas de IOC-UNESCO.

Especie	Toxinas	Síndromes y/o síntomas
Gambierdiscus		
<i>G. australes</i> Chinian y Faust		
<i>G. balechii</i> Fraga, Rodríguez y Bravo		
<i>G. belizeanus</i> Faust		
<i>G. caribaeus</i> Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester		
<i>G. carolinianus</i> Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland y Tester		Ciguatera (Ciguatera Poisoning, CP).
<i>G. carpenteri</i> Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea y Tester		Síntomas gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares incluyendo entumecimiento y hormigueo de manos y pies, inversión de la sensación de temperatura, dificultad para el equilibrio, frecuencia cardíaca y la presión arterial baja, erupciones cutáneas. En casos extremos la CP puede producir la muerte por fallo respiratorio.
<i>G. cheloniae</i> Smith, Rhodes y Murray		
<i>G. excentricus</i> Fraga		
<i>G. lapillus</i> Kretzschmar, Hoppenrath y Murray	Ciguatoxinas (CTXs); Maitoxinas (MTXs); Gambiertoxinas; Gambierol	
<i>G. pacificus</i> Chinain y Faust		
<i>G. polynesiensis</i> Chinain y Faust		
<i>G. scabrosus</i> Nishimura, Sato y Adachi		
<i>G. silvae</i> Fraga y Rodríguez		
<i>G. toxicus</i> Adachi y Fukuyo		
Fukuyoa		
<i>Fukuyoa paulensis</i> Gómez, Qiu, Lopes y Lin		
<i>Fukuyoa ruetzeri</i> (Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland y Tester) Gómez, Qiu, Lopes y Lin		
Ostreopsis		
<i>O. fattorussoi</i> Accoroni, Romagnoli y Totti		
<i>O. heptagona</i> Norris, Bomber y Balech		
<i>O. lenticularis</i> Fukuyo		
<i>O. mascarenensis</i> Quod		
<i>O. ovata</i> Fukuyo		
<i>O. rhodesiae</i> Verma, Hoppenrath y Murray		
<i>O. siamensis</i> Schmidt		
	Palitoxinas (PLTXs); Ostreocinas (OTCs); Ostreotoxinas (OTXs); Mascarenotoxinas	Irritación dérmica, ocular y enfermedades respiratorias debidas a la inhalación de aerosoles. Rabdomiólisis tras el consumo de pescado contaminado con PLTXs. Afecciones en organismos bentónicos.
Coolia		
<i>C. malayensis</i> Leaw, Lim y Usup		
<i>C. tropicalis</i> Faust		
<i>C. palmyrensis</i> Karafas, Tomas y York		
<i>C. santacroce</i> Karafas, Tomas y York		
	Cooliatoxina; Cooliatina; Maitoxinas (MTXs)	Síntomas similares a los producidos por yesotoxinas (YTXs). Hipotermia y fallo respiratorio en ratones.
Procentrum		
<i>P. borbonicum</i> Ten-Hage, Turquet, Quod, Puiseux-Dao y Couté		
<i>P. caipirignum</i> Fraga, Menezes y Nascimento		
<i>P. concavum</i> Fukuyo		
<i>P. emarginatum</i> Fukuyo		
<i>P. hoffmannianum</i> Faust		
<i>P. leve</i> Faust, Vandersea, Kibler, Tester y Litaker		
<i>P. lima</i> (Ehrenberg) Stein		
<i>P. maculosum</i> Faust		
<i>P. mexicanum</i> Osorio-Tafall		
<i>P. rhathymum</i> Loeblich III, Sherley y Schmidt		
<i>P. steidingerae</i> Gómez, Qiu y Lin		
	Ácido Ocadaico (AO); Toxinas de acción rápida (FAT); Dinophysistoxin (DTX); Hoffmanniolid; Procentrolide; Diol-esters.	Intoxicación diarreica por consumo de moluscos (Diarrheic Shellfish Poisoning, DSP). Estrés ribotóxico.
Amphidinium		
<i>A. carterae</i> Hulbert		
<i>A. gibbosum</i> (Maranda y Shimizu) Jørgensen y Murray		
<i>A. klebsii</i> Kofoid y Swezy		
<i>A. operculatum</i> Claparède y Lachmann		
	Macrólidos citotóxicos; Polyketidos; Polydroxylos; Polímeros extracelulares (EPS)	Actividad antifúngica y hemolítica.

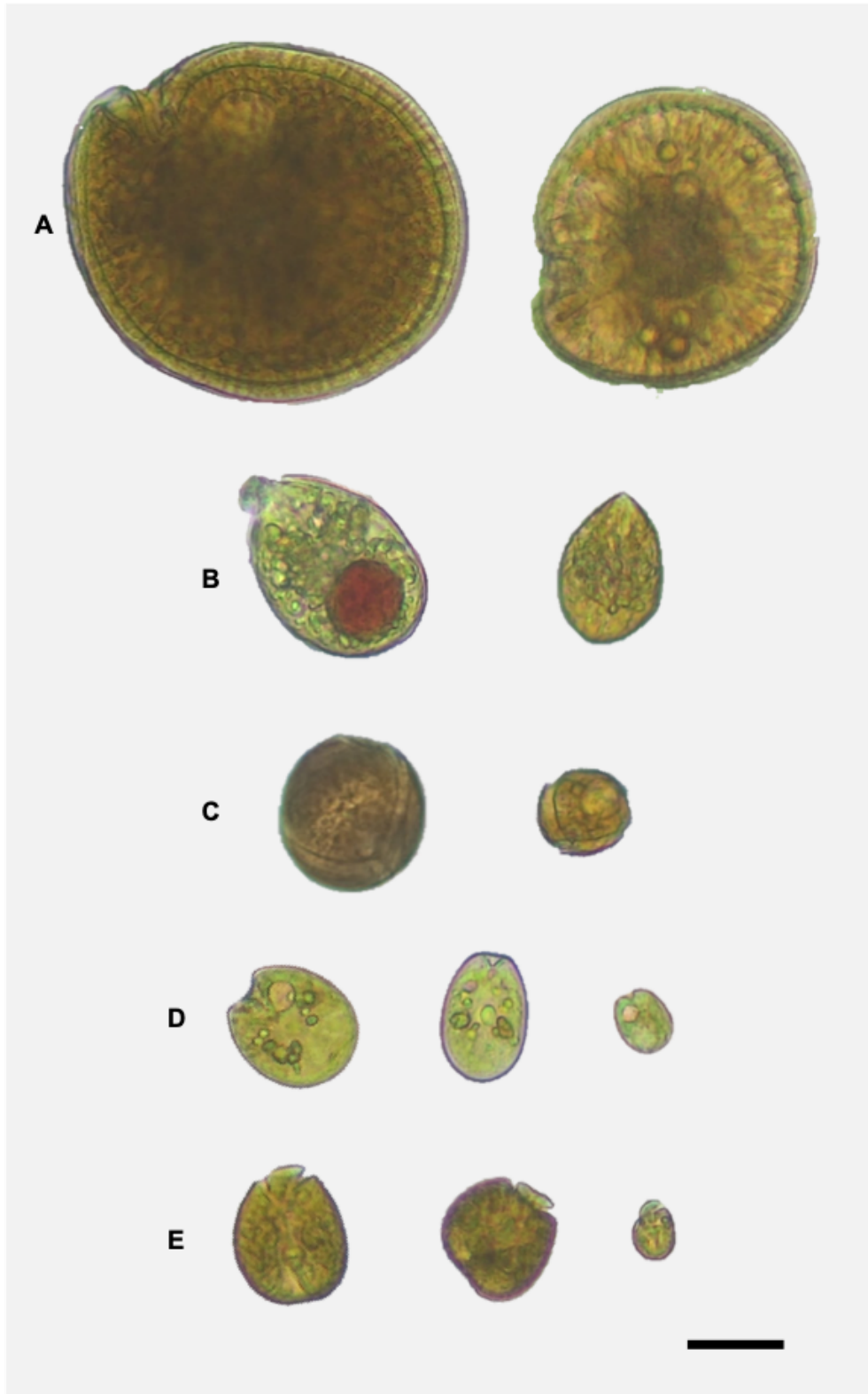


Figura 6. Diversidad de dinoflagelados BHAB observada en una muestra recogida en el norte de la isla de Gran Canaria en noviembre del 2022: *Gambierdiscus* spp. (A), *Ostreopsis* spp. (B), *Coolia* spp. (C), *Prorocentrum* spp. (D) y *Amphidinium* spp. (E). Microfotografías realizadas a una magnificación de 20X con un microscopio óptico invertido. Barra de escala: 20 μ m.

Aspectos relevantes sobre su ecología

Los dinoflagelados BHAB crecen en los fondos marinos de zonas costeras tropicales, subtropicales y templadas. Muchos estudios han documentado sus máximas concentraciones celulares durante las épocas más cálidas del año (p. ej. Aligizaki y Nikolaidis, 2006 o Selina *et al.*, 2014), lo que de manera general ha llevado a considerar la temperatura como uno de los factores clave que regulan su crecimiento (Durán-Riveroll *et al.*, 2019). Algunos autores como Granelli *et al.* (2011) o Tester *et al.* (2020) también han señalado el aumento de la temperatura del agua del mar que se está produciendo en los últimos años como consecuencia del cambio climático como una de las causas principales por las cuales muchas especies BHAB presentan tasas de crecimiento más elevadas en gran parte de su área de distribución geográfica actual, así como rangos de distribución más amplios.

En los hábitats bentónicos, los dinoflagelados BHAB desarrollan sus ciclos de vida (o parte de ellos) asociados a una gran diversidad de sustratos tanto bióticos como abióticos (GEOHAB, 2012). Sin embargo, la mayoría de especies muestran, por razones que aún no están del todo claras, una mayor preferencia por las macroalgas (Fraga *et al.*, 2012). Algunos géneros parecen ser más dependientes de estas (Nakahara *et al.*, 1996), mientras que otros no muestran una vinculación tan fuerte, pudiendo ser también observados a distancias considerables en la columna de agua (Mangialajo *et al.*, 2011). De acuerdo con Nakahara *et al.* (1996), las macroalgas proporcionarían a las células un refugio en el cual permanecer cuando las condiciones ambientales resultan inadecuadas. A pesar de que todos los dinoflagelados BHAB son fotoautótrofos, su aparato fotosintético ha demostrado estar adaptado a condiciones de luz más bajas en comparación con el de las especies planctónicas (Fraga *et al.*, 2012). En este sentido, la morfología tridimensional de las macroalgas permitiría a las células, por ejemplo, protegerse de los altos niveles de luz a los que se encuentran sometidos los hábitats bentónicos de zonas tropicales y templadas (Ballantine *et al.*, 1988; Villareal y Morton, 2002). Algunos estudios han señalado también el papel de la profundidad como un “factor” importante por medio del

cual algunas especies podrían regular la cantidad de luz que reciben (p. ej. Totti *et al.*, 2010). En relación a esto, Tester *et al.*, 2020 sugieren que, dado que algunas especies de *Gambierdiscus* son más tóxicas que otras, su distribución en profundidad podría afectar a la fuente de CTXs en las redes tróficas. A pesar de ello, la presencia y distribución de dinoflagelados BHAB en zonas profundas permanece siendo en gran medida desconocida.

Como otros organismos autótrofos, los dinoflagelados BHAB necesitan además incorporar nutrientes inorgánicos del medio para poder crecer (Fraga *et al.*, 2012). La teoría más aceptada es que estos están disponibles en los hábitats bentónicos de manera continua y, por tanto, no suponen un factor limitante para su crecimiento (Fraga *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2020). Aunque se ha hipotetizado sobre el origen de los nutrientes (remineralización del sedimento, ciertas especies de macroalgas, etc.), la fuente exacta sigue sin estar clara. Algunos estudios han investigado también la incorporación de materia orgánica mediante estrategias mixótrofas como la fagotrofia (p. ej. Almada *et al.*, 2017), un comportamiento ya observado en especies planctónicas (Flynn *et al.*, 2018). Sin embargo, esta forma de nutrición aún no ha sido demostrada en especies bentónicas. De manera similar, muchos autores como Anderson *et al.* (2002) han observado una conexión directa entre las proliferaciones de especies planctónicas y el aporte de nutrientes que provienen de la actividad humana (eutrofización), pero esta relación resulta ambigua en el caso de las especies bentónicas, ya que sus proliferaciones han sido documentadas tanto en ambientes eutrofizados (Skinner *et al.*, 2013) como en ambientes oligotróficos que no presentan afección humana (Pistocchi *et al.*, 2011). A pesar de ello, algunos autores como Burkholder *et al.*, (2008) sugieren que la eutrofización si podría facilitar de manera indirecta la proliferación de dinoflagelados BHAB al estimular el crecimiento de ciertas comunidades de macroalgas. En este sentido, cada vez hay más evidencias de que la degradación de los hábitats naturales donde viven los dinoflagelados BHAB como consecuencia de la actividad humana (urbanización de la costa, obras litorales que alteran la dinámica marina, etc.) es un factor que puede favorecer su proliferación. Por ejemplo, Catania (2017) observó como las comunidades de macroalgas de zonas poco afectadas por la actividad humana son más diversas y mantienen un equilibrio en las

poblaciones de dinoflagelados BHAB mientras que, por el contrario, las comunidades de zonas afectadas son menos diversas y más propensas a sustentar proliferaciones.

Otro factor que determina la concentración celular de los dinoflagelados en los hábitats bentónicos es el movimiento o turbulencia del agua (Richlen y Lobel, 2011). Para evitar ser dispersados en la columna de agua, las especies bentónicas presentan importantes adaptaciones fisiológicas, tales como células más pequeñas y aplanadas, que facilitan el movimiento entre los intersticios que forman las macroalgas y la adhesión a sus superficies (Hoppenrath *et al.*, 2014). A medida que los niveles de movimiento del agua aumentan, especialmente en zonas superficiales donde la influencia de las corrientes o el oleaje es mayor, las células se adhieren a sus sustratos a través de diferentes mecanismos (Nakahara *et al.*, 1996; Hoppenrath *et al.*, 2014). Algunas especies son capaces, por ejemplo, de producir enormes cantidades de matrices mucilaginosas de polisacáridos conocidas como “mucus” (Honsell *et al.*, 2013), donde las células permanecen agregadas y protegidas. Sin embargo, el papel de estas matrices parece ir más allá de la simple adherencia a los sustratos, pues estas podrían actuar confiriendo a las células protección ante niveles altos de irradiación lumínica (Heil *et al.*, 1993) o reteniendo sus toxinas, lo que facilitaría la prevalencia de la especie productora sobre otras microalgas competidoras (Ternon *et al.*, 2018) o disuadiría el ataque de posibles depredadores (Giussani *et al.*, 2015).

Métodos de muestreo

Junto con la identificación de especies, la cuantificación celular representa una rutina básica en cualquier programa de seguimiento o estudio ecológico de HABs (Hallegraeff *et al.*, 2004). Mientras que la identificación revela qué especies han de ser consideradas, la cuantificación de sus células permite conocer la dinámica de sus poblaciones y evaluar la magnitud del riesgo asociado a su crecimiento (Andersen y Throndsen, 2003). En los últimos años, el aumento por el interés de las especies bentónicas ha generado nuevos desafíos para los programas de

seguimiento y estudios ecológicos, pues la cuantificación de sus abundancias celulares requiere de estrategias y metodologías de muestreo diferentes a las empleadas con especies planctónicas (GEOHAB, 2012). En este sentido, la complejidad estructural que presentan los hábitats bentónicos, caracterizados por la presencia de una gran diversidad de sustratos a los que los dinoflagelados pueden estar asociados, junto con la manera tan irregular que estos tienen de distribuirse sobre el fondo (Taylor y Gustavson, 1986), ha representado un impedimento para la adopción definitiva de un método de muestreo estandarizado (GEOHAB, 2012). De acuerdo con algunos autores como Hoppenrath *et al.* (2014), esto ha supuesto una de las causas principales por las cuales, aún hoy en día, siguen existiendo grandes lagunas en el conocimiento de la ecología de estos organismos. Hasta ahora, el método más empleado para la cuantificación de dinoflagelados bentónicos ha consistido en la recogida de sustratos naturales, seguido del desprendimiento y cuantificación de las células asociadas. Sin embargo, tampoco existe un consenso entre investigadores sobre que sustrato emplear (Tester y Kibler, 2018). Los estudios han documentado el uso de una gran variedad, como macroalgas, fanerógamas marinas, rocas o corales, entre otros. De estos, las macroalgas han sido el sustrato más comúnmente muestreado, y su peso la forma de normalizar la concentración celular (cél g⁻¹). Por ejemplo, Catania (2017) realizó una revisión bibliográfica donde mostraba que, de los 159 artículos científicos publicados en revistas científicas indexadas sobre el género *Ostreopsis* entre 1973 y 2016, el 74 % recogieron muestras de macroalgas. La elección de este sustrato no ha sido arbitraria, sino que ha estado probablemente motivada por la naturaleza preferencialmente epifita que muestran los dinoflagelados BHAB. Así, las macroalgas proporcionan mayores cantidades de células en comparación con otros sustratos naturales, lo que facilita la cuantificación celular y la posterior realización de análisis estadísticamente robustos (Tester *et al.*, 2014). Sin embargo, cada especie presenta una relación superficie/peso única que influye de manera directa en su capacidad para hospedar células y, por tanto, en la estimación de la concentración celular de dinoflagelados BHAB. En este sentido, las especies que presentan una mayor superficie en relación a su peso proporcionan, en promedio, estimaciones de abundancia celular más altas. Lobel *et al.* (1988) fue el primero en identificar la existencia de esta dificultad. Con el

objetivo de permitir las comparaciones dentro de un mismo estudio o programa de seguimiento, la estrategia más habitual consiste en la selección de una o varias especies “estándar” de macroalga (p. ej. Xu *et al.*, 2014 o Vassalli *et al.*, 2018). Sin embargo, esta estrategia no siempre resulta adecuada, pues en general las macroalgas presentan distribuciones variables en el tiempo y en el espacio (Han y Liu, 2014) que pueden condicionar el diseño de los muestreos (Tester *et al.*, 2014).

De forma paralela, algunos autores han empleado también métodos alternativos al muestreo de sustratos naturales. Fundamentándose en la suposición de que los dinoflagelados bentónicos son capaces de colonizar nuevas superficies, Bomber y Aikman (1989) y Faust (2009) utilizaron respectivamente cepillos para tubos de ensayo y cuerdas de plástico deshilachadas suspendidas en la columna de agua durante un tiempo determinado para recoger células. Parsons *et al.* (2010) propusieron un método basado en el uso de un dispositivo, el “Dino-Vac”, que succiona las células sobre un área conocida. Abbate *et al.* (2012) emplearon un método similar, basado en el uso de una jeringuilla modificada para succionar un volumen de agua conocido sobre la superficie de macroalgas. Inspirada por el método propuesto por Faust (2009), Tester *et al.* (2014) empleó redes de fibra plástica de superficie conocida sumergidas durante 24 horas. Después, este método fue evaluado y adaptado por Jauzein *et al.*, (2016; 2018) para el muestreo de *Ostreopsis* y por Parsons *et al.* (2017; 2021) para el muestreo de *Gambierdiscus*. Parsons *et al.* (2017) también evaluaron tela de arpillería y baldosas de PVC como superficies artificiales alternativas. Por último, Mangialajo *et al.* (2017) desarrollaron un método basado en un dispositivo, el “BEDI”, para calcular el número de células de *Ostreopsis* por superficie de fondo marino. A pesar de que estos métodos han sido incorporados en algunos estudios ecológicos y programas de seguimiento, la recogida de sustratos naturales, y en particular de macroalgas, continúa siendo en la actualidad el método de referencia para el muestreo de dinoflagelados BHAB en todo el mundo.

Justificación y Objetivos

Las Islas Canarias constituyen un archipiélago situado frente al continente africano en el extremo centro-oriental del Océano Atlántico (27° - 29° N, 14° - 18° O) y englobado en la región biogeográfica de la Macaronesia junto con los archipiélagos de Cabo Verde, Madeira, Islas Salvajes, Azores y parte de la costa africana. De acuerdo con la teoría más aceptada, las islas emergieron directamente del fondo marino por medio de erupciones volcánicas a partir de un punto caliente, es decir, una zona en el manto terrestre donde el magma asciende atravesando la corteza oceánica. A medida que la placa tectónica se desplazaba sobre dicho punto, este proceso fue dando lugar a la aparición de las diferentes islas que forman el archipiélago a lo largo de aproximadamente 20 millones de años (Carracedo, 1979). En la actualidad, algunas islas han dejado de ser volcánicamente activas y están en declive, mientras que otras aún están experimentando actividad volcánica y continúan en proceso de formación. Como consecuencia, la morfología y composición costera del archipiélago es muy variable. Las islas occidentales, más jóvenes, presentan un litoral abrupto, rocoso y complejo. Las islas orientales, más antiguas y erosionadas, presentan litorales más homogéneos y arenosos. Además, en cada isla, la acción de factores ambientales como el viento, las corrientes marinas o el oleaje también influye en la morfología de su costa; las costas norte y oeste más expuestas a estos factores, mientras que las costas sur y este están más protegidas (Mitchell *et al.*, 2003). Por otro lado, la situación geográfica del archipiélago conlleva que este se encuentre bajo la influencia de diferentes fenómenos climatológicos y oceanográficos como son la Corriente Fría de Canarias, los vientos alisios y el afloramiento de aguas profundas o *upwelling* de la costa africana. La combinación de estos fenómenos genera también un gradiente longitudinal de condiciones físico-químicas en sus aguas. Las islas occidentales presentan aguas oligotróficas, más cálidas y más salinas que corresponden a su latitud, mientras que las islas orientales presentan aguas eutróficas, más frías y menos salinas que llegan en forma de filamentos procedentes del afloramiento de aguas profundas que tiene lugar junto al continente y, en menor medida, a través de la Corriente Fría de Canarias (Valdés y Déniz-González, 2015). Como resultado de sus características geológicas, climatológicas y oceanográficas, el archipiélago

presenta una gran diversidad de hábitats bentónicos, que se distribuyen a lo largo de 1 500 km de costa albergando comunidades de macroalgas que varían significativamente en su composición y abundancia, incluso entre localidades de una misma isla (Prud'homme van Reine y Hoek, 1990). En este contexto, la selección de una o varias especies preferenciales de macroalga para el estudio y seguimiento de dinoflagelados BHAB no parece representar una estrategia de muestreo adecuada para la comparación de resultados obtenidos en diferentes escalas espacio-temporales de este archipiélago, lo que hace necesario la búsqueda de métodos de muestreo alternativos.

Como ocurre en la mayoría de estudios y programas de seguimiento de todo el mundo, el muestreo de dinoflagelados BHAB en las islas Canarias se ha limitado a hábitats situados en los primeros metros de la franja infralitoral (0 – 5 m). Por consiguiente, existe un desconocimiento casi total sobre la relevancia que podrían tener hábitats más profundos para albergar ciertas poblaciones de dinoflagelados BHAB. En relación a esto, Tester *et al.*, (2020) señalaron, por ejemplo, que las condiciones presentes en profundidades mayores de las comúnmente muestreadas podrían ser más adecuadas para satisfacer los requerimientos ecofisiológicos de las especies más tóxicas del género *Gambierdiscus*, lo que requeriría una reevaluación de las estrategias de muestreo. En las Islas Canarias, el papel de la profundidad podría ser especialmente relevante pues, debido a su historia geológica, las islas más jóvenes presentan una plataforma insular generalmente estrecha, lo que hace posible alcanzar grandes profundidades a pocos metros de la costa.

En general, los estudios llevados a cabo en el archipiélago canario se han centrado en el género *Gambierdiscus* por ser el principal responsable de los casos de CP acaecidos en la región desde el año 2004, lo que ha generado un amplio conocimiento en relación a su diversidad, distribución y toxicidad (referencias en Tudó *et al.*, 2020). Durante estos años, algunos de estos estudios han documentado también la presencia, amplia distribución y, en algunos casos, capacidad para proliferar de otros géneros BHAB, es decir, *Coolia*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*. A pesar de que en las Islas Canarias aún no se han registrado impactos asociados a estos géneros, su capacidad para afectar

los ecosistemas y la salud humana ya ha sido constatada en otras partes del mundo y bajo condiciones experimentales de laboratorio (Lassus *et al.*, 2015). Además, algunos autores como Tindall y Morton (1998) sugieren que las toxinas que producen también podrían contribuir en la complejidad y variabilidad de síntomas desarrollados por personas afectadas por la CP, pese a lo cual dichas toxinas aún no han sido observadas en animales positivos en CTX (Tester y Kibler, 2018). La presencia de estos géneros supone, por tanto, un riesgo potencial emergente en las Islas Canarias. Sin embargo, en algunos casos, la diversidad de especies que presentan estos géneros aún no se conoce completamente. Dado que la toxicidad entre especies de un mismo género puede variar significativamente (Tibiriçá *et al.*, 2020), esto ha impedido por el momento una evaluación realista de dicho riesgo.

Todo esto justifica el desarrollo de la presente tesis doctoral, cuyo objetivo principal ha sido ampliar el conocimiento en relación a los dinoflagelados BHAB presentes en el archipiélago canario para mejorar el diseño de estrategias que permitan seguimiento. Los estudios realizados en este trabajo se han desarrollado en el Observatorio Canario de Algas Nocivas (OCHAB) y en el marco de trabajo de los proyectos MIMAR y MIMAR +, por lo que esta tesis constituye un resultado de los mismos.

Para alcanzar el objetivo principal propuesto, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la aplicabilidad de un método de muestreo estandarizado, basado en sustratos artificiales, para la obtención de estimaciones de concentración celular precisas que permitan la comparación realista de resultados entre diferentes escalas espacio-temporales de la región. Además, analizar la relación existente entre las concentraciones celulares obtenidas en sustratos artificiales y las presentes en macrófitos (**capítulo 2**).
- Evaluar la existencia de patrones de distribución con la profundidad para cada género, así como su consistencia en el tiempo. Además, evaluar la

influencia de ciertos parámetros ambientales relacionados con la profundidad en determinar dichos patrones. Por último, dada su relevancia en la región, estudiar la distribución con la profundidad de las especies del género *Gambierdiscus* (**capítulo 3**).

- Conocer la diversidad y distribución del género *Coolia* en el archipiélago canario mediante el empleo de técnicas microscópicas y moleculares (**capítulo 4**).

Bibliografía

Abbate, M., Bordone, A., Cerrati, G., Di Festa, T., Melchiorre, N., Pastorelli, A. M., Peirano, A., Petruzzelli, M. R., Ungaro, N., 2012. A new method for sampling potentially toxic benthic dinoflagellates. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 165 - 170.

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.

Ald, S., Leng, M. J., Hald, M., 2012. Dinoflagellate cysts as indicators of climatic and oceanographic changes during the Late Pleistocene in the high-latitude North Atlantic (ODP Hole 980). *Marine Micropaleontology*, 90-91, 1-16.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea. Greece. *Harmful Algae*, 5(6), 717–730.

Almada, E. V. C., Carvalho, W. F. D., Nascimento, S. M., 2017. Investigation of phagotrophy in natural assemblages of the benthic dinoflagellates *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 65, 392 - 399.

Andersen, P., Throndsen, J., 2003. Estimating cell numbers. *Manual on harmful marine microalgae*, 4, 99-129.

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.

Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M., 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual review of marine science*, 4, 143-176.

Arístegui, J., González-Ramos, A. J., Benavides, M., 2017. Informe sobre la presencia de *Trichodesmium* spp. en aguas de Canarias, en el verano de 2017. Consejería de Sanidad, Gobierno de Canarias, Universidad de Las Palmas (ULPGC).

Ballantine, D. L., Tosteson, T. R., Bardales, A. T., 1988. Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 119(3), 201-212.

- Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Hoagland, P., Enevoldsen, H., 2015. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 96 (1), 61 - 91.
- Bomber, J.W., Aikman, K.E., 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6, 291 - 311.
- Bravo, I., Figueroa, R. I., 2014. Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms*, 2(1), 11-32.
- Burkholder, J. M., Glibert, P. M., Skelton, H. M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful algae*, 8(1), 77 - 93.
- Buskey, E. J., 1997. Behavioral components of feeding selectivity of the heterotrophic dinoflagellate *Protoperdinium pellucidum*. *Marine Ecology Progress Series*, 153, 77-89.
- Bütschli, O., 1885. Erster Band. Protozoa. Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs, Winter'sche Verlagshandlung, Leipzig.
- Carracedo, J. C., 1979. Paleomagnetismo e historia volcánica de Tenerife. Cabildo de Tenerife.
- Carty, S., 2014. *Freshwater Dinoflagellates of North America*. Cornell University Press.
- Catania, D., 2017. The Influence of Macroalgae on the Proliferation and Regulation of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* Blooms. HAL Id: tel-01682210. Universit. Cote d'Azur - cole Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliqués Unit.
- Cembella, A. D., 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, 42(4), 420 - 447.
- Chinain, M., Gatti, C. M. I., Darius, H. T., Quod, J. P., Tester, P. A., 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae*, 102, 101873.
- Dale, B., 1996. Dinoflagellate cyst ecology: modelling and geological applications. *Marine Micropaleontology*, 27(3-4), 197-218.
- Dirección General de Salud Pública del Gobierno de Canarias (2023). Summary of records from SVEICC (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Intoxicación por Ciguatera en Canarias). Periodo 2008–2012.

Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., Okolodkov, Y. B., 2019. A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America. *Frontiers in Marine Science*, 6, 148.

Espino, F., Tuya, F., Brito, A., Haroun, R., 2011. Variabilidad espacial en la estructura de la ictiofauna asociada a praderas de *Cymodocea nodosa* en las Islas Canarias, Atlántico nororiental subtropical. *Revista de biología marina y oceanografía*, 46(3), 391 - 403.

Faust, M.A., 2009. Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef mangrove ecosystem, Belize. *Atoll Res. Bull.* 1 - 32.

Fensome, R. A., Saldarriaga, J. F., Taylor, F. J. R., Norris, G., 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology*, 39(Suppl. 1), 1-702.

Fernández, A, Sierra, E., Arbelo, M., Gago-Martínez A., Leao Martins, J.M., García-Álvarez, N., Bernaldo de Quiros, Y., Arregui, M., Vela, A.I., Díaz-Delgado, J., 2022. First Case of Brevetoxicosis Linked to Rough-Toothed Dolphin (*Steno bredanensis*) Mass-Mortality Event in Eastern Central Atlantic Ocean: A Climate Change Effect? *Front. Mar. Sci.* 9:834051. doi: 10.3389/fmars.2022.834051

Flynn, K. J., Mitra, A., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., 2018. Mixotrophy in harmful algal blooms: by whom, on whom, when, why, and what next. In *Global ecology and oceanography of harmful algal blooms* (pp. 113. - 132). Springer, Cham.

Fraga, S., Riobó, P., Diogène, J., Paz, B., Franco, J. M., 2004. Toxic and potentially toxic benthic dinoflagellates observed in Macaronesia (NE Atlantic Archipelago). 11th International Conference on Harmful Algae, Capetown, South Africa, pp. 115.

Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., Zapata, M., 2008. *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of phycology*, 44(4), 1060 - 1070.

Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., Marañón, E., 2012. Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 171-179.

Fraga, S., 2014. Caracterización taxonómica y ecología de especies crípticas o pseudocrípticas de dinoflagelados nocivos (Tesis Doctoral, Universidade de Vigo).

Fukuda, Y., Suzaki, T., 2015. Unusual features of dinokaryon, the enigmatic nucleus of dinoflagellates. In *Marine Protists* (pp. 23 - 45). Springer, Tokyo.

García Rojas, A. P., 2011. Evaluación ambiental de aguas costeras y puertos deportivos a partir de la comunidad fitoplanctónica en las Islas Canarias, España (Tesis doctoral)

GEOHAB, 2012. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark.

Giussani, V., Sbrana, F., Asnaghi, V., Vassalli, M., Faimali, M., Casabianca, S., Penna, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Mazzeo, A., Chiantore, M., 2015. Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. Harmful Algae 44, 46 - 53.

Gómez, F., Moreira, D., López-García, P., 2011. Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. Hidrobiológica, 21(3), 343 - 364.

Gómez, F., 2012. A checklist and classification of living dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). CICIMAR Oceánides, 20(2), 1-76.

Gómez, F., 2012. A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). Systematics and Biodiversity, 10(3), 267-275.

Graneli, E., Vidyarthna, N. K., Funari, E., Cumaranatunga, P. R. T., Scenati, R., 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? Harmful algae, 10(2), 165-172.

Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? Journal of phycology, 48(5), 1057-1063.

Hallegraeff G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32:79 - 99

Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., eds. 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO Monogr. Oceanogr. Methodol. 11. Paris: UNESCO. 792 pp.

Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Belin, C., Bottein, M. Y. D., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C. H., Sunesen, I., Pitcher G. C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P., Trainer, V. L., Yñiguez, A. L., Zingone, A., 2021. Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. Communications Earth & Environment, 2(1), 1 - 10.

Han, Q., Liu, D., 2014. Temporal and spatial variations in the distribution of macroalgal communities along the Yantai coast, China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 32(3), 595 - 607.

Heil, C. A., Maranda, L., Shimizu, Y., 1993. Mucus-associated dinoflagellates: Large scale culturing and estimation of growth rate, p. 501-506. In: T.J. Smayda and H. Shimizu (eds), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier.

Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS One* 8:e57291.

Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates-unveiling their worldwide biodiversity. *Schweizerbart Science Publishers*. 276 pp.

Hoppenrath, M., 2017. Dinoflagellate taxonomy—a review and proposal of a revised classification. *Marine Biodiversity*, 47(2), 381-403.

Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis cf. ovata* using artificial substrates: optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 300 - 304.

Jauzein, C., Araf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., Abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116 - 127.

Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Kim, J. S., Seong, K. A., Kang, N. S., Kim, T. H., 2010. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean science journal*, 45, 65-91.

Keeling, P. J., 2004. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American journal of botany*, 91(10), 1481-1493.

Koenigswald, W. V., Braun, A., Pfeiffer, T., 2004. Cyanobacteria and seasonal death: a new taphonomic model for the Eocene Messel lake. *Paläontologische Zeitschrift*, 78, 417-424.

Krishnan, A. A., Krishnakumar, P. K., Rajagopalan, M., 2007. *Trichodesmium erythraeum* (Ehrenberg) bloom along the southwest coast of India (Arabian Sea) and its impact on trace metal concentrations in seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 71(3-4), 641-646.

Lassus, P., Chaumérat, N., Hess, P., Nézan, E., 2015. Toxic and harmful microalgae of the World Ocean. International Society for the Study of Harmful Algae and the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation.

Litaker, R. W., Tester, P. A., 2002. Molecular methods for detecting and characterizing harmful phytoplankton. *Manual of Environmental Microbiology* (2nd ed.). ASM Press, Washington, DC, 342-353.

Lobel, P. S., Anderson, D. M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of ciguatera dinoflagellate populations: sample variability and algal substrate selection. *Biol. Bull.* 175 (1), 94.

Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., Bill, B. D., Connell, L. B., Léger, C., Trainer, V. L., 2012. Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. 1. *Journal of Phycology*, 48(2), 436 - 454.

Nakahara, H., Sakami, T., Chinain, M., Ishida, Y., 1996. The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 44, 113 - 117.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A. M., Sala, M. M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, 408 - 420.

Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemée, R., 2017. Benthic dinoflagellate integrator (BEDI): a new method for the quantification of benthic harmful algal blooms. *Harmful Algae* 64, 1 - 10.

Mann, D. G., Evans, K. M., 2008. The species concept and cryptic diversity. In *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae* (pp. 262 - 268). Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Markham, C., 2017. *The Voyages of Pedro Fernandez de Quiros, 1595 to 1606: Volumes I-II*. Taylor & Francis.

Martín-García, L., Herrera, R., Moro-Abad, L., Sangil, C., Barquín-Diez, J., 2014. Predicting the potential habitat of the harmful cyanobacteria *Lyngbya majuscula* in the Canary Islands (Spain). *Harmful Algae*, 34, 76-86.

Mitchell, N. C., Dade, W. B., Masson, D. G., 2003. Erosion of submarine flanks of the Canary Islands. *J Geophys Res* 108:1–11

Morton, S.L., M.A. Faust, 1997. Survey of toxic epi-phytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bull. Mar. Sci.* 61: 899-906.

Ndhlovu, A., Dhar, N., Garg, N., Xuma, T., Pitcher, G. C., Sym, S. D., & Durand, P. M., 2017. A red tide forming dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*: identification, phylogeny and impacts on St Helena Bay, South Africa. *Phycologia*, 56(6), 649-665.

Ojeda, A., 1985. Especies fitoplanctónicas identificadas en aguas litorales de las Islas Canarias orientales. *Simp. Int. Afl. O. Afr., Inst. Inv. Pesq*, 403 - 415.

Ojeda, A., 1996. Biomasa fitoplanctónica y clorofila a en las Islas Canarias Occidentales. Mayo 1986. *Oceanografía y recursos marinos en el Atlántico Centro-Oriental*. Gobierno de Canarias, Cabildo de Gran Canaria, 91 - 121.

Ojeda, A., 1998. *Dinoflagelados de Canarias: estudio taxonómico y ecológico* (Tesis doctoral, Universidad de las Palmas de Gran Canaria).

Ojeda, A., 1999. Contribution to the knowledge on dinoflagellates (Dinophyceae) of the order Dinophysales in the Canary Islands waters. *Bol. Mus. Mun. Funchal*, 51 (296): 53 - 84

Ojeda, A., Soler-Onís, 2013. El género *Karenia* Hansen y Moestrup (Dinophyta) en aguas neríticas y oceánicas del archipiélago canario. XIX Congreso de Botánica Criptogámica, Las Palmas de Gran Canaria.

Parsons, M. L., Brandt, A. L., Ellsworth, A., Leynse, A. K., Rains, L. K., Anderson, D. M., 2017. Assessing the use of artificial substrates to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys. *Harmful Algae*, 68, 52 - 66.

Parsons, M. L., Richlen, M. L., Smith, T. B., Solow, A. R., Anderson, D. M., 2021. Evaluation of 24-h screen deployments as a standardized platform to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys and US Virgin Islands. *Harmful algae*, 103, 101998.

Pérez-Arellano, J. L., Luzardo, O. P., Brito, A. P., Cabrera, M. H., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R. W., Boada, L. D., 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1981.

Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon*, 57(3), 421 - 428.

Prud`homme, W.F., Hoek, C. van den. 1990. Biogeography of Macaronesian seaweeds. *Courier Forsh.-Inst. Senckenberg* 129: 55-73.

Richlen, M.L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston atoll, Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 51 - 66.

Schnepf, E., Elbrächter, M., 1992. Nutritional strategies in dinoflagellates: a review with emphasis on cell biological aspects. *European journal of protistology*, 28(1), 3 - 24.

Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae* 32, 1 - 10.

Skinner, M. P., Lewis, R. J., Morton, S., 2013. Ecology of the ciguatera causing dinoflagellates from the Northern Great Barrier Reef: Changes in community distribution and coastal eutrophication. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 210 - 219.

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algae News*, 55, 14 - 17.

Spector, D. L., 1984. Dinoflagellates: an introduction. *Dinoflagellates*, 1-15.

Stentiford, G. D., Shields, J. D., 2005. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 47-70.

Taylor, F. J. R., 1987. *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs 21, 1 – 785

Taylor, F. J. R., Gustavson, M. S., 1986. An underwater survey of the organism chiefly responsible for "ciguatera" fish poisoning in the eastern Caribbean region: the benthic dinoflagellate

Gambierdiscus toxicus. In: Proceedings of 7th International Diving Science Symposium, [Eds.] A. Stefanon, N.J. Flemming, Padova University, Padova, Italy, pp. 95 - 111.

Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., Saldarriaga, J. F., 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and conservation*, 17, 407-418.

Ternon, E., Pavoux, A.-S., Marro, S., Thomas, O. P., and Lemée, R., 2018. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom. *Harmful Algae* 75, 35 - 44.

Tester, P. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandersea, M. W., Leaw, C. P., Teen, L. P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M. A., Litaker, R. W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8 - 25.

Tester, P. A., Kibler, S. R., 2018. Benthic dinoflagellate sampling. In: Steidinger, KA, Meave del Castillo, ME (Eds.), *Guide to the Identification of Harmful Microalgae in the Gulf of Mexico*, 1, 433 - 500.

Tester, P.A., Litaker, R.W., Berdalet, E., 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* 91, 101655.

Tindall, D. R., Morton, S. L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. *Nato ASI Series G Ecological Sciences*, 41, 293-314.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with mimitar

Ramos, A. G., Martel, A., Codd, G. A., Soler, E., Coca, J., Redondo, A., Morrison, L. F., Metcalf, J. S., Ojeda, A. Suarez, S., Petit, M., 2005. Bloom of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the Northwest African Upwelling. *Marine Ecology Progress Series*, 301, 303 - 305.

Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S., 2011. Guía Para el Diseño y Puesta en Marcha de un Plan de Seguimiento de Microalgas Productoras de Toxinas. *Manuales y Guías del COI*, 59.

Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R. I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae*, 67, 131 - 143.

Saburova, M., Al-Yamani, F., Polikarpov, I., 2009. Biodiversity of free-living flagellates in Kuwait's intertidal sediments. *BioRisk*, 3, 97-110.

Yasumoto, T., Nakayima, I., Bagnis, R., Adachi, R., 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *日本水産学会誌*, 43(8), 1021-1026.

van Oppen, M. J., 2007. Perspective: hidden diversity in coral endosymbionts unveiled. *Molecular Ecology*, 16, 1125 - 1126

Verma, A., Hoppenrath, M., Dorantes-Aranda, J. J., Harwood, D. T., Murray, S. A., 2016. Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon. *Harmful algae*, 60, 116-130.

Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lem´ee, R., Hachani, M.A., Souad, T.S., Aaf, L., Abboud-Abi, S.M., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 85, 1092–1100.

Villareal, T. A., Morton, S. L., 2002. Use of Cell-Specific PAM-Fluorometry to Characterize Host Shading in the Epiphytic Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Marine Ecology* 23 (2): 127 - 140.

Wells, M. L., Karlson, B., Wulff, A., Kudela, R., Trick, C., Asnaghi, V., Berdalet, E., Cochlan, W., Davidson, K., De Rijcke, M., Dutkiewicz, S., Hallegraeff, G., Flynn, K. J., Legrand, C., Paerl, H., Silke, J., Suikkanen, S., Thompson, P., Trainer, V. L., 2020. Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful algae*, 91, 101632.

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.

CAPÍTULO

2

EVALUACIÓN DE LA FIABILIDAD DEL "MÉTODO DE SUSTRATO ARTIFICIAL" PARA EL MUESTREO DE DINOFLAGELADOS BIVALENTES EN LA REGIÓN MACARONÉSICA



Ilustración realizada por Schmidt (1901) para la descripción de *Ostreopsis siamensis*

[El capítulo 2 ha sido publicado como: Fernández-Zabala, J., Tuya, F., Amorim, A., Soler-Onís, E., 2019. Benthic dinoflagellates: Testing the reliability of the artificial substrate method in the Macaronesian region. *Harmful Algae*, 87, 101634. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101634>]

Resumen del capítulo

La recolección de macroalgas es el método más común para la cuantificación y estimación de la concentración celular de dinoflagelados BHAB. Sin embargo, este método presenta importantes desventajas; principalmente dificulta la normalización de los resultados de abundancia celular para su posterior comparación. En el presente capítulo, se evaluó la fiabilidad de un método alternativo, un “sustrato artificial” basado en redes de fibra de plástica de superficie estandarizada, para la estimación de la concentración celular de cuatro géneros de dinoflagelados BHAB (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia* y *Prorocentrum*) en relación con las estimaciones realizadas a partir de macroalgas. El muestreo se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de movimiento del agua ($m.s^{-2}$) en una variedad de hábitats costeros situados en los 7 primeros metros de la franja infralitoral en dos archipiélagos de la región macaronésica: las Islas Canarias y Cabo Verde. Un tiempo de inmersión de 24 h fue suficiente para estimar de manera adecuada la abundancia celular de las poblaciones de dinoflagelados BHAB. Se establecieron 7 unidades de sustrato artificial como el nivel óptimo de replicación. En la mayoría de los casos, la concentración celular de los cuatro géneros demostró ser menos variable entre réplicas de sustrato artificial que entre réplicas de macroalga, lo que llevó a obtener estimaciones de abundancia celular más fiables en los primeros y, por tanto, más apropiadas para su comparación. La concentración celular media obtenida para *Ostreopsis* y *Coolia* en sustratos artificiales mostró un bajo nivel de correspondencia con la obtenida en macroalgas. Teniendo en cuenta la naturaleza potencialmente nociva de estos géneros, la transformación de abundancias celulares expresadas como células g^{-1} de macrófito a células cm^{-2} de sustrato artificial puede ser arriesgada. Los resultados de este estudio respaldan el uso de sustratos artificiales en los estudios ecológicos y programas de seguimiento de dinoflagelados BHAB en las Islas Canarias a la vez que señalan los riesgos que supone el uso de macroalgas.

1. Introducción

Las proliferaciones de algas bentónicas potencialmente nocivas (BHABs) representan un riesgo importante para la salud pública y el medio ambiente (Durán-Riveroll *et al.*, 2019). En particular, algunas especies de dinoflagelados de los géneros *Gambierdiscus* Adachi y Fukuyo, *Ostreopsis* Schmidt, *Coolia* Meunier y *Prorocentrum* Ehrenberg pueden producir potentes biotoxinas que afectan al ser humano (Lassus *et al.*, 2016). En la última década, los BHABs se han convertido en una gran preocupación debido a su expansión desde zonas tropicales que se consideraban su área de distribución endémica hacia zonas más templadas del planeta. Este hecho ha provocado un incremento del interés en la comunidad científica y la administración pública por el estudio y seguimiento de estos eventos (GEOHAB, 2012).

Una de las principales limitaciones para entender la ecología de los dinoflagelados BHAB ha sido la falta de un método de muestreo estandarizado para una estimación precisa de sus concentraciones celulares (Hoppenrath *et al.*, 2014; Tester *et al.*, 2014). La complejidad estructural que presentan los hábitats bentónicos, a menudo formados por diferentes sustratos tales como macroalgas, fanerógamas marinas, arena, rocas o corales, ha complicado el diseño de estrategias para llevar a cabo muestreos cuantitativos fiables durante programas de seguimiento y estudios ecológicos de dinoflagelados BHAB (Yasumoto *et al.*, 1980; GEOHAB, 2012; Yong *et al.*, 2018). Esto es crucial para establecer niveles o umbrales de concentración celular que permitan una correcta evaluación y determinación de los riesgos asociados a las proliferaciones de estos organismos (Vassalli *et al.*, 2018).

El método de muestreo más común consiste en la recogida de macroalgas (GEOHAB, 2012; Catania, 2017), a partir de las cuales la comunidad de dinoflagelados epífitos se separa para su enumeración bajo el microscopio. Después, los resultados se expresan como células g⁻¹ de peso húmedo o peso seco de macroalga (Reguera *et al.*, 2011). La elección de las macroalgas como sustrato preferencial no ha sido arbitraria; la mayoría de las especies tóxicas desarrollan sus ciclos de vida (o parte de ellos) asociadas a sus frondes (Fraga

et al., 2012; Hoppenrath *et al.*, 2014). Además, desde un punto de vista práctico este método resulta conveniente por su relativa sencillez; a menudo distintas especies de macroalga son comunes en lugares accesibles situados en los primeros metros de la franja infralitoral, lo que hace de su búsqueda y recolección una tarea relativamente sencilla sin necesidad de usar equipamiento específico (p. ej. equipo de buceo autónomo). En general, los investigadores recolectan múltiples especies en el mismo sitio de muestreo (Lobel *et al.*, 1988). Sin embargo, esta estrategia conlleva algunas desventajas importantes (Tester *et al.*, 2014). Las distintas especies presentan diferencias en su superficie, morfología y producción de metabolitos secundarios que podrían influir en las preferencias de los dinoflagelados para su colonización (Lobel *et al.*, 1988; Parsons *et al.*, 2011; Rains y Parsons, 2015). Si bien estas preferencias no se comprenden aún completamente (Selina *et al.*, 2014), en general las especies que presentan una alta superficie en relación a su peso se consideran hospedadores idóneos, ya que tienen la capacidad de albergar altas densidades celulares de dinoflagelados epífitos (Lobel *et al.*, 1988; Bomber y Aikman, 1989; Tester *et al.*, 2014). La existencia de diferencias en la relación superficie/peso entre distintas especies de macroalgas afecta de manera directa la capacidad que estas tienen para hospedar células de dinoflagelados bentónicos y, por tanto, a su concentración celular. El problema de usar diferentes especies es que las comparaciones de abundancia celular pueden no ser realistas (Lobel *et al.*, 1988; Richlen y Lobel, 2011). Por ello, algunos autores consideran la selección de una sola especie como una estrategia más adecuada para evitar errores (Lobel *et al.*, 1988). Sin embargo, el muestreo intensivo de una única especie no siempre es posible debido a la variabilidad espacial y temporal (fenología) que las macroalgas presentan en su distribución (Tuya y Haroun, 2006; Tester *et al.*, 2014; Mehdipour *et al.*, 2015).

Con el objetivo de evitar los problemas derivados del uso de las macroalgas, en los últimos años se han propuesto métodos alternativos, algunos de ellos basados en “sustratos artificiales” (Bomber y Aikman, 1989; Faust, 2009; Parsons *et al.*, 2010; Abbate *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2014; Jauzein *et al.*, 2016; Mangialajo *et al.*, 2017; Parsons *et al.*, 2017). Los sustratos artificiales se fundamentan en la suposición de que los dinoflagelados bentónicos son capaces

de colonizar nuevas superficies tras un período específico de tiempo, a partir del cual sus abundancias celulares alcanzarían un equilibrio con las abundancias celulares presentes en los sustratos naturales cercanos (Nakahara *et al.*, 1996; Tester *et al.*, 2014). La principal ventaja de estos métodos es que las abundancias celulares pueden ser normalizadas de forma sencilla a una superficie conocida, permitiendo así establecer una unidad de medida estándar (p. ej. células cm⁻²) para una comparación más realista de las estimaciones obtenidas en diferentes escalas espacio-temporales. Entre los sustratos artificiales propuestos, las redes de fibra plástica empleadas por Tester *et al.* (2014) han demostrado ser un método adecuado para la estimación estandarizada de la concentración celular de diferentes géneros BHAB (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*) en una variedad de hábitats marinos del Mar Caribe y el Océano Indo-Pacífico. En ellos, este estudio abordó varias cuestiones tales como el tiempo de colonización, el área de la superficie de las redes, el tamaño muestral o el nivel de correspondencia entre las abundancias celulares obtenidas en macroalgas y sustratos artificiales.

Basándose en el método propuesto por Tester *et al.* (2014), Jauzein *et al.* (2016 y 2018) investigaron su aplicabilidad para el muestreo de *Ostreopsis cf. ovata* durante sus proliferaciones en el Mar Mediterráneo. Parsons *et al.* (2017, 2021) por su parte investigaron su aplicabilidad para el muestreo de *Gambierdiscus* spp. en el mar Caribe y el Golfo de México. Para ello, estos estudios evaluaron cuestiones tales como el diseño original propuesto por Tester *et al.* (2014), el tamaño de la luz de malla de las redes en relación a la eficiencia de las redes para albergar células, el tiempo de colonización o el nivel de correspondencia entre las abundancias celulares obtenidas en macroalgas y sustratos artificiales.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que las abundancias celulares de dinoflagelados BHAB se pueden estimar de manera precisa utilizando menos de nueve réplicas de sustrato artificial durante un tiempo de 24 horas. Estos estudios también han mostrado que el número de células de dinoflagelados que colonizan los sustratos artificiales y las macroalgas cercanas a partir de las cuales se produce la colonización presentan, en muchos casos, una buena correlación, es decir, sin diferencias significativas en la variabilidad

de las estimaciones de concentración celular. A pesar de que la repercusión de los resultados obtenidos en dichos estudios es aún limitada, estos suponen los primeros pasos hacia la obtención de un método estandarizado para el muestreo de dinoflagelados BHAB como herramienta fundamental en los estudios ecológicos y programas de seguimiento “basados en células” en todo el mundo (Tester *et al.*, 2014). Sin embargo, resulta completamente necesario realizar nuevos estudios en diferentes regiones afectadas por estos eventos que permitan seguir calibrando la eficacia de este método en diferentes hábitats y condiciones ambientales.

En los archipiélagos de la región macaronésica se han registrado varios casos de intoxicación por Ciguatera (CP) desde el año 2004 (Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Otero *et al.*, 2010 y registros en periódicos locales), un síndrome humano causado por la ingesta de peces y otros animales marinos que han bioacumulado toxinas producidas por dinoflagelados de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* que hasta entonces había permanecido limitado a zonas tropicales del planeta (Chinain *et al.*, 2021). En el año 2016, se documentó en las Islas Canarias la primera proliferación de este género (Soler-Onís *et al.*, 2016), reforzando la idea de que los casos de CP registrados en la región durante las últimas dos décadas tienen su origen en peces que han ingerido toxinas en aguas locales y no en peces procedentes de zonas afectadas alejadas. Desde entonces, los estudios ecológicos sobre *Gambierdiscus* en las Islas Canarias se han basado en la recogida de macroalgas durante muestreos oportunistas y expediciones de muestreo cortas, a partir de las cuales se han cuantificado, aislado y cultivado células en condiciones de laboratorio, lo que ha permitido empezar a conocer su diversidad, distribución y toxicidad (Fraga *et al.*, 2011; Fraga y Rodríguez, 2014; Rodríguez *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2019, 2020; Tudó *et al.*, 2020). En otros archipiélagos dentro de esta región, la presencia de *Gambierdiscus* spp. también se ha documentado (Kaufmann y Böhm-Beck, 2013; Soler-Onís *et al.*, 2019; Hoppenrath *et al.*, 2019), pero el conocimiento sobre su diversidad y distribución es aún limitado.

Con respecto a otros géneros BHAB (*Ostreopsis*, *Coolia* o *Prorocentrum*), que ya se han observado formando densas proliferaciones en diferentes

localizaciones de la región (Soler-Onís *et al.*, trabajo en progreso), el conocimiento es aún menor. Solo existen unos pocos registros y estudios de la presencia y taxonomía de algunas especies (Fraga *et al.*, 2008; Penna *et al.*, 2010; Kaufmann y Böhm-Beck, 2013; Rodríguez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018; David *et al.*, 2020), mientras que la diversidad, distribución y toxicidad de los géneros están sólo empezando a ser conocidas en los últimos años. Así, las proliferaciones producidas por dinoflagelados BHAB en las Islas Canarias y el resto de la región macaronésica suponen un riesgo emergente que plantea serias preocupaciones para la salud pública y la conservación medioambiental, lo que justifica el desarrollo de programas de seguimiento estandarizados y eficientes.

Por todo ello, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la aplicabilidad y eficacia del método de “sustrato artificial” desarrollado por Tester *et al.* (2014), para llevar a cabo una cuantificación y estimación precisa de las concentraciones celulares de dinoflagelados BHAB en la región macaronésica, permitiendo al mismo tiempo una comparación realista de los resultados obtenidos en diferentes escalas espacio-temporales. Para ello, se diseñaron varios experimentos en diferentes localizaciones de las Islas Canarias y Cabo Verde con los objetivos específicos de (1) determinar el número óptimo de réplicas, (2) determinar su tiempo ideal de colonización, (3) comparar la eficiencia de ambos métodos para realizar estimaciones de concentración celular precisas e (4) investigar la relación entre la abundancia celular de dinoflagelados BHAB en macroalgas y sustratos artificiales. Las implicaciones de los resultados obtenidos en este estudio son relevantes para la investigación y seguimiento de estos organismos dentro de la región macaronésica. Además, estos resultados aportan nuevas evidencias de que los sustratos artificiales son un método estándar adecuado para el muestreo de dinoflagelados BHAB en todo el mundo.

2. Material y métodos

2.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo entre marzo de 2017 y agosto de 2018 en dos archipiélagos de la región macaronésica: las Islas Canarias y Cabo Verde. Las muestras se recolectaron mediante *snorkel* y buceo en siete localidades de las Islas Canarias y dos localidades de Cabo Verde (Fig. 1; Tabla I). En todas las localidades se instalaron registradores de datos HOBO Pendant® Temperature y HOBO Pendant® G (Onset®) para describir los patrones de temperatura (°C) y movimiento del agua (m s^{-2}). Las localidades de muestreo abarcaron una variedad de hábitats bentónicos entre los que se incluyeron fondos rocosos y fondos rocoso-arenosos cubiertos por mantos de macroalgas fotófilas o por una mezcla de estas y corales, así como fondos arenosos situados entre los 0,5 y 7 m de profundidad en la franja infralitoral a los que se accedió mediante *snorkel* o equipo de buceo (Fig. S1). En ellos, la temperatura y el movimiento del agua oscilaron entre 18 y 26 °C y entre 4,62 y 41,51 m s^{-2} respectivamente (Tabla I).

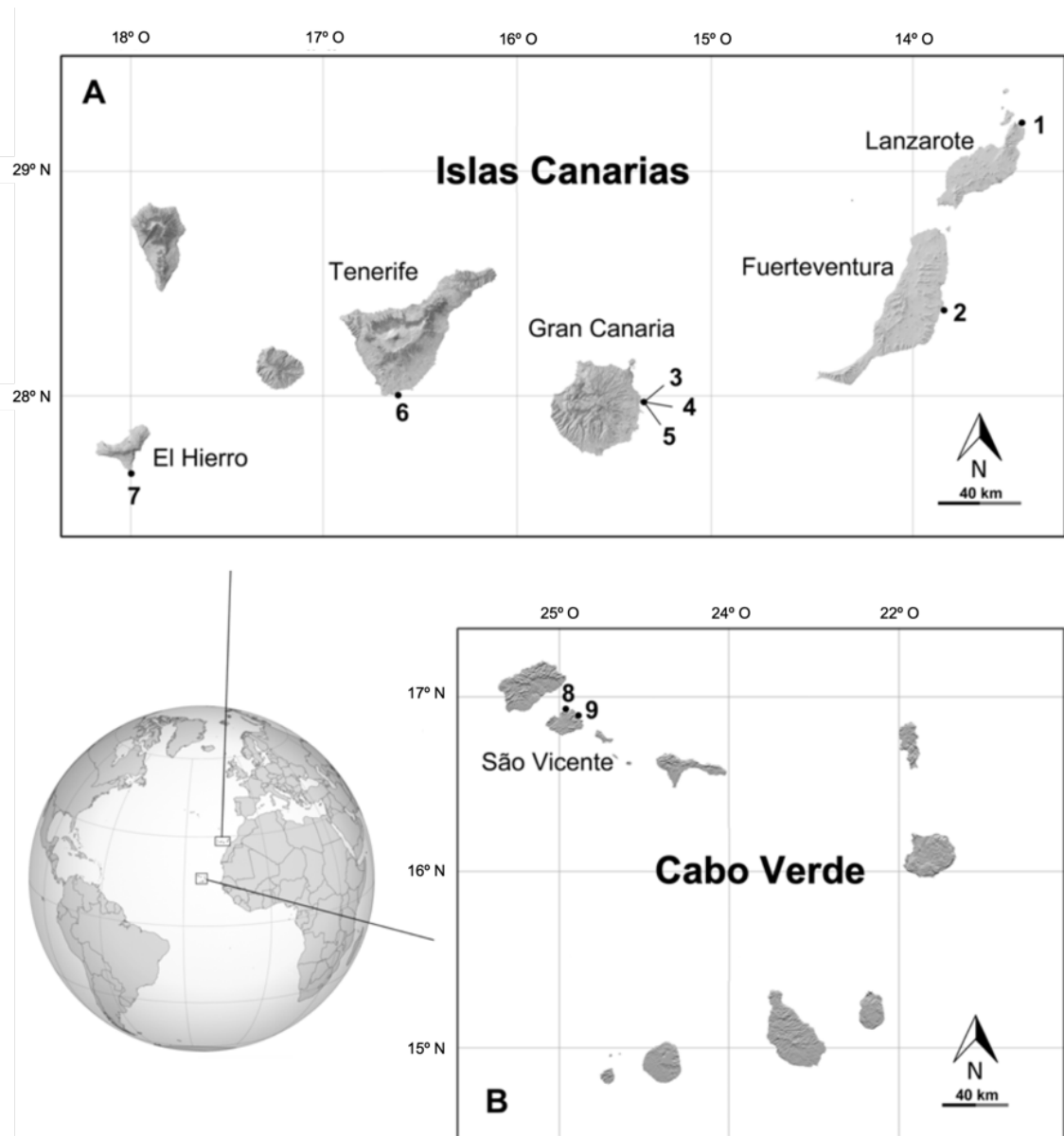


Figura 1. Mapas de las Islas Canarias (**A**) y Cabo Verde (**B**) donde se muestran la posición de las localidades donde se llevaron a cabo los muestreos.

Tabla I. Listado de localidades muestreadas, para la que se detalla la descripción del hábitat, la fecha de muestreo, el rango de profundidad (m), el valor promedio de la temperatura del agua (°C) y los valores promedio, desviación estándar, mínimo y máximo del movimiento del agua medido como aceleración ($m \cdot s^{-2}$) durante el experimento. (n.r. = Sitios donde no se registró el movimiento del agua). (Archipiélago: Islas Canarias (I.C.) y Cabo Verde

Localidad	Isla, Archipiélago	Coordenadas	Tipo hábitat	Fecha	Experimento	Prof. (m)	Temp. (°C)	Movimiento agua ($m \cdot s^{-2}$)		
								□	DE	Min Max
1. Caletón Blanco	Lanzarote, I.C.	29° 13.1' N, 13° 26.3' O	Fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas	julio 2018	Variabil. muestral	1,5 – 2,5	23,96	10,72	0,3	7,73 13,12
2. Salinas del Carmen	Fuerteventura, I.C.	28° 21.9' N, 13° 52.1' O	Fondo rocoso tapizado por macroalgas	marzo 2018	Variabil. muestral	0,5 – 1,5	20,31	10,97	0,372	8,81 13,08
3. Muelle de Taliarte	Gran Canaria, I.C.	27° 59.4' N, 15° 22.1' O	Fondo arenoso	marzo 2017	Tamaño muestral	4 - 5	19,83	n.r.		
4. Bahía de Taliarte	Gran Canaria, I.C.	27° 59.3' N, 15° 22.2' O	Fondo rocoso tapizado por macroalgas	febrero 2017 febrero 2018 marzo 2018	Tamaño muestral Variabil. muestral Variabil. muestral	3 - 4	19,54 18,82 20,32	n.r. 10,63 10,90	0,16 0,3	8,86 8,60 13,12
5. Bahía de Melenara	Gran Canaria, I.C.	27° 59.3' N, 15° 22.3' O	Fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas	julio 2018	T. colonización Variabil. muestral	6 - 7	19,90 23,48	n.r. 10,85	0,195	10,19 11,5
6. Las Galletas	Tenerife, I.C.	28° 00.3' N, 16° 39.1' O	Fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas	abril 2018	Variabil. muestral	1 - 2	19,98	11	1,12	4,62 41,51
7. Muelle La Restinga	El Hierro, I.C.	27° 38.3' N, 17° 58.7' O	Fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas	noviembre 2017 abril 2018	Variabil. muestral Variabil. muestral	3 - 4	23,13 20,91	10,85 10,95	0,128 0,122	10,49 11,17 10,79 11,17
8. Bahía de Salamansa	São Vicente, C.V.	16° 54.5' N, 24° 56.2' O	Fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas y corales	noviembre 2017	Tamaño muestral Variabil. muestral	3 - 4	24,95	n.r.		
9. Bahía das Gatas	São Vicente, C.V.	16° 53.9' N, 24° 54.4' O	Fondo rocoso- arenoso tapizado por <i>Dictyota</i> spp. y corales	noviembre 2017	Variabil. muestral	0,5 - 1,5	26,18	n.r.		

2.2. Desarrollo de sustratos artificiales

Para implementar una estrategia de muestreo de dinoflagelados BHABs en la región macaronésica se desarrolló un sustrato artificial (Fig. 2A) inspirado en el prototipo empleado por Tester *et al.* (2014). En el modelo utilizado en el presente estudio, la red de fibra plástica (dimensiones: 10,2 × 15,2 cm, área: 170 cm²; luz de malla: 1,6 mm) se unió directamente a un hilo de *nylon* utilizando dos puntos de conexión mediante el uso de un marco de plástico rígido adherido a la red (10,2 cm × 15,2 cm; 0,4 cm de ancho). A continuación, la red se suspendió en la columna de agua, a una distancia aproximada de 15 cm sobre el fondo del mar utilizando como flotador un tubo plástico de laboratorio de 15 ml (Fig. 2A). Las réplicas de sustrato artificial se unieron a una barra de plástico (PVC) de 210 cm de largo, utilizando bridas de plástico separadas entre sí por una distancia de 30 cm (Fig. 2B). Para permitir el libre movimiento de cada réplica, se usaron dos eslabones giratorios de pesca para sujetar el hilo de *nylon* tanto al flotador como a la brida. La estructura completa se ancló al fondo del mar mediante dos pesos (p. ej. plomos de buceo) unidos a los extremos de la barra (Fig. 2B). En todos los casos, la estructura se desplegó de manera aleatoria en cada área de muestreo (Fig. 2C). Al final de cada experimento, las réplicas de sustrato artificial se recogieron de forma individual utilizando bolsas de plástico con cierre *zip* (1 L). Para ello, el flotador se sostuvo con una mano para mantener el dispositivo erguido, lo que permitió posicionar la red de fibra plástica de manera adecuada con la mínima manipulación posible para ser introducida en la bolsa acompañada por el agua circundante. Una vez dentro, se procedió a cortar el hilo de *nylon* con unas tijeras y se cerró el cierre *zip* de bolsa (Fig. S1)

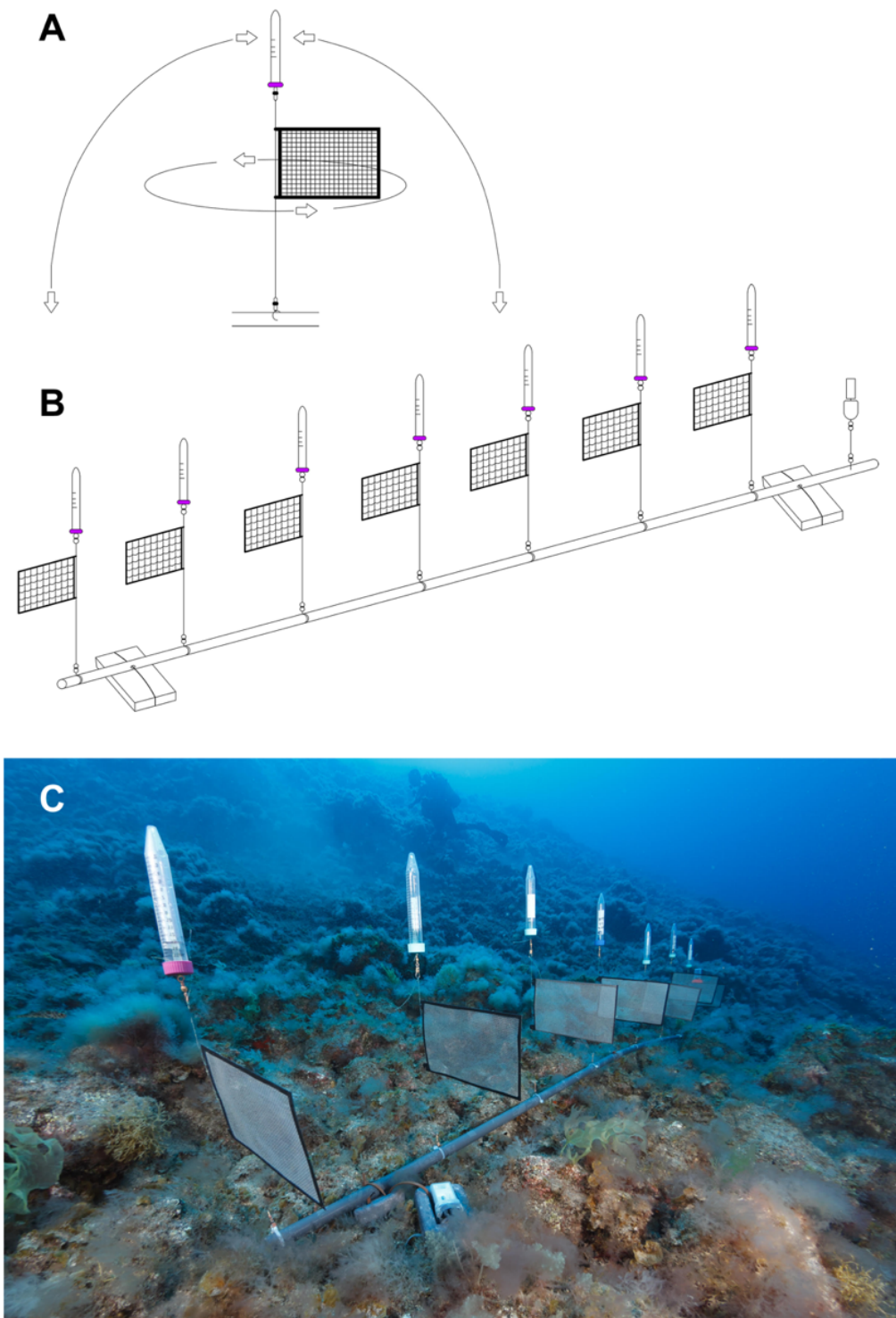


Figura 2. (A) Esquema del sustrato artificial modificado a partir del modelo propuesto por Tester *et al.* (2014). Las flechas muestran todos los movimientos a los que las corrientes, el oleaje, etc. pueden someter al dispositivo durante el tiempo de exposición. **(B)** Esquema donde se muestra la disposición de 7 réplicas de sustrato artificial en una barra de plástico de 210 cm de largo. Cada réplica está separada de las réplicas contiguas por una distancia de 30 cm, lo que permite a estas moverse libremente sin intervenir en el movimiento de las réplicas contiguas. **(C)** Despliegue de sustratos artificiales en El Hierro, Islas Canarias.

2.3. *Tiempo de colonización de los sustratos artificiales*

El tiempo requerido por los dinoflagelados para colonizar los sustratos artificiales fue estimado mediante el despliegue de conjuntos de 3 réplicas que fueron después recuperadas en 3 intervalos de tiempo diferentes: 24, 48 y 72 h en la Bahía de Melenara (Localidad 5). Para comprobar la existencia de diferencias significativas en la abundancia celular entre géneros y tiempos de exposición se empleó un análisis ANOVA de dos vías. Las pruebas por pares (Holm-Sidak) resolvieron las diferencias entre tiempos de exposición (24 - 48 h y 48 - 72 h) para cada género como resultado de una interacción significativa entre "Tiempo" y "Género". La homogeneidad de varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene. En todos los casos, la homogeneidad de varianzas eliminó la necesidad de transformar los datos originales. Estos análisis se implementaron utilizando el paquete estadístico R.3.4.3.

2.4. *Determinación del tamaño muestral de sustratos artificiales*

El tamaño muestral necesario para estimar la abundancia celular de dinoflagelados con un nivel de variabilidad aceptable se determinó mediante el uso de conjuntos de 12 réplicas. En este caso, las réplicas se fijaron a tubos de plástico (PVC) dispuestos en un cuadrado (150 × 150 cm). Después, los cuadrados se colocaron en tres hábitats diferentes: un fondo arenoso en el puerto de Taliarte (localidad 3), un fondo rocoso cubierto de macroalgas en la bahía de Taliarte (localidad 4) y un fondo rocoso-arenoso tapizado por macroalgas y corales en la bahía de Salamansa (localidad 8). Para calcular el número de réplicas necesario para cada género, se graficó el error estándar (SE, por sus siglas en inglés) de sus abundancias celulares transformadas logarítmicamente frente al número de réplicas (Kingsford y Battershill, 1998). El número mínimo de réplicas se determinó cuando, añadiendo un número creciente de estas, el SE de las abundancias celulares transformado en logaritmo se estabilizó. Además, se representaron los coeficientes de variación (CVs), una medida de variación muestral estandarizada por la media muestral,

frente al número de repeticiones para verificar la estabilización de la variabilidad. De manera complementaria a estos análisis, se llevó a cabo un análisis de poder por medio del programa Gpower (<http://www.gpower.hhu.de/>), utilizando datos de abundancia de dinoflagelados de un subconjunto aleatorio de cuatro sitios para obtener un rango de “efecto tamaños” (f), que varió de $f=0,7$ a $f=1,3$. Para un valor alfa estándar de 0,05 y una potencia estadística de 0,95, calculamos el nivel de replicación utilizando una familia de pruebas estadísticas F-test.

2.5. Abundancias celulares, variabilidad de la muestra y relación entre métodos

Para comparar las abundancias celulares obtenidas en las macroalgas y las obtenidas en los sustratos artificiales, se recolectó un número equivalente de réplicas de cada sustrato en Caletón Blanco (localidad 1), Salinas del Carmen (localidad 2), Bahía Taliarte (localidad 4), Bahía Melenara (localidad 5), Las Galletas (localidad 6), Puerto de La Restinga (localidad 7), Baía de Salamansa (localidad 8) y Baía das Gatas (localidad 9). Las distintas especies de macroalga fueron seleccionadas de acuerdo al conocimiento previo existente sobre su presencia y diversidad en la región macaronésica, así como su capacidad para albergar concentraciones celulares de dinoflagelados bentónicos. Las macroalgas recolectadas incluyeron miembros del filo Rhodophyta: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, *Galaxaura rugosa* (Ellis y Solander) Lamouroux y *Jania rubens* (Linnaeus) Lamouroux), del filo Chlorophyta: *Caulerpa sertularioides* (Gmelin) Howe y *Halimeda tuna* (Ellis y Solander) Lamouroux) y del filo Ochrophyta: *Cystoseira humilis* Schousboe ex Kützing, *Colpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès y Solier, *Dictyota* spp., *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau, *Lobophora schneideri* Vieira (nombrada como *Lobophora variegata* (Lamouroux) Womersley ex Oliveira en Fernández *et al.*, 2019), *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Sargassum filipendula* Agardh y *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne (Fig. S2). Para cada réplica se recolectaron alrededor de 25 g de las especies disponibles utilizando recipientes de plástico de 100 ml. Para ello, se colocó el recipiente a pocos centímetros del espécimen seleccionado, se desprendió con cuidado la fronda y esta se introdujo en el interior del recipiente acompañada por el agua circundante. En todos los

casos, cada réplica de macroalga estuvo, en la medida de lo posible, compuesta por material proveniente de una única especie.

Para cada método de muestreo (macroalgas y sustratos artificiales) se calculó el coeficiente de variación (CV); un CV alto es indicativo de una mayor dispersión en torno a la media. Debido a que el CV es una magnitud adimensional, es posible realizar comparaciones entre distintas unidades de medida, es decir, entre estimaciones de abundancia celular obtenidas en sustratos artificiales (células 100 cm^{-2}) y en macroalgas (células g^{-1}). Para detectar diferencias significativas entre los CVs obtenidos en cada sitio a partir del uso de ambos métodos se utilizó la prueba *cvequality* del paquete R (Versión 0.1.3; Marwick y Krishnamoorthy, 2018). Para comparar mejor la variabilidad de las abundancias obtenidas con ambos métodos, los datos transformados en logaritmos se representaron gráficamente para cada localidad muestreada.

Por otro lado, se calculó la proporción de abundancias celulares medias en los sustratos artificiales frente a abundancias celulares medias en las macroalgas para cada género y localidad de muestreo. Finalmente, se evaluaron las relaciones entre las abundancias medias encontradas en macroalgas y las encontradas en sustratos artificiales de cada género mediante análisis de regresión lineal usando los datos agrupados y transformados en logaritmos de todas las localidades de muestreo.

2.6. Procesamiento de muestras, identificación de especies de dinoflagelados y recuento celular

Fuera del agua, las muestras se procesaron de forma inmediata. Las células de dinoflagelados se desprendieron de ambos sustratos mediante agitación vigorosa durante 1 minuto. Para separar las macroalgas del agua de mar que contenía las células, las muestras se filtraron con un tamiz de $150\ \mu\text{m}$. Las macroalgas se secaron y se pesaron directamente para determinar su peso húmedo. En ambos casos, las muestras que contenían los dinoflagelados desprendidos se concentraron en un tamiz de $20\ \mu\text{m}$. Una vez vacías, las bolsas

de plástico que contenían los sustratos artificiales se rellenaron con 50 - 100 ml de agua de mar prefiltrada y se repitieron los procedimientos de agitación y filtrado. Este procedimiento estuvo destinado a recuperar las células que pudieran haber quedado retenidas en los pliegues de las bolsas. En ambos casos, todo el material recogido en el tamiz se depositó en un recipiente de plástico de 100 ml que se llenó con agua de mar filtrada hasta completar un volumen de 100 ml añadiendo formaldehído hasta una concentración final del 4% en agua de mar. Después, las muestras se almacenaron en oscuridad hasta su posterior análisis.

La identificación de las especies de dinoflagelados bentónicos se llevó a cabo a partir de varias muestras de ambos sustratos por cada localidad. Las células conservadas en formol se examinaron bajo microscopía electrónica de barrido (MEB) (JEOL JSM-6380 LV) y bajo microscopía de luz/fluorescencia (LEICA DM6000 B) equipada con una cámara LEICA DFC495. Las células se tiñeron con blanco de calcoflúor (Fritz y Triemer, 1985) para analizar la tabulación de las placas tecales.

Durante la cuantificación celular los especímenes sólo se identificaron a nivel de género. El recuento se realizó en cámaras Sedgewick-Rafter (Edler y Elbrächter, 2010), utilizando un microscopio de luz invertido (LEICA DMI3000 B) con aumentos de 20X y 40X. En la mayoría de los casos fue necesaria más de una cámara Sedgewick-Rafter para contar un número suficiente de células por réplica de sustrato artificial. Para cada réplica, se contaron al menos 400 células del género dominante (casi siempre *Ostreopsis*) y aproximadamente 100 células del resto de géneros. En todos los casos se contaron un máximo de tres cámaras. En el caso de *Gambierdiscus* se usaron también cámaras de Utermöhl de 10 ml (Edler y Elbrächter, 2010) cuando las muestras presentaron concentraciones celulares muy bajas. Este procedimiento fue posible gracias a la forma característica y al tamaño relativamente grande de sus células. Finalmente, las abundancias celulares se expresaron como células g⁻¹ peso húmedo de macroalga o células 100 cm⁻² de sustrato artificial.

3. Resultados

3.1. Tiempo de colonización

Durante el experimento realizado para evaluar el tiempo de colonización, los géneros investigados mostraron marcadas diferencias en su abundancia celular. *Ostreopsis* fue siempre el género dominante, presentando una abundancia celular superior (1 - 3 órdenes de magnitud) a las mostradas por el resto de géneros (Fig. 3). El segundo género más abundante fue *Prorocentrum*, seguido de *Coolia*. *Gambierdiscus* mostró siempre la abundancia celular más baja. Las abundancias celulares de los dinoflagelados bentónicos variaron de manera significativa a lo largo del tiempo ("Tiempo" y "Género x Tiempo", $p < 0,001$, Tabla II). *Ostreopsis* y *Gambierdiscus* mostraron las máximas abundancias celulares tras 24 h, mientras que las abundancias celulares de *Coolia* y *Prorocentrum* fueron mayores tras 48 h. Aún así, la prueba por pares (Prueba de Holm-Sidak) indicó que las abundancias celulares de los diferentes géneros no difirieron significativamente entre 24 y 48 h. A partir de las 48 h, las abundancias celulares de *Ostreopsis*, *Coolia* y *Gambierdiscus* empezaron a decaer, mientras que las de *Prorocentrum* continuaron aumentando lentamente (Fig. 3). Sólo se encontraron diferencias significativas entre 48 y 72 h para las abundancias celulares de *Ostreopsis* (Tabla II).

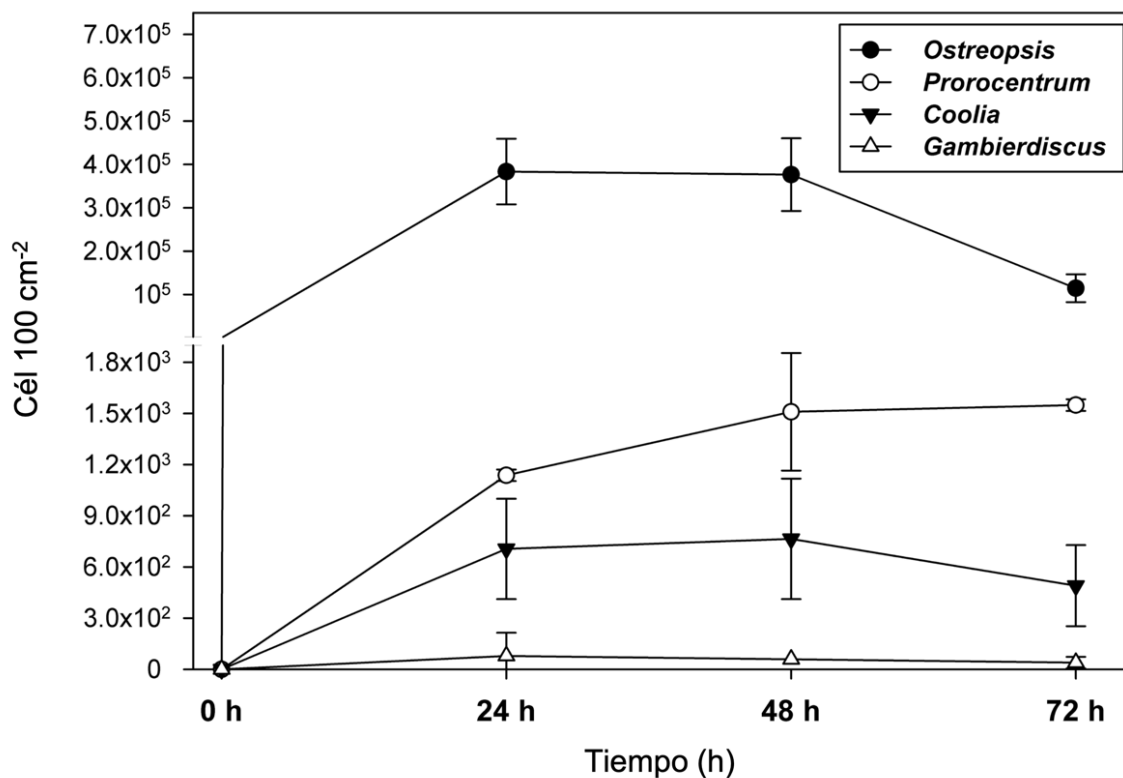


Figura 3. Concentración celular de *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Gambierdiscus* sobre los sustratos artificiales tras un tiempo de colonización de 24, 48 y 72 h en la bahía de Melenara (localidad 5, Gran Canaria, Islas Canarias) en julio de 2018 (n=3). Las barras de error muestran el error estándar (SE) de las medias. El orden de magnitud de *Ostreopsis* es superior al del resto de géneros analizados.

Tabla II. Pruebas de ANOVA de dos vías para detectar diferencias significativas en la concentración celular de dinoflagelados a través de los tiempos de colonización. Las pruebas por pares muestran diferencias significativas entre tiempos para cada género.

Fuente de variación	DF	MS	F	P	Prueba de Holm - Sidak	
Género	3	190272573977,957	165,32	<0,001	<i>Gambierdiscus</i>	24 h = 48 h = 72 h
Tiempo	2	17636053152,634	15,323	<0,001	<i>Ostreopsis</i>	24 h = 48 h ≠ 72 h
Tiemp. x Gén.	6	17628860021,786	15,317	<0,001	<i>Prorocentrum</i>	24 h = 48 h = 72 h
Residual	24	1150937524,029			<i>Coolia</i>	24 h = 48 h = 72 h
Total	35	21128156827,045				

3.2. Tamaño muestral

Durante los experimentos llevados a cabo para evaluar el tamaño muestral necesario, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* estuvieron presentes en todas las localidades muestreadas (Fig. 4), mientras que *Coolia* sólo estuvo presente en una localidad (Fig. 4G). El número de réplicas requerido para el muestreo del género *Gambierdiscus* no pudo ser evaluado ya que este no fue detectado en ninguna de las localidades de estudio. En todos los casos, *Ostreopsis* fue el género más abundante (1335 - 2627, 12436 - 28749 y 20176 - 42020 células 100 cm⁻² en las localidades 3, 4 y 8, respectivamente); en la localidad 8, *Coolia* fue el segundo género más abundante (2823 - 6765 células 100 cm⁻²), mientras que las abundancias celulares de *Prorocentrum* fueron siempre las más bajas (85 - 847, 2631 - 7348 y 1647 - 4176 células 100 cm⁻² en las localidades 3, 4 y 8, respectivamente). El número de réplicas de sustrato artificial (n) necesario para estimar de manera precisa las abundancias celulares de dinoflagelados bentónicos fue en todos los casos inferior a 9 (Fig. 4). Para *Ostreopsis*, el nivel mínimo de réplicas varió entre 5 (Fig. 4A) y 7 réplicas (Fig. 4C y E). La variabilidad en la concentración celular de *Coolia* se estabilizó en n=8 réplicas (Fig. 4G). En el caso de *Prorocentrum*, fue necesario un número mayor de réplicas, entre 7 y 9, para que la variabilidad de las estimaciones de abundancia celular entre estas se estabilizara (Fig. 4B, D y F). De la misma manera, el análisis de los CV también sugirió la estabilización de la variabilidad utilizando el número de réplicas indicado anteriormente (Fig. S3).

El análisis de potencia mostró que para un "tamaño del efecto" de "f=1,3", cuatro repeticiones de la prueba (n=4) son suficientes para alcanzar una potencia estadística de 0,95. Para un "f=1,0", el nivel de replicación aumentaría a n=6, mientras que para un "f=0,7", el nivel de replicación tendría que aumentar a n=10.

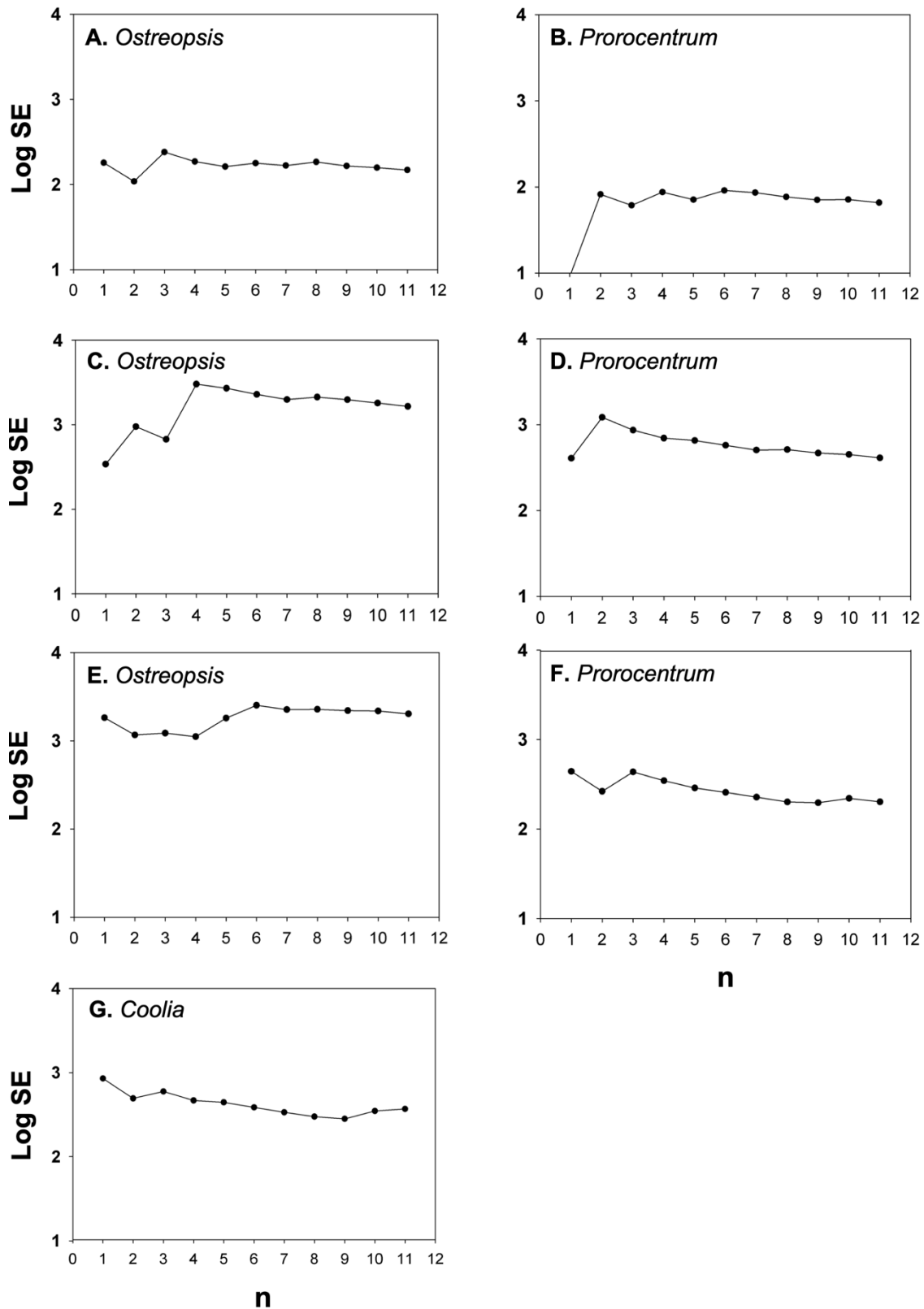


Figura 4. Cambios en el logaritmo del error estándar (Log SE) de la concentración celular de 3 géneros de dinoflagelados BHAB con el aumento de las réplicas en tres hábitats: **(A-B)** fondo arenoso en Taliarte (localidad 3, Gran Canaria, Islas Canarias); **(C-D)** manto mixto de macroalgas en la bahía de Taliarte (localidad 4, Gran Canaria, Islas Canarias) y **(E-G)** manto mixto de macroalgas y coral en la bahía de Salamansa (localidad 8, São Vicente, Cabo Verde).

3.3. Abundancias celulares, variabilidad de las muestras y relación entre métodos

En este estudio se identificaron un total de 16 especies pertenecientes a 4 géneros de 2 órdenes diferentes: *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* Schimdt, *Coolia* Meunier (Gonyaulacales) y *Prorocentrum* Ehrenberg (Prorocentrales). Las especies de *Coolia* identificadas en este estudio fueron *C. canariensis* Fraga, *C. malayensis* Leaw, Lim y Usup, *C. monotis* Meunier y *C. tropicalis* Faust en Canarias y *C. monotis* en Cabo Verde. Se identificaron cuatro de las seis especies de *Gambierdiscus* citadas para estos archipiélagos: *G. australes* Chinain y Faust, *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester, *G. carolinianus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester, *G. excentricus* Fraga en Canarias y *G. excentricus* en Cabo Verde. Las especies identificadas dentro del género *Ostreopsis* fueron: *O. fattorussoi* Accoroni, Romagnoli y Totti, *O. cf. ovata* Fukuyo y *O. cf. siamensis* Schmidt en las Islas Canarias y *O. lenticularis* Fukuyo y *O. cf. ovata* en Cabo Verde. Por último, de las 13 especies bentónicas de *Prorocentrum* citadas en estos archipiélagos, *P. hoffmanianum* Faust, *P. lima* (Ehrenberg) Stein, *P. maculosum* Faust y *P. panamense* Grzebyk, Sako y Berland fueron identificadas en Canarias y *P. hoffmanianum* y *P. lima* en Cabo Verde.

En la mayoría de las localidades, *Ostreopsis* fue el género dominante tanto en las macroalgas como en los sustratos artificiales mientras que, en general, *Gambierdiscus* mostró las abundancias celulares medias más bajas (Tabla II).

Tabla III. Media, máximo, mínimo, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (% CV) de las abundancias celulares de *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* y *Coolia* presentes en macroalgas (células g⁻¹) y redes de fibra plástica (células 100 cm⁻²) en diferentes localidades (Loc.). También se incluye la relación entre los sustratos artificiales y las abundancias de macroalgas (\bar{X} s/ \bar{X} m) y los resultados de la prueba *cvequality* para cada género, en cada localidad de muestreo (columna derecha). Los números entre paréntesis indican las localidades en las que se realizaron experimentos en dos tiempos diferentes: (1) primer muestreo y (2) segundo muestreo.

Gambierdiscus

Red plástica (cél 100 cm ⁻²)							Macroalga (cél g ⁻¹)							
Loc.	\bar{X}	SD	Min	Max	CV (%)	n	\bar{X}	SD	Min	Max	CV (%)	n	\bar{X} s/ \bar{X} m	Prueba C \vee equality
1	252	44	176	294	18	7	46	64	0	177	139	7	5	D'AD=6,69 p=0,009
2	59	102	0	176	173	3	13	12	0	21	86	3	4,5	-
4 (2)	51	41	0	118	81	7	3	6	0	14	177	7	17	D'AD=0,77 p=0,37
5	67	86	0	235	128	7	20	16	7	53	79	7	3	-
6	59	0	59	59	0	3	102	51	54	155	49	3	1	D'AD=7,12 p=0,007
7 (2)	445	258	235	1000	58	7	413	504	68	1496	122	7	1	D'AD=1,16 p=0,28
7 (1)	42192	9711	28166	59706	23	7	17961	19523	1539	47687	109	7	2	D'AD=5,44 p=0,019

Ostreopsis

Red plástica (cél 100 cm ⁻²)							Macroalga (cél g ⁻¹)							
Loc.	\bar{X}	SD	Min	Max	CV (%)	n	\bar{X}	SD	Min	Max	CV (%)	n	\bar{X} s/ \bar{X} m	Prueba C \vee equality
1	434216	60263	384118	566471	14	7	6300	9255	450	25059	147	7	69	D'AD=7,29 p=0,006
2	191405	60495	135000	255294	32	3	783	341	355	1008	46	3	244,5	D'AD=0,21 p=0,64
4 (1)	1088	397	558	1076	36	7	132	199	0	569	150	7	8	D'AD=3,25 p=0,07
4 (2)	19218	1698	17353	21824	9	7	380	127	165	554	33	7	51	D'AD=7,47 p=0,006
6	1550887	348613	1148459	1760504	22	3	6191	2856	3145	8810	46	3	250,5	D'AD=0,77 p=0,38
5	434313	81925	298823	549412	19	7	14772	8183	2935	23167	55	7	29	D'AD=5,39 p=0,020
7 (1)	235	68	176	353	29	7	215	122	45	387	57	7	1	D'AD=2,13 p=0,14
7 (2)	40175	4208	34118	46353	10	7	50413	36130	6011	122818	72	7	1	D'AD=9,96 p=0,002
8	27765	3571	21182	31882	13	7	4810	10277	22	29922	214	7	6	D'AD=4,72 p=0,029
9	247759	70409	152941	351176	28	7	153082	55320	84507	220079	36	7	2	D'AD=0,28 p=0,59

Tabla III (Continuación)

Prorocentrum

Red plástica (cel 100 cm ²)							Macroalga (cel g ⁻¹)							
Loc.	\bar{X}	DE	Min	Máx	CV (%)	n	\bar{X}	SD	Min	Máx	CV (%)	n	\bar{X}_s/\bar{X}_m	CVequality Test
1	1980	591	1000	2647	30	7	312	179	88	532	57	7	6	D'AD=1,70 p=0,19
2	823	256	647	1118	31	3	226	149	70	367	65	3	4	D'AD=0,70 p=0,40
4 (1)	157	116	59	412	74	7	116	106	0	314	91	7	1	D'AD=0,12 p=0,73
4 (2)	344	211	176	765	61	7	121	99	45	328	82	7	3	D'AD=0,24 p=0,62
5	1176	297	765	1706	25	7	562	117	424	793	21	7	2	-
6	98	68	59	176	69	3	53	2	51	54	4	3	2	-
7 (2)	1782	393	1235	2176	22	7	670	515	91	1247	77	7	3	D'AD=4,95 p=0,026
7 (1)	971	608	412	2176	63	7	359	362	45	1144	101	7	3	D'AD=0,69 p=0,4
8	2681	494	1647	3235	18	7	461	435	41	1381	94	7	6	D'AD=6,24 p=0,012
9	1518	557	947	2382	37	7	889	541	319	1616	61	7	2	D'AD=0,99 p=0,65

Coolia

Red plástica (cel 100 cm ²)							Macroalga (cel g ⁻¹)							
Loc.	\bar{X}	DE	Min	Máx	CV (%)	n	\bar{X}	SD	Min	Máx	CV (%)	n	\bar{X}_s/\bar{X}_m	CVequality Test
1	2735	624	1882	3412	23	7	110	179	9	502	164	7	25	D'AD=4,84 p=0,027
2	45722	18778	33,613	67353	41	3	238	160	94	412	67	3	192	D'AD=0,30 p=0,59
4 (1)	8329	2828	4412	11059	34	7	3126	1262	1860	5513	40	7	3	D'AD=0,15 p=0,69
4 (2)	2647	593	1882	3529	22	7	1446	1727	447	5255	119	7	2	D'AD=5,60 p=0,017
5	676	183	412	100	27	7	273	104	113	389	38	7	2	D'AD=0,89 p=0,34
6	5653	8408	56209	40980	17	3	2803	973	1812	3756	35	3	18	D'AD=0,88 p=0,35
7 (1)	402	350	59	882	87	7	171	143	38	444	84	7	2	-
7 (2)	487	121	294	647	25	7	555	368	2015	1214	66	7	1	D'AD=3,51 p=0,061
8	5126	1133	2824	6765	22	7	357	351	7	922	98	7	14	D'AD=5,20 p=0,022
9	289	133	125	471	46	7	312	167	96	534	54	7	1	D'AD=0,09 p=0,75

Tras 24 horas, los géneros de dinoflagelados BHAB presentes en las macroalgas también fueron detectados en los sustratos artificiales en todas las localidades muestreadas (Tabla III). En comparación con las abundancias celulares encontradas en los sustratos artificiales, las abundancias celulares encontradas en las macroalgas fueron, en general, muy variables. Así, la mínima y máxima abundancia celular entre réplicas de macroalgas de una misma localidad difirieron, en la mayoría de los casos, en 1 - 2 órdenes de magnitud, alcanzando en ocasiones diferencias de hasta 3 órdenes de magnitud. Por el contrario, la mínima y máxima abundancia celular registrada entre las réplicas de sustrato artificial de una misma localidad estuvieron situadas, en general, dentro del mismo orden de magnitud (Fig. 5; Fig. S5; Tabla III).

En la mayoría de los casos, el uso de sustratos artificiales dio como resultado estimaciones de abundancia celular más precisas (CVs más bajos) que las obtenidas a partir de macroalgas (Fig. 5; Fig. S5). Así, cuando se utilizaron 7 réplicas, los CVs en sustratos artificiales oscilaron entre 9 - 36 % (*Ostreopsis*), 18 - 128 % (*Gambierdiscus*), 18 - 74 % (*Prorocentrum*) y 22 - 87 % (*Coolia*). Por el contrario, cuando se utilizaron macroalgas, los CV oscilaron entre 33 - 214 % (*Ostreopsis*), 79 - 177 % (*Gambierdiscus*), 21 - 101 % (*Prorocentrum*) y 38 - 164 % (*Coolia*) (Tabla III).

La comparación de los CVs obtenidos con cada método para un mismo género por medio de la prueba *cvequality* mostró, en muchos casos, diferencias significativas ($p < 0,05$). Así, *Ostreopsis* mostró diferencias significativas en 5 de las 8 localidades; *Gambierdiscus* mostró diferencias significativas en 3 de 7 localidades; *Coolia* mostró diferencias significativas en 3 de 9 localidades, mientras que *Prorocentrum* mostró diferencias significativas en 2 de las 10 localidades (Tabla III).

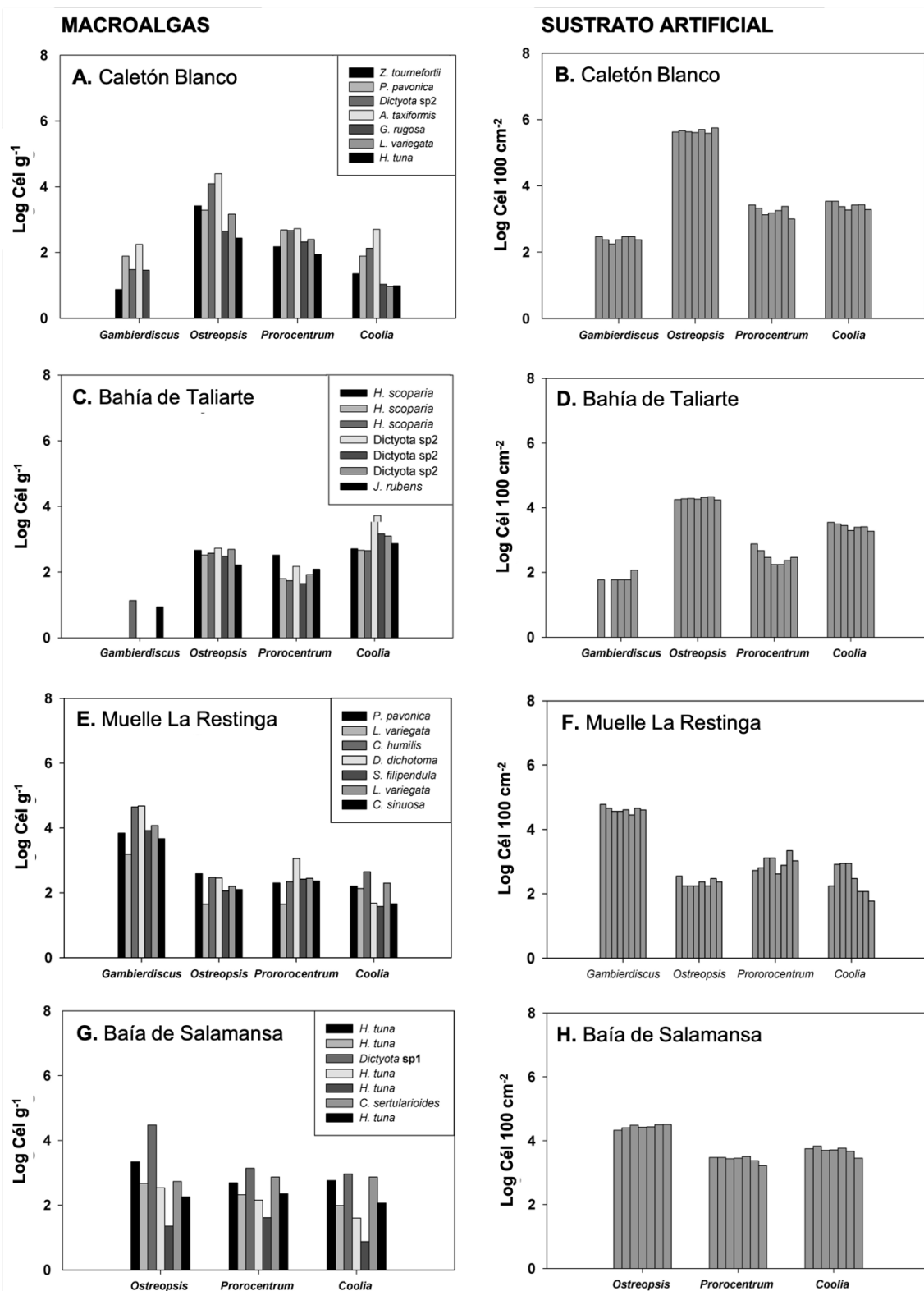


Figura 5. Concentraciones celulares transformadas en logaritmos de los géneros de dinoflagelados BHAB investigados en este estudio sobre diferentes especies de macroalgas (células g^{-1}) (A, C, E y G) y sustratos artificiales (células 100 cm^{-2}) (B, D, E y F) en (A y B) Caletón Blanco (localidad 1); (C y D) bahía de Taliarte (localidad 4); (E y F) Puerto de La Restinga (localidad 7) y (G y H) Baía de Salamansa (localidad 8) con $n=7$.

La relación entre la abundancia celular media en sustratos artificiales y la abundancia celular media en macroalgas (\bar{X}_s/\bar{X}_m , Tabla III) varió entre las distintas localidades de muestreo. *Ostreopsis* y *Coolia* presentaron una relación con un rango amplio (de 1/1 a 1/69 y de 1/1 a 1/25, respectivamente). *Gambierdiscus* mostró una relación con un rango ligeramente más estrecho (1/1 a 1/17). Por último, la relación entre las abundancias celulares de *Prorocentrum* fueron más constantes entre los sitios de muestreo, pues estas oscilaron entre 1/1 y 1/6 (Tabla III).

En relación con estas observaciones, los análisis de regresión lineal realizados utilizando los datos agrupados de todos los sitios de muestreo mostraron la existencia de diferentes tipos de relación entre las concentraciones celulares registradas en los sustratos artificiales y en las macroalgas para cada género (Fig. 5). Las concentraciones celulares de *Gambierdiscus* mostraron la relación más fuerte entre sustratos artificiales y macroalgas ($r^2=0,853$, $p=0,003$, Fig. 6A). Las concentraciones celulares de *Prorocentrum* también mostraron una fuerte relación ($r^2=0,807$, $p=0,001$, Fig. 6C). Por el contrario, las concentraciones de *Ostreopsis* presentaron una relación débil ($r^2 = 0,620$, $p=0,020$, Fig. 6B), mientras que las abundancias de *Coolia* mostraron la relación más débil ($r^2=0,440$, $p=0,051$, Fig. 6D).

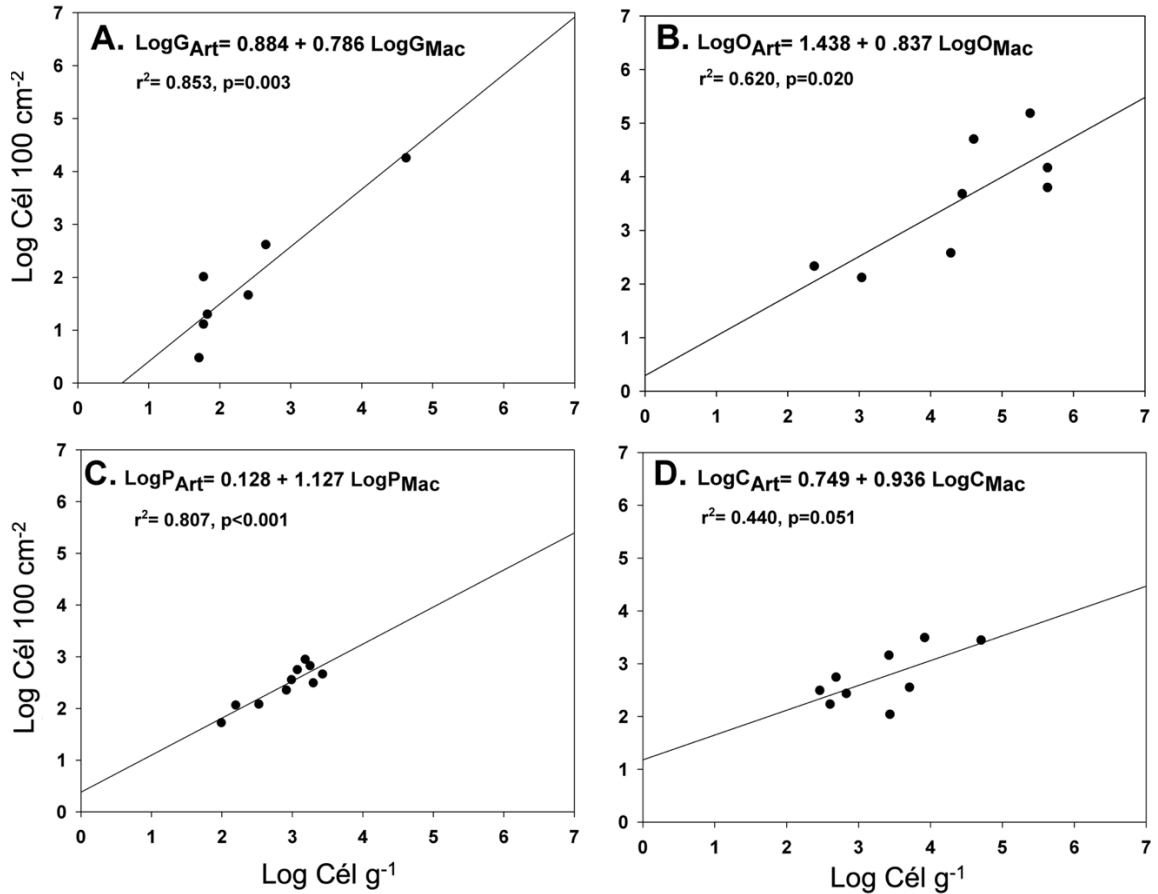


Figura 6. Relaciones entre las concentraciones celulares de (A) *Gambierdiscus*, (B) *Ostreopsis*, (C) *Prorocentrum* y (D) *Coolia* en macroalgas (Mac) y sustratos artificiales (Art) utilizando datos agrupados transformados en logaritmos. Se indican las regresiones lineales ajustadas; la calidad de los ajustes lineales se indica mediante la r^2 ; los p-valores indican la significancia de las relaciones.

4. Discusión

La recolección de macroalgas es el método de referencia para la cuantificación y estimación de la concentración celular de dinoflagelados BHAB, tanto en los estudios de investigación como en los programas de seguimiento (GEOHAB, 2012). Sin embargo, la existencia de diferencias en la relación superficie/peso entre distintas especies de macroalga y la variabilidad que presentan las comunidades de macroalgas en diferentes estaciones y áreas geográficas afecta de forma directa a las abundancias celulares de dinoflagelados BHAB, lo que conlleva importantes limitaciones para proporcionar estimaciones de abundancia celular precisas (Lobel *et al.*, 1988). Así, la falta de un sustrato estandarizado ha llevado a la obtención de resultados inconsistentes de abundancia celular, lo que a su vez ha dificultado la posterior comparación de los mismos dentro de un mismo estudio y entre estudios realizados en diferentes lugares y épocas (Lobel *et al.*, 1988; Bomber y Aikman, 1989; Morton y Faust, 1997; Villareal y Morton, 2002; Cruz-Rivera y Villareal, 2006; Tester *et al.*, 2014; Richlen y Lobel, 2011; Rains y Parsons, 2015). En este estudio se diseñaron una serie de experimentos con el fin de evaluar la aplicabilidad de un método alternativo estandarizado para estimar las densidades de los dinoflagelados BHAB en la región macaronésica.

4.1. Desarrollo de sustratos artificiales

El sustrato artificial utilizado en el presente estudio se basó en el diseño propuesto por Tester *et al.* (2014). Sin embargo, se introdujeron dos modificaciones principales con el objetivo de mejorar tanto su funcionamiento durante el tiempo que este permanece sumergido como de facilitar su posterior recuperación. La modificación más significativa fue la introducción de un marco de plástico externo a la red de fibra plástica, permitiendo su anclaje al hilo vertical de nylon a través de dos puntos laterales. Esta disposición minimiza el riesgo de fricción con otras estructuras cercanas, incluyendo el propio hilo de *nylon*, durante el tiempo de exposición. También reduce de forma significativa la manipulación durante el momento en el que las redes son recuperadas, pues el sustrato se puede introducir directamente en la bolsa de plástico *zip* sin

necesidad de entrar en contacto directo con las manos. De manera similar, Jauzein *et al.* (2016) introdujeron modificaciones en el diseño original de Tester *et al.* (2014) utilizando también dos puntos de anclaje para disminuir la fricción de las redes durante el tiempo de exposición. Sin embargo, su diseño incorpora varias redes de fibra plástica dispuestas dentro de un marco común. Esta disposición da lugar a que la recuperación de cada unidad de sustrato artificial implique de manera obligatoria su manipulación, pues estas han de ser liberadas por ambos extremos antes de poder ser introducidas en un recipiente. Así, este procedimiento favorece el desprendimiento y pérdida de las células y, por tanto, la alteración de la concentración celular (ver Fig. 1 y video suplementario incluido en Jauzein *et al.*, 2016).

En este estudio también se modificó el anclaje de los sustratos artificiales al fondo marino. El sistema de anclaje se diseñó de tal forma que varias réplicas pudieran ser desplegadas de forma simultánea en el fondo. Esta disposición permitió reducir el tiempo necesario para desplegar y recuperar las réplicas de sustratos artificiales. Esto resulta especialmente adecuado durante condiciones adversas del mar (corrientes, olas, etc.) o durante muestreos en zonas profundas de la franja infralitoral (> 5 m), donde la dependencia de sistemas autónomos de respiración (equipos de buceo) disminuye el tiempo disponible para su recuperación. En el diseño evaluado en el presente estudio, las réplicas se dispusieron a lo largo de una barra de plástico separadas entre sí por una distancia suficiente (30 cm) que permitía por un lado su libre movimiento sin entrar en contacto con las réplicas contiguas y por otro su independencia estadística, evitando así problemas de pseudoreplicación. El diseño propuesto por Jauzein *et al.* (2016) también permite desplegar varias réplicas de manera simultánea. Sin embargo, la disposición de las réplicas dentro de un marco común dificulta la recuperación de cada réplica sin afectar (tocar) a las réplicas contiguas, es decir, sin alterar la concentración celular de dinoflagelados adheridos, pues estas están situadas a escasos centímetros, lo que a su vez puede favorecer la pseudoreplicación (ver Fig. 1 y video suplementario incluido en Jauzein *et al.*, 2016).

4.2. Tiempo de colonización y tamaño muestral

El tiempo que los sustratos artificiales permanecen sumergidos debe ser suficiente para que estos sean colonizados por la comunidad de dinoflagelados BHAB. La colonización se considera completa cuando las concentraciones celulares presentes en los sustratos artificiales alcanzan un equilibrio con las concentraciones celulares del entorno, convirtiéndolos así en muestras representativas de las comunidades asociadas a los sustratos naturales (Kibler *et al.*, 2008; Fraga *et al.*, 2012). En este sentido, los tiempos de exposición cortos, es decir < 24 h, han demostrado subestimar en todos los casos las abundancias celulares que son capaces de albergar los sustratos artificiales (Tester *et al.*, 2014; Jauzein *et al.*, 2018). Parsons *et al.* (2021) manifestaron que tiempos de 18 h podrían ser suficientes para la colonización de los sustratos artificiales por *Gambierdiscus*. Sin embargo, estos resultados no han sido publicados. De acuerdo con los resultados obtenidos por Tester *et al.* (2014) y Jauzein *et al.* (2018), en este estudio solo se evaluaron tiempos de exposición ≥ 24 h. Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones celulares de *Ostreopsis*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Coolia* no presentan diferencias significativas entre 24 y 48 h. En su estudio, Tester *et al.* (2014) también observaron que las abundancias celulares de *Ostreopsis*, *Gambierdiscus* y *Prorocentrum* no diferían entre 24 y 48 h en el Mar Caribe. Por su parte, Jauzein *et al.* (2016) tampoco encontraron diferencias entre estos tiempos de exposición durante una proliferación de *Ostreopsis cf. ovata* en el mar Mediterráneo. En Gran Canaria, las concentraciones celulares de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Coolia* se mantuvieron estables después de 48 h, mientras que las de *Ostreopsis* disminuyeron de forma significativa entre 48 y 72 h, lo que indica que las concentraciones celulares de este género deben estimarse siempre utilizando tiempos de exposición < 48 h. Parsons *et al.* (2017) fueron los únicos en evaluar tiempos de muestreo > 72 h; en este estudio los sustratos artificiales se recuperaron después de un mes de exposición. Desde un punto de vista práctico, esta estrategia no parece estar justificada pues, de acuerdo con los resultados obtenidos por el resto de estudios, alarga el tiempo de exposición de manera innecesaria. Además, esta estrategia introduce una serie de variables que quedan fuera del control de los investigadores. Por ejemplo, la colonización de

las superficies artificiales por macroalgas, esponjas, anémonas, tunicados, hidroideos, etc. se produce en tiempos relativamente cortos de meses, semanas e incluso días (Callow y Callow, 2002) lo que, sin duda, actúa alterando las superficies de los sustratos artificiales y, por tanto, su cualidad de estándar.

Así, los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que tiempos de exposición entre 24 y 48 h de los sustratos artificiales parecen ser adecuados en la región macaronésica. Sin embargo, a fin de evitar un aumento del tiempo de muestreo de manera innecesaria, 24 h se propone como el tiempo de exposición ideal para el muestreo de dinoflagelados BHAB en la región. Este tiempo coincide con el establecido hasta ahora en otras regiones (Tester *et al.*, 2014; Jauzein *et al.*, 2016), lo que sugiere su fiabilidad de manera independiente a la región de muestreo. Sin embargo, el tiempo de exposición deberá seguir siendo evaluado en futuros estudios realizados en regiones, condiciones ambientales y con concentraciones celulares diferentes a las evaluadas en estos estudios. Por ejemplo, es necesario realizar experimentos que determinen o calibren el tiempo exposición necesario durante proliferaciones masivas de géneros como *Ostreopsis* en las que, como se ha observado recientemente, la colonización completa de los sustratos artificiales (estabilización de las concentraciones celulares) podría suceder en pocas horas (Berdalet *et al.*, datos sin publicar).

Cuanto mayor sea el número de réplicas, menor será la variación de la concentración celular media y por tanto la certeza de las estimaciones aumentara (Lobel *et al.*, 1988). Tester *et al.* (2014) demostraron que la abundancia celular podía estimarse de manera precisa, es decir, con una variabilidad aceptable que los mismos autores establecieron en $CV < 100\%$, utilizando un número mínimo de 5 réplicas en el caso de *Gambierdiscus* y 2 en el de *Prorocentrum*. Por el contrario, utilizando el número máximo de réplicas evaluadas en su estudio ($n = 8$), estos autores no consiguieron en ningún caso observar $CVs < 100\%$ para *Ostreopsis*. Tester *et al.* (2014) señalaron la baja concentración celular de *Ostreopsis* en el lugar de estudio en comparación con *Prorocentrum* y *Gambierdiscus* como una de las posibles razones para la obtención de resultados tan variables entre réplicas. Parsons *et al.* (2021) obtuvo $CVs < 100\%$ para *Gambierdiscus* en la mayoría de las localidades muestreadas

con un número de 2 a 4 réplicas. Este resultado contrasta ligeramente con el obtenido por Tester *et al.* (2014), y podría deberse a que estos autores encontraron concentraciones celulares mayores para este género en su región de estudio. Sin embargo, Parsons *et al.* (2021) no mostraron estos resultados en su estudio. De manera similar a lo observado por Tester *et al.* (2014) para *Gambierdiscus*, el presente estudio mostró que un número entre 5 y 9 réplicas proporciona estimaciones precisas de las concentraciones celulares para los géneros estudiados en las Islas Canarias. En el caso de *Ostreopsis*, la menor variabilidad encontrada entre réplicas en este estudio (n= 5 - 7) podría haber sido consecuencia de las altas concentraciones registradas en Gran Canaria (235 - 42020 células 100 cm⁻²) en comparación con las registradas por Tester *et al.* (2014) en Belice (0 - 6346 células 100 cm⁻²).

Dado que los géneros de dinoflagelados BHAB investigados en las Islas Canarias demostraron requerir tamaños muestrales ligeramente diferentes, el uso de 7 réplicas parece un buen compromiso entre la precisión y el esfuerzo de muestreo en la región. Sin embargo, será necesario seguir evaluando el tamaño muestral en otras zonas de la región y épocas, especialmente en aquellos casos en los que las concentraciones celulares difieran de manera significativa a las observadas en el presente estudio.

4.3. Abundancias celulares, variabilidad de las muestras y relación entre métodos

En todos los experimentos, los géneros de dinoflagelados observados en las macroalgas fueron los mismos que colonizaron los sustratos artificiales tras un periodo de 24 horas. Sin embargo, las muestras obtenidas a partir de sustratos artificiales proporcionaron, en muchos casos, mayores abundancias celulares, lo que favoreció alcanzar números estadísticamente fiables durante los recuentos posteriores (Edler y Elbrächter, 2010). Probablemente, hubiese sido posible desprender una mayor cantidad de células epífitas de los sustratos naturales realizando pasos de lavado sucesivos. Sin embargo, dado que el objetivo de este trabajo fue el de evaluar la variabilidad entre réplicas y métodos, este posible

error fue siempre consistente entre las réplicas, y por tanto no debería suponer una fuente de variabilidad relevante. De esta forma, los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el área de la superficie de las redes de fibra plástica empleada (170 cm²) es suficiente para el muestreo en los ambientes bentónicos de la región macaronésica. En su estudio, Tester *et al.* (2014) también observaron que el uso de sustratos artificiales de superficie similar (166 cm²) permitía obtener números de células estadísticamente fiables en el mar Caribe. En dicho estudio, la comparación de resultados de abundancia celular obtenidos mediante el uso de sustratos artificiales de superficie similar a los empleados en este estudio (166 cm²) con unos que presentaban un 35% más de superficie (256 cm²), demostró que esta diferencia no supone un factor que influya en la efectividad para caracterizar las abundancias celulares de dinoflagelados BHAB. Por tanto, salvo casos excepcionales donde la abundancia celular sea muy baja, no se recomienda el uso de sustratos artificiales de superficie superior a 170 cm² en la región macaronésica debido a las dificultades que puede presentar su manipulación durante la recogida. En este sentido, la forma y superficie de redes de fibra plástica empleadas en este estudio fueron especialmente definidas desde un punto de vista práctico para facilitar su recogida con bolsas *zip* de 1 litro. Por otro lado, también se observó que las muestras obtenidas a partir de sustratos artificiales eran más limpias, es decir, contenían menos restos de materia orgánica (detritus) que las obtenidas a partir de macroalgas. Este hecho supone una ventaja durante el proceso de recuento, pues el esfuerzo necesario para la observación de las células disminuye de manera significativa. Además, esto también representa una ventaja a la hora de aislar células o de utilizar técnicas de biología molecular como la qPCR (Tester *et al.*, 2014).

El hallazgo más importante de este estudio fue que las estimaciones de abundancia celular de *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia* y *Prorocentrum* obtenidas a partir de sustratos artificiales fueron, en la mayoría de los casos, menos variables, es decir, presentaron CVs más bajos en comparación con las obtenidas a partir de macroalgas. En muchos casos estas diferencias de variabilidad fueron significativas, lo que demuestra que las estimaciones de abundancia celular a partir de sustratos artificiales son más precisas y fiables

que las derivadas de las macroalgas. Así, en este estudio la variación de la abundancia celular entre réplicas, mostrada a través de los CVs, fue el "indicador" para considerar que ambos métodos eran diferentes en cuanto a su precisión para obtener estimaciones exactas de las abundancias de dinoflagelados. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Tester *et al.* (2014) para *Ostreopsis*, *Gambierdiscus* y *Prorocentrum*, quienes no encontraron diferencias en la variabilidad de las abundancias celulares entre métodos. Esta discrepancia entre estudios puede resultar del hecho de que este estudio muestreó más de una especie de macroalga en cada sitio, lo que definitivamente supone una fuente de variabilidad. Sin embargo, el muestreo de distintas especies de macroalga, es una estrategia habitual en muchos estudios, en los que la selección de una sola especie resulta complicada como consecuencia de la fenología, distribución espacial y abundancia específica que presenta cada especie (p. ej. Mangialajo *et al.*, 2011; Cohu y Lemée, 2012). Por otro lado, esta estrategia es la mejor manera de evaluar las poblaciones naturales de dinoflagelados bentónicos mediante el uso de macroalgas, dado que diferentes especies de macroalgas albergan diferentes abundancias celulares de dinoflagelados bentónicos (Lobel *et al.*, 1988; Parsons *et al.*, 2012; Rains y Parsons, 2015; Yong *et al.*, 2018). Por tanto, la estrategia de seleccionar una única especie preferencial de macroalga puede resultar comprometida. Por otro lado, la discrepancia entre estudios también podría haber sido resultado del hecho de que Tester *et al.* (2014) agruparon todas las muestras procedentes de diferentes sitios, mientras que nuestro análisis abordó las posibles diferencias únicamente entre los sustratos recogidos de una localidad.

El nivel de correspondencia entre las abundancias celulares presentes en macroalgas y las que colonizaron los sustratos artificiales tras 24 h varió para cada género de dinoflagelado estudiado; las abundancias celulares de *Gambierdiscus* y *Prorocentrum* mostraron una fuerte relación lineal ($r^2=0,853$, $p=0,003$ y $r^2=0,807$, $p<0,001$, respectivamente), mientras que las de *Ostreopsis* y *Coolia* mostraron una relación más débil ($r^2=0,620$, $p=0,020$ y $r^2=0,440$, $p=0,051$, respectivamente). Tester *et al.* (2014) encontraron una relación similar para *Gambierdiscus* ($r^2=0,974$, $p<0,001$) y *Ostreopsis* ($r^2=0,709$, $p<0,001$), pero una relación más débil para *Prorocentrum* ($r^2=0,660$, $p<0,001$). La relación lineal

observada para *Ostreopsis* por Jauzein *et al.* (2018) fue aún más débil ($r^2=0,55$, $p<0,01$). Parsons *et al.*, (2021) observó una buena correlación para *Gambierdiscus* en muchas de las localidades muestreadas, aunque de nuevo estos autores no mostraron estos resultados en su estudio, lo que impide la comparación directa de sus resultados con los de otros estudios.

La razón de las diferencias observadas entre géneros en este y otros estudios podría estar relacionada tanto con las preferencias que cada género puede presentar por distintos sustratos como por sus estrategias para su colonización. En este sentido, aquellos géneros que son preferencialmente epífitos de macroalgas, por ejemplo, *Gambierdiscus* (Nakahara *et al.*, 1996; Parsons *et al.*, 2012), la colonización de los sustratos artificiales tendría lugar en gran medida a partir de macroalgas contiguas, por lo que se puede esperar una fuerte relación entre las abundancias celulares presentes en ambos sustratos. Sin embargo, se sabe que otros géneros, como es el caso de *Ostreopsis* pueden vivir asociados a diversos sustratos como rocas o arena (Parsons *et al.*, 2012; Totti *et al.*, 2010), o incluso estar presentes en la columna de agua (modo de vida ticoplanctónico) (Vila *et al.*, 2001; Aligizaki y Nikolaidis, 2006; Mangialajo *et al.*, 2011). Como resultado, la colonización de los sustratos artificiales provendría de poblaciones de distintos sustratos y no solo de las presentes en macroalgas. Por ejemplo, Jauzein *et al.*, (2016) estimaron que el porcentaje de células de *Ostreopsis* que colonizan los sustratos artificiales desde la columna del agua podría alcanzar el 5,4%. Este hecho explicaría la relación más débil encontrada entre las abundancias celulares presentes en las macroalgas y aquellas presentes en sustratos artificiales en el caso de géneros como *Ostreopsis* y *Coolia*. Así, los resultados obtenidos en este y otros estudios sugieren que, en hábitats bentónicos complejos, caracterizados por la presencia de diferentes sustratos a los que estos géneros pueden estar asociados, los sustratos artificiales proporcionarían estimaciones de abundancia celular integradas, es decir, que captarían un gran porcentaje de la variabilidad existente tras periodos de 24 h (Fig. S5). En contraposición a esto, las macroalgas siempre proporcionarían estimaciones de abundancia celular condicionadas por la especie o conjunto de especies seleccionadas en cada caso.

Debido a la presencia frecuente de células de *Ostreopsis* y *Coolia* en la columna de agua, los sustratos artificiales sólo se desplegaron durante condiciones de mar “en calma” o “relativa calma” para permitir su colonización de forma “natural” por parte de estos géneros ticoplanctónicos. De acuerdo con las observaciones realizadas en este estudio, las células de estos géneros son fácilmente resuspendidas en la columna de agua durante condiciones de alto movimiento del agua (oleaje, mar de fondo, corrientes, etc.), siendo “capturadas” de forma “no natural” o accidental por los sustratos artificiales (observaciones personales de los autores), lo que puede llevar a estimaciones erróneas (sobreestimaciones) de las abundancias celulares. Las diferencias en la manera en que las células llegan a los sustratos artificiales podrían ser también relevantes a la hora de realizar estimaciones de abundancia celular. Se ha observado por ejemplo que el género *Ostreopsis*, forma agregados celulares embebidos en matrices mucilaginosas o *mucus* sobre sus sustratos naturales, los cuales se desprenden bajo ciertas condiciones ambientales como altos niveles de movimiento del agua, quedando suspendidos a la deriva en la columna de agua o sobre la superficie (Mangialajo *et al.*, 2011). De esta forma, *Ostreopsis* podría colonizar los sustratos artificiales en forma de grupos y no de forma individualizada, dando lugar a grandes diferencias en la abundancia celular de este género entre sustratos contiguos y favoreciendo por tanto la sobreestimación de las abundancias celulares.

En este estudio, la fuerte relación ($r^2 > 0,8$) encontrada para *Gambierdiscus* y *Prorocentrum* entre las abundancias celulares presentes en ambos sustratos permiten el uso de los modelos de regresión lineal para convertir las estimaciones de abundancia celular obtenidas en estudios anteriores donde se emplearon macroalgas en estimaciones expresadas como células 100 cm^{-2} o viceversa. A pesar de que no se recomienda adoptar esta práctica de manera rutinaria, en el caso de *Gambierdiscus* y *Prorocentrum*, por el momento y hasta se adopte una metodología estandarizada definitiva, los modelos de regresión lineal permiten tener una aproximación en “células 100 cm^{-2} ” de los resultados de abundancia celular obtenidos en estudios anteriores como “células g^{-1} ” para su comparación. Por el contrario, la relación más débil observada para *Ostreopsis* y *Coolia* entre las abundancias celulares presentes en ambos

sustratos impiden el uso de los modelos de regresión lineal para este propósito. Sin embargo, desde el punto de vista de gestión, los modelos de regresión lineal deben utilizarse en todos los casos con precaución, ya que se observaron importantes diferencias de las relaciones \bar{X}_s/\bar{X}_m entre los sitios de muestreo. Por ejemplo, para *Gambierdiscus* la relación varió de 1/1 a 1/17. Esta consideración es particularmente importante, dado que algunas especies dentro de estos géneros son productores de potentes toxinas y responsables de síndromes humanos graves como la intoxicación por CP. De esta manera, el siguiente paso sería establecer niveles de concentración celular de alerta y de riesgo directamente a partir del uso de sustratos artificiales en programas de seguimiento. Sin duda, esto contribuirá a la toma de decisiones de gestión oportunas y correctas que garanticen la seguridad pública.

Bibliografía

Abbate, M., Bordone, A., Cerrati, G., Di Festa, T., Melchiorre, N., Pastorelli, A. M., Peirano, A., Petruzzelli, M. R., Ungaro, N., 2012. A new method for sampling potentially toxic benthic dinoflagellates. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 165 -170.

Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C., Totti, C., 2015. Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and macroalgae. *Harmful Algae* 49, 147 - 155.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717 - 730.

Berdalet, E., Bravo, I., Evans, J., Fraga, S., Kibler, S., Kudela, R.M., Larsen, J., Litaker, W., Penna, A., Tester, P., Vila, M., 2012. GEOHAB Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, pp. 64. <https://doi.org/>

Bomber, J.W., Aikman, K.E., 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6, 291 - 311.

Bravo, I., Rodríguez, 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.

Bravo, I., Rodríguez, F., Ramilo, I., Afonso-Carrillo, J., 2020. Epibenthic harmful marine dinoflagellates from Fuerteventura (Canary Islands), with special reference to the ciguatoxin-producing *Gambierdiscus*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(11), 909.

Callow, M. E., Callow, J. A., 2002. Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*, 49(1), 1 - 5.

Catania, D., 2017. The Influence of Macroalgae on the Proliferation and Regulation of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms. HAL Id: tel-01682210. Universit. Cote d'Azur - cole Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliqués Unit.

Chinain, M., Gatti, C. M. I., Darius, H. T., Quod, J. P., Tester, P. A., 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae*, 102, 101873.

Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 53, 373 - 380.

Cruz-Rivera, E., Villareal, T. A., 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae* 5, 497 - 525.

David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., Orive, E., 2020. *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *European journal of phycology*, 55(1), 76 - 88.

Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., Okolodkov, Y. B., 2019. A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America. *Frontiers in Marine Science*, 6, 148.

Edler, L., Elbrächter, M., 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microsc. Mol. Methods Quant. Phytoplankt. Anal.* 13 - 20.

Faust, M.A., 2009. Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef mangrove ecosystem, Belize. *Atoll Res. Bull.* 1 - 32.

Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., Zapata, M., 2008. *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of phycology*, 44(4), 1060 - 1070.

Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogéne, 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., Bravo, I., Zapata, M., Marañón, E., 2012. Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogam. Algol.* 33, 171 - 179.

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. *Ann. Anat.* 165, 839 - 853.

Fritz, L., Triemer, R. E. 1985. A rapid simple technique utilizing calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21:662-4.

Hallegraeff, G., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol. Rev. Phylogica* 32, 79 - 99.

Hoppenrath, M., Chomérat, N., Horiguchi, T., Schweikert, M., Nagahama, Y., Murray, S., 2013. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae) - a proposal and review. *Harmful Algae* 27, 1 - 28.

Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates-unveiling their worldwide biodiversity. *Schweizerbart Science Publishers*. 276 pp.

Hoppenrath, M., Kretzschmar, A. L., Kaufmann, M. J., Murray, S. A., 2019. Morphological and molecular phylogenetic identification and record verification of *Gambierdiscus excentricus* (Dinophyceae) from Madeira Island (NE Atlantic Ocean). *Marine Biodiversity Records*, 12(1), 1 - 9.

Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 300 - 304.

Jauzein, C., Araf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., Abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116 - 127.

Kaufmann, M., Böhmer-Beck, M., 2013. *Gambierdiscus* and related benthic dinoflagellates from Madeira archipelago (NE Atlantic). *Harmful Algae News* 47, 18 - 19.

Lassus, P., Chomérat, N., Hess, P., Nézan, E., 2016. Toxic and harmful microalgae of the World Ocean. UNESCO.

Lobel, P.S., Anderson, D.M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of ciguatera dinoflagellate populations: sample variability and algal substrate selection. *Biol. Bull.* 175 (1), 94.

Kingsford, M., Battershill, C., 1998. *Studying Temperate Marine Environments: A Handbook for Ecologists*. Canterbury University Press, Christchurch, New Zealand.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneoovietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Maria, A., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, 408 - 420.

Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemée, R., 2017. Benthic dinoflagellate integrator (BEDI): a new method for the quantification of benthic harmful algal blooms. *Harmful Algae* 64, 1 - 10.

Mehdipour, N., Gerami, M.H., Nemati, H., Rahnama, R., Hamzeshpour, A., 2015. Spatial and temporal variation of macroalgae along the southern coasts of the Caspian Sea relating to environmental parameters. *J. Persian Gulf* 6, 65 - 73.

Morton, S.L., Faust, M.A., 1997. Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bull. Mar. Sci.* 61, 899 - 906.

Nakahara, H., Sakami, T., Chinain, M., Ishida, Y., 1996. The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 44, 113 - 117.

Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hiram, M., Ishihara, Y., Molg., J., Botana, L.M., 2010. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Archipelago (Europe). *Anal. Chem.* 82, 6032 - 6039.

Parsons, M. L., Settlemier, C. J., Bienfang P. K., 2010. A simple model capable of simulating the population dynamics of *Gambierdiscus*, the benthic dinoflagellate responsible for ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae* 10: 71 - 80.

Parsons, M. L., Settlemier, C. J., Ballauer, J. M., 2011. An examination of the epiphytic nature of *Gambierdiscus toxicus*, a dinoflagellate involved in ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae* 10, 598 - 605.

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.

Parsons, M. L., Brandt, A. L., Ellsworth, A., Leynse, A. K., Rains, L. K., Anderson, D.M., 2017. Assessing the use of artificial substrates to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys. *Harmful Algae* 68, 52 - 66.

Parsons, M. L., Richlen, M. L., Smith, T. B., Solow, A. R., Anderson, D. M., 2021. Evaluation of 24-h screen deployments as a standardized platform to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys and US Virgin Islands. *Harmful algae*, 103, 101998.

Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riob., P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *J. Biogeogr.* 37, 830 - 841.

Pérez-Arellano, J. L., Luzardo, O. P., Brito, A. P., Hernández-Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R. W., Boada, L. D., 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 11 - 12.

Rains, L.K., Parsons, M.L., 2015. *Gambierdiscus* species exhibit different epiphytic behaviors toward a variety of macroalgal hosts. *Harmful Algae* 49, 29 - 39.

Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S., 2011. Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI UNESCO y OIEA, pp. 59.

Richlen, M.L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston atoll, Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 51 - 66.

Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R.I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae* 67, 131 - 143.

Rodríguez, F., Riobó, P., Crespín, G. D., Daranas, A. H., de Vera, C. R., Norte, M., Fernández, J. J., Fraga, S., 2018. The toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum maculosum* Faust is a synonym of *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. *Harmful algae*, 78, 1-8.

Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae* 32, 1 - 10.

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algae News* 14 - 16.

Tester, P.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Usup, G., Vandersea, M.W., Leaw, C.P., Teen, L.P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M.A., Litaker, R.W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8 - 25.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233 - 239.

Tudó, À., Gaiani, G., Rey Varela, M., Tsumuraya, T., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Campas, M., Diogène, J., 2020. Further advance of *Gambierdiscus* Species in the Canary Islands, with the First Report of *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins*, 12(11), 692.

Tuya, F., Haroun, R.J., 2006. Spatial patterns and response to wave exposure of shallow water algal assemblages across the Canarian Archipelago: a multi-scaled approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M. A., Turki, S., Açaf, L., Abboud-Abi Saab, M., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecological Indicators*, 85, 1092 - 1100.

Vila, M., Garcés, E., Mas, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 51–60.

Wakeman, K.C., Yamaguchi, A., Roy, M.C., Jenke-Kodama, H., 2015. Morphology, phylogeny and novel chemical compounds from *Coolia malayensis* (Dinophyceae) from Okinawa, Japan. *Harmful Algae* 44, 8–19.

Yasumoto, T., Adachi, R., Bagnis, R., Fujimoto, K., Fukuyo, Y., Inoue, A., Ochi, T., Oshima, Y., 1980. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 1397–1404.

Yong, H.L., Mustapa, N.I., Lee, L.K., Lim, Z.F., Tan, T.H., Usup, G., Gu, H., Litaker, R.W., Tester, P.A., Lim, P.T., Leaw, C.P., 2018. Habitat complexity affects benthic harmful dinoflagellate assemblages in the fringing reef of Rawa Island, Malaysia. *Harmful Algae* 78, 56–68.

Material suplementario

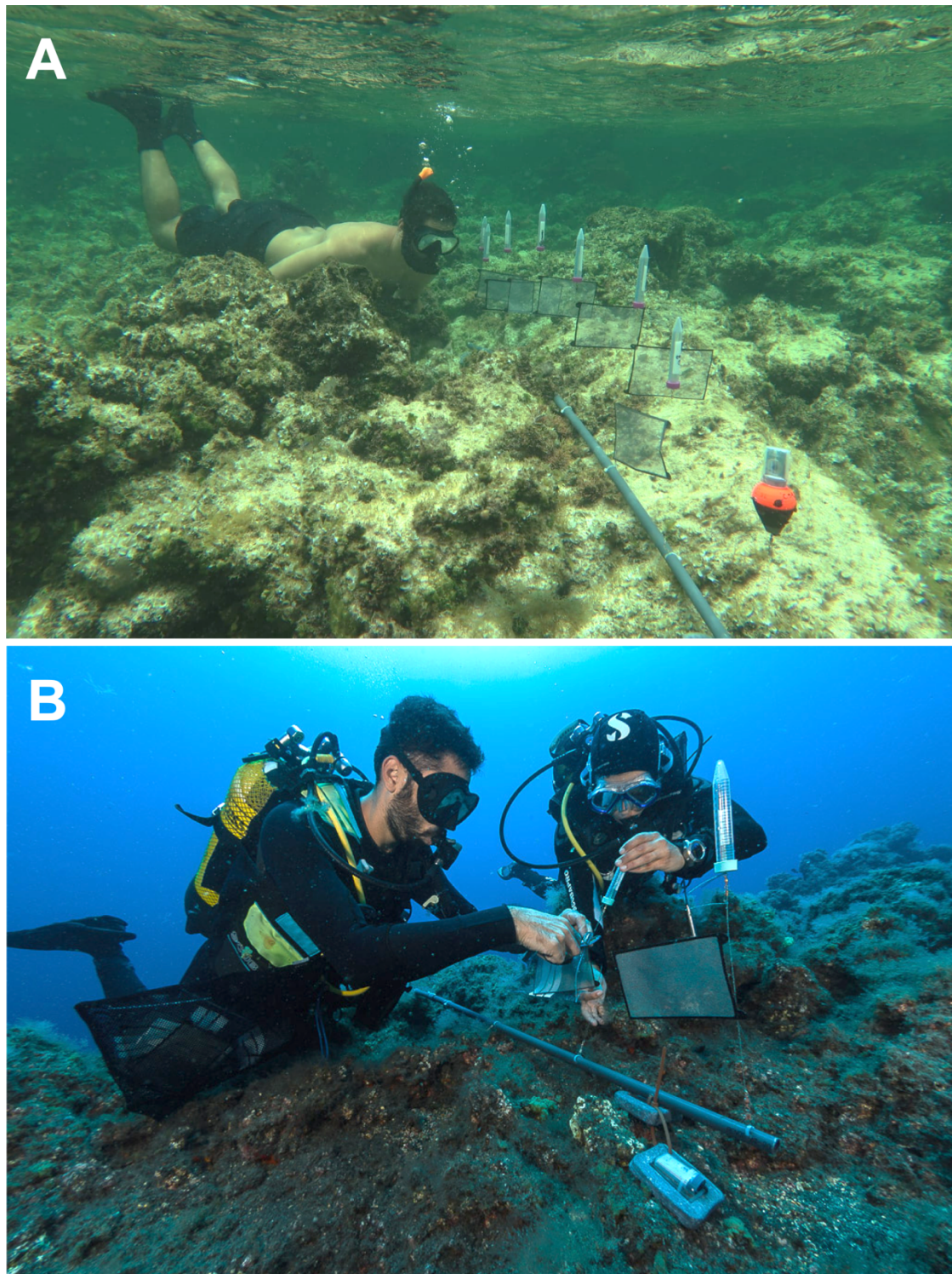


Figura S1. Recogida de sustratos artificiales en una zona somera (<math>< 5\text{ m}</math>) mediante *snorkel* (A) y en una zona profunda (>5 m) mediante el uso equipos de buceo autónomo (B).

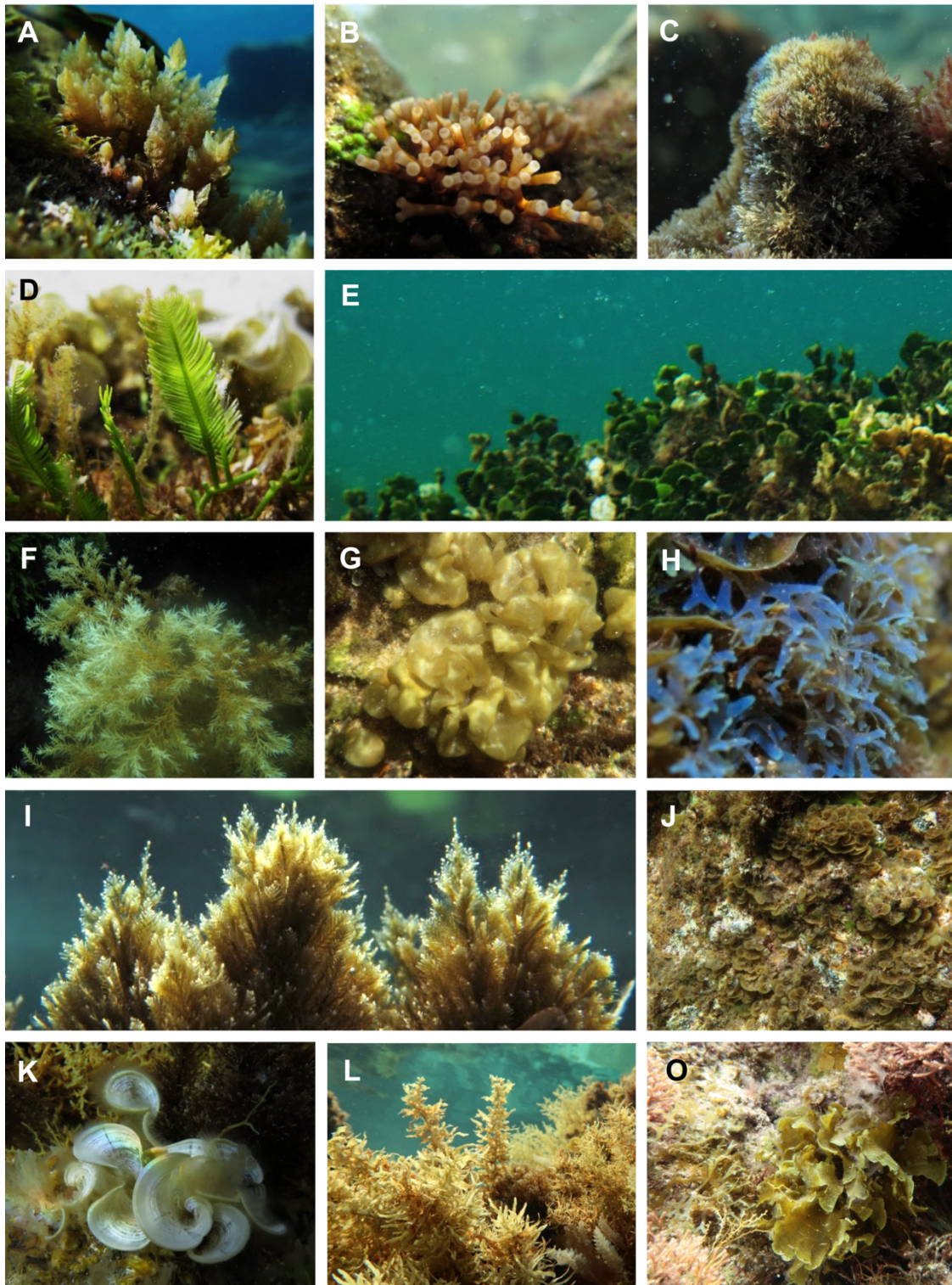


Figura S2. Especies de macroalga muestreadas en este estudio. Rhodophyta: **(A)** *Asparagopsis taxiformis*, **(B)** *Galaxaura rugosa*, **(C)** *Jania rubens*. Chlorophyta: **(D)** *Caulerpa sertularioides*, **(E)** *Halimeda tuna*. Ochrophyta: **(F)** *Cystoseira humilis*, **(G)** *Colpomenia sinuosa*, **(H)** *Dictyota* spp., **(I)** *Halopteris scoparia*, **(J)** *Lobophora schneideri* (nombrada como *L. variegata* en Fernández-Zabala et al., 2019), **(K)** *Padina pavonica*, **(L)** *Sargassum filipendula* y **(O)** *Zonaria tournefortii*.

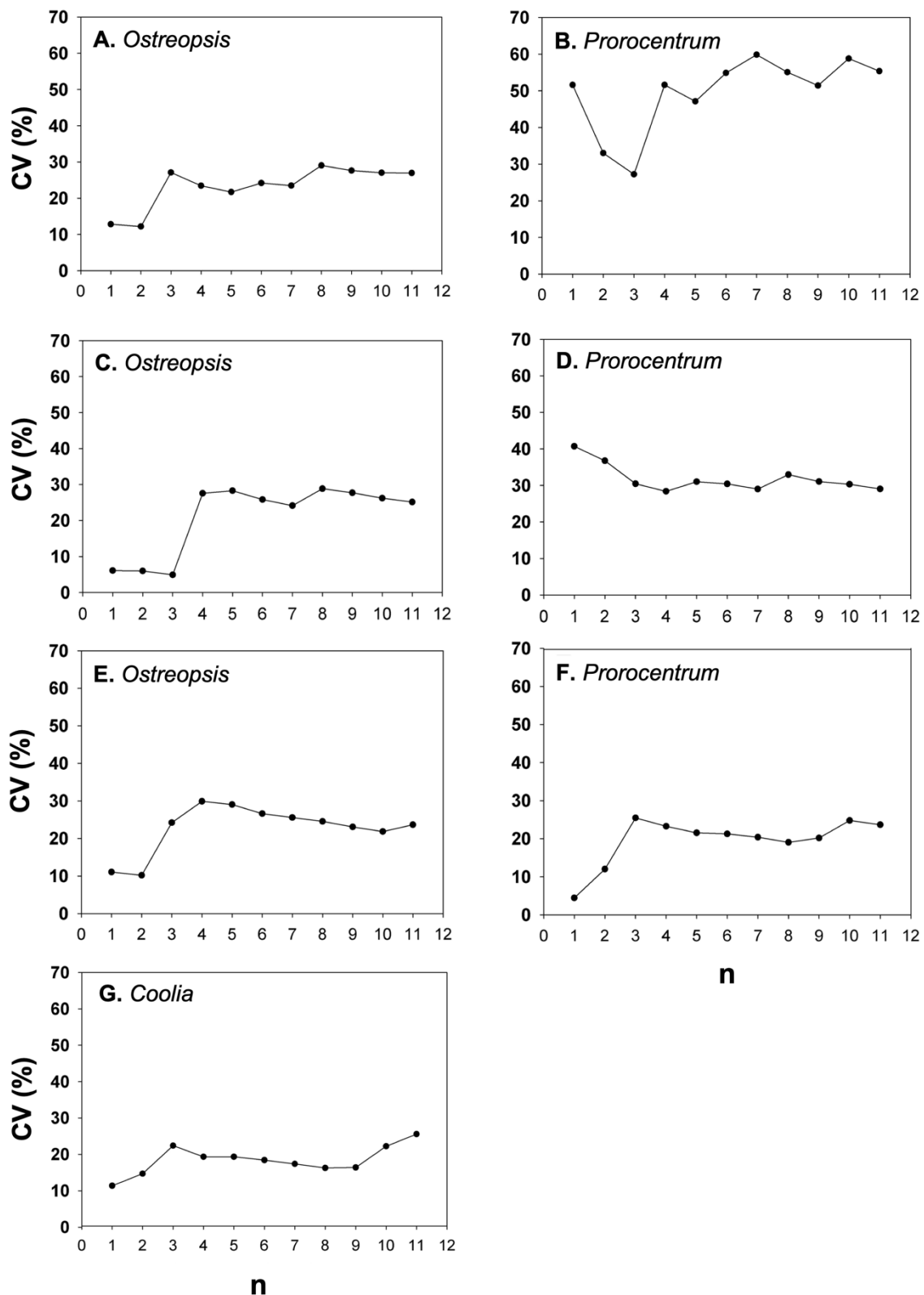


Figura S3. Cambios en el CV (%) de la concentración celular de 3 géneros de dinoflagelados BHAB con el aumento de las réplicas en tres hábitats: **(A-B)** fondo arenoso en Taliarte (localidad 3, Gran Canaria, Islas Canarias); **(C-D)** manto mixto de macroalgas en la bahía de Taliarte (localidad 4, Gran Canaria, Islas Canarias) y **(E-G)** manto mixto de macroalgas y coral en la bahía de Salamansa (localidad 8, São Vicente, Cabo Verde)

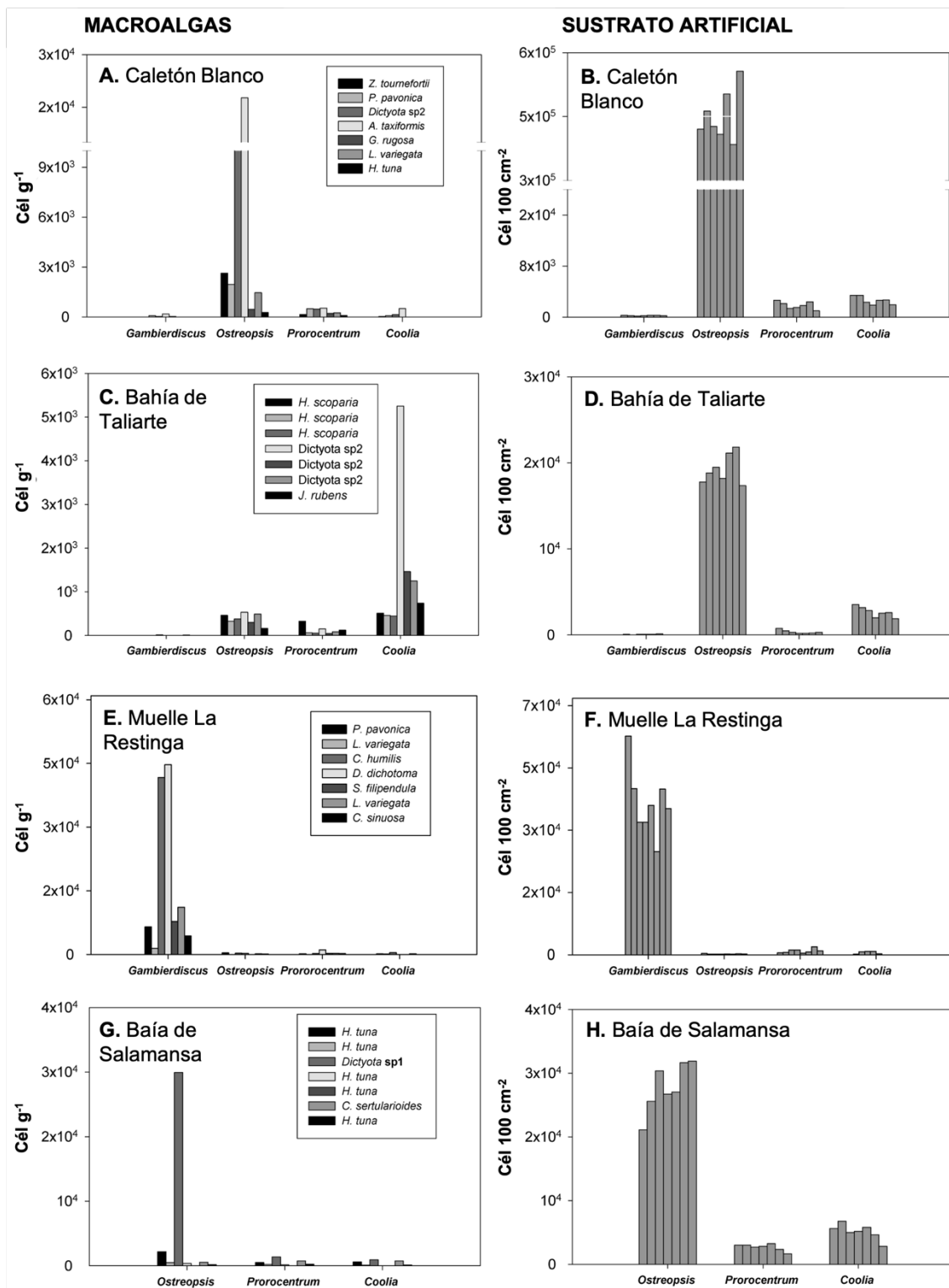


Figura S4. Concentraciones celulares de los géneros de dinoflagelados Bhab investigados en este estudio sobre diferentes especies de macroalgas (células g^{-1}) (A, C, E y G) y sustratos artificiales (células 100 cm^{-2}) (B, D, E y F) en (A y B) Caletón Blanco (localidad 1); (C y D) bahía de Taliarte (localidad 4); (E y F) Puerto de La Restinga (localidad 7) y (G y H) baía de Salamansa (localidad 8) con $n=7$.

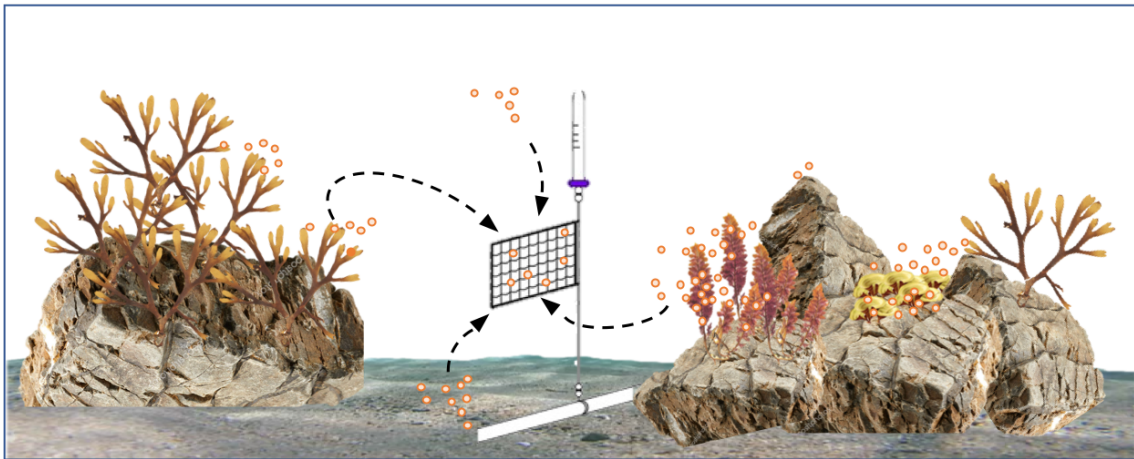


Figura S5. Representación esquemática que muestra la integración de la variabilidad presente en los hábitats bentónicos en un sustrato artificial cuando este es colonizado por poblaciones de dinoflagelados BHAB que provienen de diferentes sustratos abióticos y bióticos tras un periodo de 24 h.

CAPÍTULO

3

DISTRIBUCIÓN EN PROFUNDIDAD DE DINOFLAGELADOS EPIBENTÓNICOS POTENCIALMENTE NOCIVOS DEL SUR DE LA ISLA DE EL HIERRO, ISLAS CANARIAS

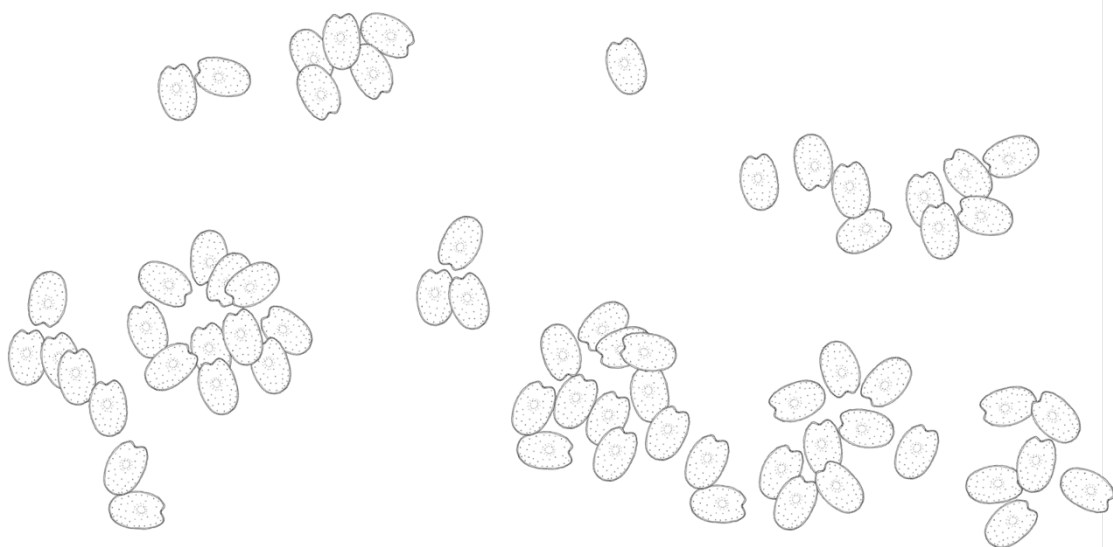


Ilustración realizada por Stein (1878) para la descripción de *Protocentrum lima*.

[El capítulo 3 ha sido publicado como: Fernández-Zabala, J., Amorim, A., Tuya, F., Herrera, R., Soler-Onís, E., 2022. Playing hide and seek: Distribution with depth of potentially harmful epibenthic dinoflagellates of Southern El Hierro Island, Canary Islands (NE Atlantic). *Harmful Algae*, 117, 102271., <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102271>]

Resumen del capítulo

El estudio de las comunidades de dinoflagelados epibentónicos formadores de proliferaciones algales potencialmente nocivas (BHABs) se realiza de forma habitual en hábitats bentónicos situados en los primeros metros de la franja infralitoral (0 - 5 m), mientras que su estudio en hábitats más profundos (> 5 m) es menos frecuente. En el presente capítulo se investigó la distribución con la profundidad de cinco géneros de dinoflagelados BHAB (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Amphidinium*) en el sur de la isla de El Hierro (Islas Canarias, España). El muestreo conllevó el uso de un sustrato artificial estandarizado en tres niveles de profundidad (5, 10 y 20 m), los cuales fueron visitados en tres épocas diferentes a lo largo de un año. Durante el muestreo se evaluó además la influencia de tres factores abióticos relacionados con la profundidad, es decir, la luz, el movimiento del agua y la temperatura del agua, en la distribución vertical y estacional de la comunidad de dinoflagelados BHAB. Como resultado, se observaron dos patrones de distribución vertical consistentes a lo largo del tiempo: las abundancias celulares de *Ostreopsis* y *Coolia* disminuyeron de 5 a 20 m, mientras que las abundancias celulares de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* mostraron el patrón inverso, aunque en este caso sólo se observaron diferencias significativas entre 5 y 10 - 20 m de profundidad. En abril, dos géneros de este último grupo, *Gambierdiscus* y *Amphidinium*, estuvieron incluso ausentes a 5 m de profundidad. Los parámetros ambientales registrados permitieron explicar un alto porcentaje de la distribución observada. En particular, los enfoques estadísticos de selección de modelos indicaron que el movimiento del agua fue el parámetro más significativo. El análisis del género *Gambierdiscus* reveló la presencia de cuatro especies en el área de estudio: *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus* y *G. excentricus*. La especie *G. excentricus*, observada en este estudio por primera vez en la isla de El Hierro, mostró una distribución vertical y estacional más restringida en comparación con las otras especies, lo que puede explicar que no haya sido detectada en estudios anteriores llevados a cabo en la isla. Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto la importancia de considerar un rango de profundidad más amplio y diferentes estaciones del año a la hora de investigar la ecología de dinoflagelados BHAB y de evaluar su riesgo e impacto sobre la salud humana y el medio ambiente en las Islas Canarias. Sólo de esta manera se podrán implementar programas de seguimiento eficientes en esta región y a nivel global en las zonas afectadas por proliferaciones de dinoflagelados BHAB.

1. Introducción

En las últimas décadas, los estudios sobre dinoflagelados bentónicos potencialmente nocivos o BHAB (del inglés *Benthic Harmful Algal Bloom*) han experimentado un notable incremento. Esto es debido principalmente a la aparente expansión del área de distribución de estos organismos desde zonas tropicales a zonas más templadas y de los impactos asociados a sus proliferaciones, en las que se producen toxinas o mucílagos, o ambos, que pueden actuar afectando a la salud humana y al medio ambiente (Berdalet *et al.*, 2017; Hallegraeff *et al.*, 2021; Chinain *et al.*, 2021).

A diferencia de sus homólogos planctónicos, que viven libremente en la columna de agua, los dinoflagelados BHAB desarrollan sus ciclos de vida, o parte de ellos, en ambientes bentónicos estructuralmente muy complejos, caracterizados por la presencia de diversos sustratos (macroalgas, rocas, coral, arena, fanerógamas marinas, etc.) a los que estos organismos se encuentran asociados (GEOHAB, 2012). Por este motivo, el muestreo de dinoflagelados BHAB se realiza habitualmente mediante la recogida manual bajo el agua de sus sustratos hospedadores más comunes, es decir, especies concretas de macrófitos que albergan las mayores abundancias celulares de estos organismos (Lobel *et al.*, 1988). En este sentido, los hábitats situados en los primeros metros de la franja infralitoral (0 - 5 m) tienen la ventaja de facilitar las labores de muestreo, ya que en general albergan diferentes especies de macrófitos, incluyendo aquellas especies preferentes, y en ellos su selección y recogida es sencilla sin necesidad de usar equipamientos especiales tales como equipos de buceo autónomo (SCUBA). En consecuencia, la mayor parte del conocimiento sobre la ecología y el seguimiento de estos organismos se basa en estudios realizados en zonas someras y, por tanto, la relevancia que podrían tener zonas más profundas para alojar hábitats adecuados para el desarrollo de las comunidades de estos organismos permanece siendo hasta la fecha en gran medida desconocida. Sin embargo, la profundidad afecta a una serie de factores ambientales bióticos y abióticos diferentes, tales como la luz, la temperatura del agua, el movimiento del agua, la concentración de nutrientes, la salinidad o la distribución de las macroalgas, los cuales se sabe que influyen en la abundancia celular y la

distribución de los dinoflagelados BHAB (Parsons *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2020). Normalmente, en una misma área, las zonas poco profundas se caracterizan por presentar hábitats altamente variables como consecuencia de su exposición a la acción de ciertos estresores físicos como, por ejemplo, oleaje o altos niveles de intensidad lumínica, mientras que las zonas más profundas suelen presentar condiciones más suaves y estables (p. ej. Tuya *et al.*, 2007). Debido a la existencia de requisitos de hábitat específicos de las especies de dinoflagelados, algunas de ellas podrían encontrar condiciones de crecimiento más adecuadas en zonas más profundas, que actuarían como áreas de refugio frente a las condiciones presentes cerca de la superficie (Tester *et al.*, 2020). En los últimos años, los estudios ecológicos en zonas más profundas de la franja infralitoral (>5 m) han experimentado un ligero aumento gradual, aunque en la actualidad estos pueden todavía considerarse escasos. Algunos de estos estudios simplemente han evidenciado la presencia de dinoflagelados BHABs en zonas profundas (p. ej., Villareal *et al.*, 2007 o Tester *et al.*, 2013), mientras que otros han ido más allá, investigado la existencia de patrones de distribución vertical (p. ej., Cohu y Lemée, 2012 o Boisnoir *et al.*, 2018). Sin duda, la comprensión de estos patrones podría tener una gran repercusión en los programas de seguimiento, ya que mejoraría la detección y la estimación de la abundancia celular de especies potencialmente tóxicas. Sin embargo, el reducido número de estudios realizados hasta el momento, junto con algunos resultados contradictorios obtenidos entre estos, ha impedido alcanzar un consenso sobre la distribución vertical de dinoflagelados BHAB (Tester *et al.*, 2020).

En los últimos años, se han realizado un número considerable de estudios sobre la diversidad y distribución de dinoflagelados BHABs en las Islas Canarias (Fraga *et al.* 2008, 2011; Fraga y Rodríguez, 2014; Soler-Onís *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2017, 2018; Bravo *et al.*, 2019, 2020; David *et al.*, 2020; Tudó *et al.*, 2020). La mayor parte de las investigaciones se han centrado en el género *Gambierdiscus* Adachi y Fukuyo debido a su ya evidenciada implicación en los casos de intoxicación por ciguatera (CP) documentados en la región desde el año 2004 (Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Boada *et al.*, 2010; Núñez *et al.*, 2012). Estos estudios se han basado de manera sistemática en muestras recogidas en

zonas costeras someras y, por tanto, el conocimiento sobre la biodiversidad, abundancia celular y distribución de este género en el archipiélago ha permanecido, como sucede en otras zonas del mundo, básicamente limitado a los primeros metros de la franja infralitoral. Sin embargo, en las Islas Canarias es posible alcanzar grandes profundidades muy cerca de la costa, especialmente en las islas geológicamente más jóvenes, en las que la plataforma insular es generalmente estrecha (Tenerife, La Palma y El Hierro) descendiendo bruscamente hasta fondos situados a más de 1000 m. Aunque los hábitats situados en zonas más profundas de la franja infralitoral resultan menos accesibles para su estudio que los situados inmediatamente bajo la superficie, las condiciones que estos presentan podrían resultar adecuadas para albergar importantes comunidades de dinoflagelados BHAB, como las de *Gambierdiscus* spp. y, por esta razón, no deberían ser ignorados durante la evaluación de la diversidad, la abundancia celular y la distribución de estos organismos en las Islas Canarias.

Por todo ello, en el presente capítulo se investigó la distribución vertical y la dinámica temporal de la comunidad de dinoflagelados BHABs de acuerdo a importantes parámetros físicos asociados con la profundidad en el sur de El Hierro, la isla más joven (ca. 0,9 Ma) y aislada de las Islas Canarias. Las conclusiones derivadas de este estudio contribuyen a mejorar la detección y estimación celular de los dinoflagelados BHAB para una mejor evaluación de los riesgos asociados a sus proliferaciones en la región, al mismo tiempo que ayudan a clarificar los patrones ecológicos de estos organismos a través de gradientes verticales (de profundidad) a escala global.

2. Material y métodos

2.1. Área de estudio y diseño del muestreo

Este estudio se llevó a cabo en la parte suroeste de la isla de El Hierro, la isla más occidental y aislada de las Islas Canarias (Fig. 1A y B). El muestreo se realizó en una localidad dentro de la zona de la reserva marina de "Punta de La Restinga - Mar de Las Calmas" conocida como "Punta de Los Saltos" (27° 38' 15' N, 17° 59' 18' O); un lugar situado a aproximadamente 100 m de la costa (Fig.1C). La zona donde se sitúa la reserva marina se caracteriza por presentar aguas oligotróficas templado-cálidas, con una temperatura que oscila entre los 19 °C en marzo-abril y los 26 °C en septiembre-octubre. La situación geográfica de esta zona le confiere una protección de los vientos alisios del NE y de las corrientes dominantes en el archipiélago durante la mayor parte del año, excepto en invierno, cuando las borrascas atlánticas se acercan a las islas produciendo oleaje del NO (Braun y Molina, 1988). La zona también se caracteriza por la escasez de lluvias debido a la limitada influencia de los vientos alisios en el sur de la isla, lo que contrasta con la vertiente norte, donde éstos tienen una mayor influencia y producen lluvias horizontales. Este hecho hace que las escorrentías sean poco frecuentes en las aguas costeras del sur y, por tanto, la influencia del agua dulce en el área de estudio puede considerarse insignificante. El fondo marino está formado en su mayoría por repisas basálticas hasta una profundidad de 20 - 25 m, a partir de la cual aparecen grandes llanuras de arena negra con algunas zonas rocosas dispersas.

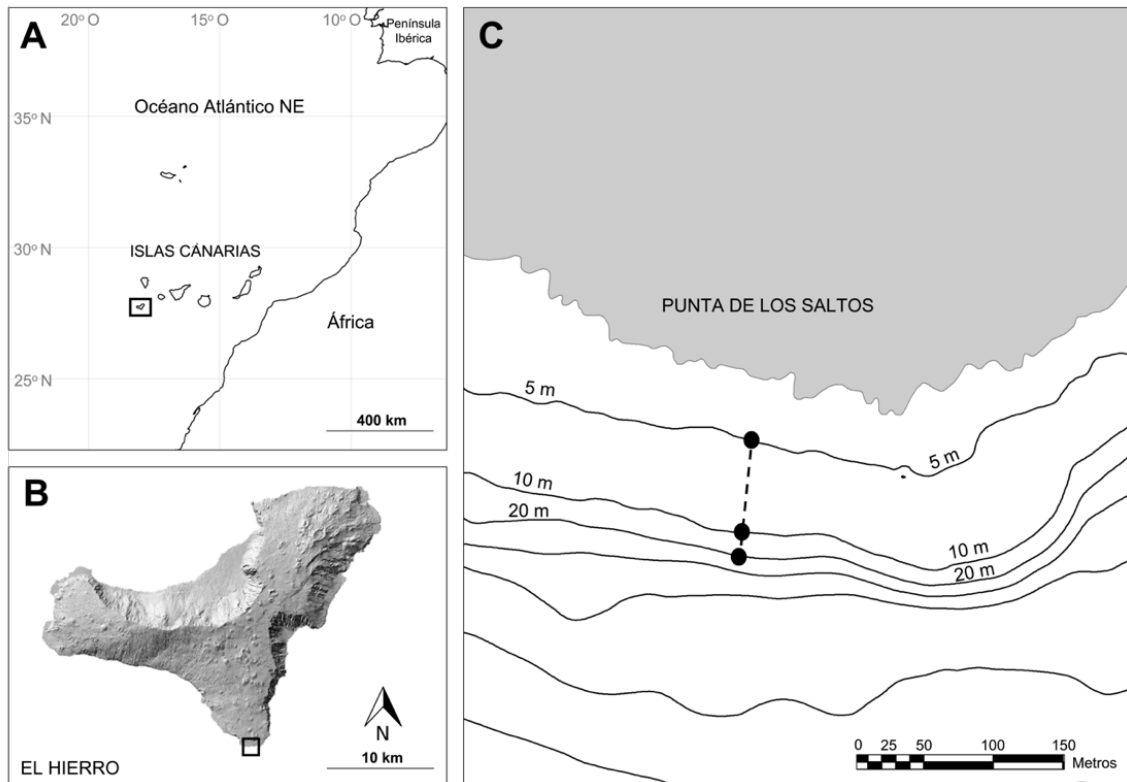


Figura 1. Localización del lugar de estudio incluyendo: **(A)** la posición de las Islas Canarias en el Océano Atlántico, **(B)** la localización del área de muestreo en el sur de la isla de El Hierro y **(C)** transecto vertical en el que se establecieron tres niveles de profundidad (5, 10 y 20 m).

Los fondos rocosos de la zona están cubiertos por una extensión continua, diversa y bien conservada de macroalgas. La primera sección de la franja infralitoral (0 - 10 m) está dominada por la especie *Lobophora schneideri* Vieira (Dictyotales, Dictyotaceae). Esta especie presenta una cobertura media aproximada del 70%, que a veces puede superar el 90%. Otras especies que aparecen asociadas a *L. schneideri* son *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss, *Dictyota* spp., *Canistrocarpus cervicornis* (Kützting) De Paula y De Clerck, *Ellisolandia elongata* (Ellis y Solander) Hind y Saunders, *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan y *Pseudochlorodesmis furcellata* (Zanardini) Børgesen. Estas especies presentan a menudo una distribución irregular (Fig. 2A y B). En la sección más profunda de la franja infralitoral superior considerada en el presente estudio (10 - 20 m), la comunidad de macroalgas está dominada por *L. schneideri*, *Lophocladia trichoclados* Schmitz y *Dasya baillouviana* (S.G.

Gmelin) Montagne. Esta comunidad es común en zonas con baja exposición al oleaje. Otras especies comunes en esta sección son *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Dictyota* spp., *C. cervicornis*, *Sebdenia canariensis* Soler-Onís, Haroun, Viera-Rodríguez y Prud'homme ex Gabriel y Fredericq o *Sebdenia dichotoma* Berthold (Fig. 2C). La comunidad de macroalgas presente en esta zona se mantiene estable en términos de abundancia y diversidad a lo largo del año (Betancor *et al.*, 2014). Esta característica fue uno de los criterios utilizados en la selección del lugar de muestreo para reducir el posible factor de confusión que podría suponer la variabilidad estacional de la comunidad de macroalgas en la hipótesis de estudio.

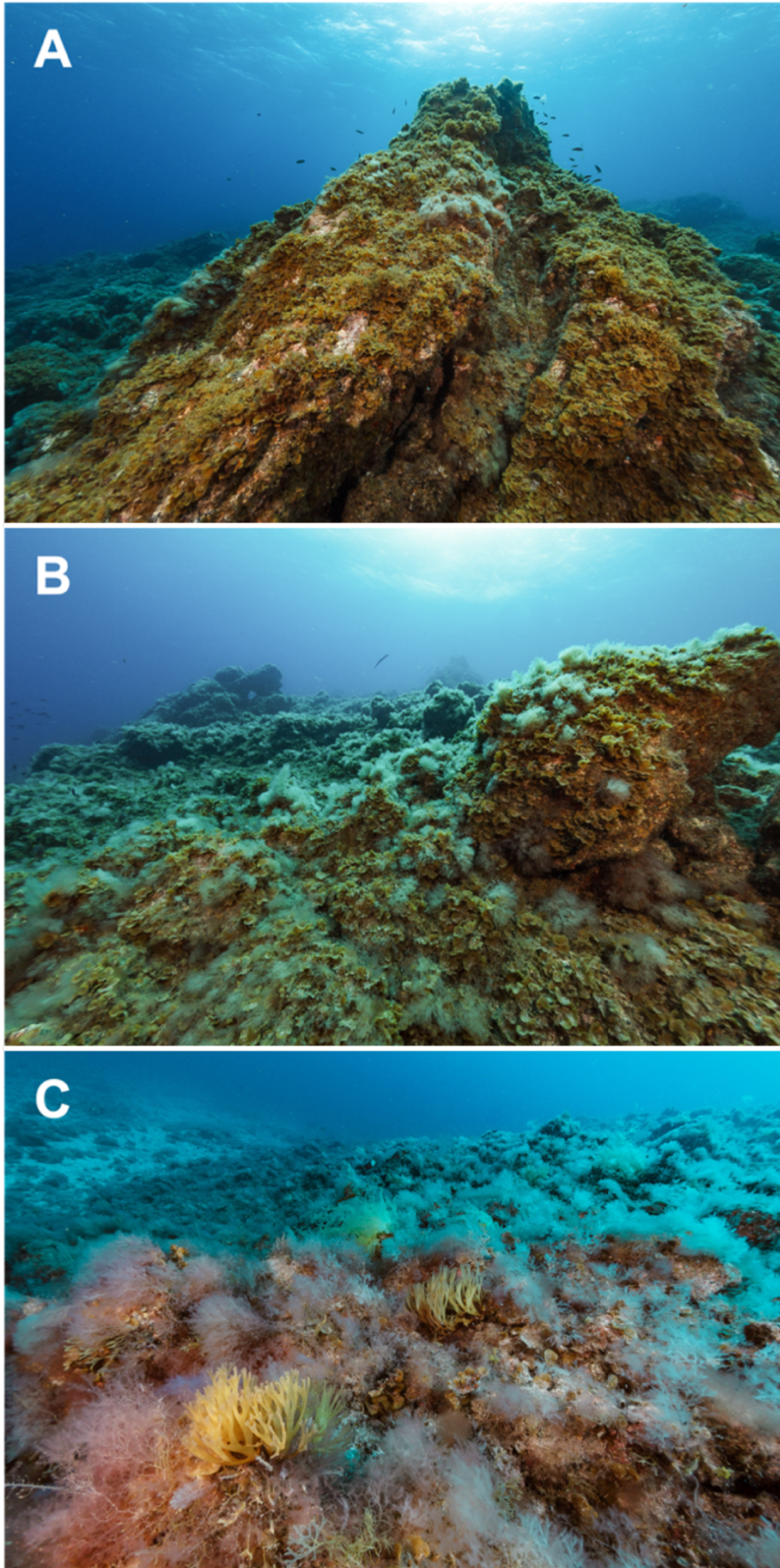


Figura 2. Comunidades de macroalgas presentes a **(A)** 5 m, **(B)** 10 m y **(C)** 20 m de profundidad en el lugar de estudio.

Los muestreos se realizaron en abril, agosto y noviembre de 2017. Estos meses fueron seleccionados para evaluar la hipótesis de estudio bajo condiciones ambientales lo más contrastadas posible. Bajo el agua, se siguió siempre el mismo procedimiento experimental. El muestreo se realizó en tres profundidades de 5, 10 y 20 m sobre un transecto de aproximadamente 100 m de longitud (Fig. 1C), el cual fue visitado de manera repetida durante todo el estudio. El muestreo de dinoflagelados BHAB se llevó a cabo mediante el método de sustrato artificial consistente en redes de fibra plástica con marco de plástico evaluado en el capítulo 2. En cada nivel de profundidad, se dispusieron 8 réplicas de este sustrato; 7 para el estudio cuantitativo y 1 para la evaluación de la biodiversidad. Las réplicas fueron fijadas a una barra de plástico situada en posición paralela a la costa. Después de 24 horas de exposición, las réplicas se recogieron cuidadosamente y se introdujeron de forma individual junto con el agua circundante en bolsas de plástico con cierre *zip* (ver la sección “Material y métodos” del capítulo 2 para más detalles). En cada profundidad y tiempo se recogió, además, una muestra de macroalgas cerca de los sustratos artificiales como referencia para evaluar el éxito de la colonización de los géneros de dinoflagelados BHAB objeto de estudio desde las macroalgas a las redes de fibra plástica. Las muestras obtenidas para el estudio cuantitativo se fijaron de forma inmediata con formaldehído al 4% en agua de mar, mientras que las muestras obtenidas de la octava réplica para la evaluación de la biodiversidad se mantuvieron vivas.

En todos los casos, se instalaron registradores de datos digitales HOBO Pendant® Temperature/Light y G junto a los sustratos artificiales para medir, respectivamente, la temperatura del agua de mar (°C) y la luz (lux) cada 15 minutos, y el movimiento del agua ($m \cdot s^{-2}$) cada minuto durante 24 h. Los registradores de datos de temperatura/luz se fijaron al fondo marino posicionados en dirección a la superficie. Los registradores de datos G se colocaron en la parte superior de flotadores de pesca de 50 g de peso, que a su vez se fijaron a la barra de plástico mediante un hilo de *nylon* giratorio, quedando de esta manera suspendidos en la columna de agua de manera similar a redes de fibra plástica (ver Fig. 2B del capítulo 2).

2.2. Procesamiento de las muestras, identificación de las especies de dinoflagelados BHAB y recuento celular

Una vez en el laboratorio, las muestras vivas se procesaron de manera inmediata para poder establecer cultivos monoclonales de dinoflagelados. A pesar de que se aislaron especímenes de todos los géneros, en el presente trabajo sólo se discuten los datos relativos a las especies del género *Gambierdiscus*. Las células de dinoflagelados se aislaron bajo un microscopio invertido LEICA DMI3000 B (LEICA, Alemania), tras lo cual se transfirieron de manera individual a un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con medio de cultivo f/10 (a base de agua de mar filtrada). A continuación, las placas de cultivo se incubaron a 22 - 24 °C, bajo un ciclo de luz:oscuridad de 8:16 h, con luz fluorescente blanca y una tasa de flujo de fotones de 10 - 40 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cuando los pocillos alcanzaron un número suficiente de células (~ 100 células), estos se transfirieron a placas Petri de vidrio (Anumbra®) de 6 cm de diámetro con 20 ml del medio de cultivo que se mantuvieron en las mismas condiciones de laboratorio. Para evitar cualquier forma teratológica, las células se extrajeron de los pocillos tan pronto como el cultivo alcanzó un número suficiente de estas que permitiera llevar a cabo su análisis morfológico con un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JSM-6380 LV (JEOL, Japón). Para ello, las células se preservaron añadiendo formaldehído (4%) al medio de cultivo, se concentraron en filtros de membrana de policarbonato Isopore™ (diámetro: 13 mm, tamaño de poro: 5 μm , Millipore®, Irlanda) mediante filtración suave, se enjuagaron en agua destilada y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (10, 30, 60, 80 y 100%) durante 10 minutos cada una. A continuación, los filtros se montaron en un portafiltros (Sigma-Aldrich, Alemania), se secaron durante una noche a 50 °C y se recubrieron con oro-paladio utilizando un metalizador Polaron E5000 (Polaron PLC, Reino Unido).

Para investigar más a fondo la diversidad de las especies del género *Gambierdiscus*, se realizaron también análisis moleculares a partir de los cultivos monoclonales. Para ello, las células se concentraron por centrifugación (13000 rpm) utilizando una centrífuga MiniSpin® (Eppendorf, EE.UU.). El ADN genómico

se extrajo utilizando un kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región D1 - D3 de la subunidad larga (LSU) del ADN ribosomal en un termociclador BioRad® T100 (BioRad, Francia) utilizando un *mastermix* para PCR (Takara Bio, Japón) y los cebadores D1R - LSUB (Scholin *et al.*, 1994; Litaker *et al.*, 2003) para un volumen de reacción final de 25 µl. El protocolo de PCR consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto; y un paso final de elongación a 72 °C durante 10 segundos. Los productos de PCR se purificaron con un kit de purificación QIAquick® (Quiagen, Alemania). Los productos purificados se enviaron para su secuenciación (Macrogen, Madrid, España). Las secuencias finales se editaron utilizando el programa bioinformático MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Las muestras recogidas para el estudio cuantitativo se procesaron como se describe en la sección de “Material y Métodos” del capítulo 2. El recuento celular de los géneros se llevó a cabo utilizando cámaras Sedgewick-Rafter bajo el microscopio invertido con aumentos de 20X y 40X (Edler y Elbrächter, 2010). En la mayoría de los casos, fue necesaria más de una cámara Sedgewick-Rafter para contar un número suficiente de células por réplica de sustrato artificial. Para cada réplica, se contaron al menos 400 células del género dominante (siempre *Ostreopsis*) y aproximadamente 100 células del resto de géneros. En todos los casos se contaron hasta un máximo de tres cámaras. Cuando las células presentaron concentraciones muy bajas, se utilizaron, además, cámaras de Utermöhl de 10 ml (Edler y Elbrächter, 2010). Las abundancias celulares finales se expresaron como células 100 cm⁻² de red de fibra plástica.

Una vez cuantificada la abundancia total de células de dinoflagelados BHAB, los conjuntos de 7 réplicas se utilizaron para estimar las abundancias celulares relativas de las especies de *Gambierdiscus* en cada profundidad y tiempo de muestreo. Para ello, las células presentes en cada réplica se dejaron sedimentar en el recipiente que las contenía. A continuación, se recogió una alícuota al azar del material sedimentado, se situó en un portaobjetos y se aislaron las primeras

2 - 3 células de *Gambierdiscus* spp. observadas bajo el microscopio invertido. Este proceso se llevó a cabo al menos una vez por cada réplica hasta alcanzar un número total de 20 células por cada profundidad. El número de células aisladas para este análisis estuvo condicionado por la baja abundancia celular que presentó *Gambierdiscus* en algunos conjuntos de muestras. Las células aisladas se tiñeron con blanco de calcoflúor (Fritz y Triemer, 1985) y se examinaron con un microscopio óptico LEICA DM6000 B (LEICA, Alemania) equipado con epifluorescencia. Las especies de *Gambierdiscus* se identificaron principalmente por las relaciones de las suturas de las placas apicales de acuerdo a Bravo *et al.* (2019): i) R1 o relación entre el 2'/1' y el 2'/3' (como indicador de la morfología de la placa 2'), ii) R2 o relación entre el 2'/4' y el 2'/3' (como indicador de la excentricidad del Po) y las medidas de la profundidad de la célula (diámetro dorso-ventral) y la anchura (diámetro transversal). Además, se emplearon otras características morfológicas como la ornamentación de la superficie celular. La numeración de las placas utilizada en este estudio siguió el sistema de tabulación kofoidiano modificado por Besada *et al.* (1982). La abundancia relativa de cada especie en la submuestra de 20 células se utilizó para estimar su abundancia total, expresada como células 100 cm⁻², para cada profundidad y tiempo de muestreo.

Para evaluar la diversidad del resto de géneros de dinoflagelados BHAB, se preparó el material de las muestras recogidas en el mar que no había sido utilizado para su análisis en el MEB siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

2.3. Análisis de datos

2.3.1. Variación de la abundancia y distribución de los dinoflagelados BHAB con la profundidad a lo largo de los tiempos de muestreo

La variabilidad en la abundancia celular de dinoflagelados BHAB entre las distintas profundidades y tiempos se analizó mediante el uso de modelos lineales mixtos generalizados (GLMMs) en los que la profundidad fue considerada un

factor fijo (3 niveles: 5, 10 y 20 m) y los tiempos un factor aleatorio (3 niveles). Se seleccionó una distribución binomial negativa de los errores, con una función de enlace 'identity', para alcanzar los supuestos de linealidad y normalidad de los errores, los cuales se comprobaron mediante una inspección visual de los residuos y gráficos Q-Q. Todos los GLMMs se realizaron utilizando la biblioteca 'lm4' (Kuznetsova *et al.*, 2017), que se implementó en el software estadístico R (R Core Team, 2016).

2.3.2. Efecto de los parámetros ambientales relacionados con la profundidad sobre los dinoflagelados BHAB

Para visualizar las similitudes multivariadas en la estructura de la comunidad de dinoflagelados a través de la gama de condiciones ambientales evaluada, se llevó a cabo un Análisis de Redundancia (RDA) a través del paquete R 'vegan' (Oksanen *et al.* 2019), como una técnica de ordenación restringida de datos transformados $\log(x+1)$. A continuación, se construyó un *biplot*, el cual se personalizó a través del paquete R 'ggord' (Beck, 2017), mostrando cada género de dinoflagelado y los parámetros relacionados con la profundidad (luz, temperatura del agua y movimiento del agua) como vectores de longitud y dirección variables. La significancia de estas configuraciones multivariadas se comprobó con la función "anova.cca", que también evaluó la significancia de cada eje (componente) para explicar una cantidad significativa de variación del conjunto de datos multivariados. La colinealidad entre los parámetros físicos se evaluó mediante Factores de Inflación de las Variables (VIF). En todos los casos, los VIF fueron < 5 , indicando una baja colinealidad entre las variables predictoras del espacio bidimensional del RDA.

Para determinar cuál de los tres parámetros ambientales relacionados con la profundidad explicaba la mayor parte de la variación en la abundancia celular y distribución de cada género, se adoptó una estrategia de selección de modelos a través del paquete 'MuMIn' de la biblioteca R (Bartón, 2019). Este paquete realiza un promedio multimodelo incorporando la incertidumbre de la selección del modelo. Todos los modelos candidatos se clasificaron en primer lugar

mediante el criterio de información de Akaike (AIC) corregido para muestras pequeñas (AICc). A continuación, se calculó la importancia relativa de cada predictor, como la suma de los pesos de Akaike sobre todos los modelos posibles. En todos los casos se corroboró la baja colinealidad entre las variables predictoras ($VIF < 5$). Todos los modelos ajustados eran lineales (es decir, una distribución de error "gaussiana" con una función de enlace "de identidad"). Finalmente, para validar la ausencia de desviaciones de la linealidad se realizó una inspección visual de los supuestos del modelo en los modelos seleccionados a través de los residuos y los gráficos de cuantiles-cuantiles (QQ) (Harrison *et al.*, 2018).

3. Resultados

3.1. *Diversidad, abundancia celular y patrones de distribución vertical de los géneros de dinoflagelados BHAB a lo largo de los tiempos de muestreo*

Se identificaron un total de 15 especies de dinoflagelados BHAB pertenecientes a 5 géneros de 3 órdenes diferentes: *Coolia* Meunier, *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* Schimdt (orden Gonyaulacales), *Prorocentrum* Ehrenberg (orden Prorocentrales) y *Amphidinium* Claperède y Lachmann (orden Amphidinales) (Tabla I).

En todas las profundidades y tiempos estudiados, los mismos géneros de dinoflagelados BHAB que fueron observados en muestras de macroalgas fueron también observados en las muestras de redes de fibra plástica, indicando que, tras 24 h, el proceso de colonización de los sustratos se llevó a cabo de manera exitosa, pues estos reflejaron la comunidad de dinoflagelados BHAB presente en sustratos naturales adyacentes (ver capítulo 2). En la mayoría de los casos, las estimaciones de abundancia celular de dinoflagelados mostraron coeficientes de variación (CV) $< 50\%$, lo que reflejó la baja variabilidad (precisión) de la estimación realizada tras el empleo de 7 réplicas de redes de fibra de plástica (Tabla II). Sólo en aquellos casos en los que la abundancia celular media fue

baja (<90 células 100 cm⁻²), o en los que las células estuvieron ausentes en alguna de las réplicas, *Gambierdiscus Prorocentrum* y *Amphidinium* presentaron CVs >50% (Tabla II).

Tabla I. Listado de especies de BHAB identificadas en este estudio

<i>Ostreopsis</i>	<i>O. fattorussoi</i> Accoroni, Romagnoli y Totti <i>O. cf. ovata</i> Fukuyo <i>O. siamensis</i> Schmidt
<i>Coolia</i>	<i>C. cf. malayensis</i> Leaw, Lim y Usup <i>C. tropicalis</i> Faust <i>C. areolata</i> Ten-Hage, Turquet, Quod y Couté
<i>Gambierdiscus</i>	<i>G. australes</i> Chinain y Faust <i>G. belizeanus</i> Faust <i>G. caribaeus</i> Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester <i>G. excentricus</i> Fraga
<i>Prorocentrum</i>	<i>P. hoffmanianum</i> Faust <i>P. lima</i> (Ehrenberg) Stein <i>P. panamense</i> Grzebyk, Sako y Berland <i>P. rathymum</i> Loeblich III, Sherley y Schmidt
<i>Amphidinium</i>	<i>A. carterae</i> Hulburt

Los cinco géneros estuvieron presentes en todas las profundidades y tiempos de muestreo, excepto en abril a 5 m de profundidad, cuando no se detectaron células de *Gambierdiscus* ni de *Amphidinium*. De acuerdo a su concentración celular, *Ostreopsis* fue el género dominante en todas las profundidades y tiempos de muestreo, con abundancias celulares que oscilaron entre 1480 ± 332 y 62069 ± 7300 células 100 cm⁻². En la mayoría de los casos, estos valores fueron de 1 a 3 órdenes de magnitud más altos que las concentraciones registradas para los otros géneros (Tabla II). En todos los casos, la abundancia celular media de *Ostreopsis* disminuyó con la profundidad (Fig. 3; Tabla III), ya que esta fue significativamente mayor a 5 m que a 10 m y mayor a esta profundidad que a 20 m ($p < 0,01$ en ambos casos, Tabla III). Este patrón fue consistente a lo largo de los tiempos de muestreo, aunque las abundancias

celulares medias registradas en abril fueron mayores que las registradas en agosto y noviembre (Fig. 3).

Tabla II. Valores medios, máximos, mínimos, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (% CV) de las abundancias celulares de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, *Amphidinium*, *Ostreopsis* y *Coolia* (células 100 cm⁻²) en los tres tiempos de muestreo (abril, agosto y noviembre) y los tres niveles de profundidad (5, 10 y 20 m).

Tiempo	Profundidad (m)	<i>Gambierdiscus</i>					<i>Prorocentrum</i>					<i>Amphidinium</i>				
		\bar{x}	SD	Min	Max	CV (%)	\bar{x}	SD	Min	Max	CV (%)	\bar{x}	SD	Min	Max	CV (%)
Abril	5	0	0	0	0	0	26	27	0	78	103	0	0	0	0	0
	10	24	15	7	46	61	244	115	118	412	47	67	53	0	118	79
	20	90	58	13	185	65	331	103	206	510	31	131	39	0	196	30
Agosto	5	55	31	29	100	57	350	121	196	529	34	48	34	20	118	71
	10	220	72	141	341	33	772	196	549	1039	25	185	58	98	255	31
	20	133	33	71	176	24	1304	217	941	1569	17	422	125	196	549	30
Noviembre	5	66	30	18	100	45	321	235	0	765	73	42	74	0	176	175
	10	131	37	76	194	28	423	64	324	526	15	128	34	84	184	26
	20	107	29	76	153	27	307	111	176	490	36	157	54	78	235	35

Tiempo	Profundidad (m)	<i>Ostreopsis</i>					<i>Coolia</i>				
		\bar{x}	SD	Min	Max	CV (%)	\bar{x}	SD	Min	Max	CV (%)
Abril	5	62,069	7300	52,352	73,529	12	438	85	314	588	19
	10	12,527	3962	8333	18,392	32	395	151	235	706	38
	20	2167	358	1600	2627	17	263	49	21	353	19
Agosto	5	19,226	772	15,074	25,235	4	810	250	529	1235	31
	10	8978	1595	6863	11,667	18	748	195	549	1020	26
	20	5804	772	4843	7039	13	549	128	431	824	23
Noviembre	5	7205	1725	4260	9176	24	879	286	568	1412	32
	10	3618	562	2528	4370	16	576	170	257	798	29
	20	1480	332	941	2020	22	255	109	176	490	43

En la mayoría de los casos, *Coolia* fue el segundo género más abundante de este estudio a 5 y 10 m de profundidad, con abundancias celulares que oscilaron entre 395 ± 151 y 879 ± 286 células 100 cm^{-2} . Sin embargo, a 20 m de profundidad, el segundo género más abundante en todos los casos fue *Prorocentrum*, con abundancias celulares que oscilaron entre 307 ± 111 y 1304 ± 217 células 100 cm^{-2} , mientras que la abundancia celular de *Coolia* osciló entre 255 ± 109 y 549 ± 128 células 100 cm^{-2} (Tabla II). De forma similar al patrón observado para *Ostreopsis*, la abundancia celular media de *Coolia* disminuyó con la profundidad (Fig. 3), ya que esta fue significativamente mayor a 5 m que a 10 m y a 10 m que a 20 m ($p= 0,025$ y $p<0,01$ respectivamente, Tabla III). Sin embargo, a diferencia de *Ostreopsis* la abundancia celular media de *Coolia* fue mayor en agosto y noviembre que en abril (Fig. 3).

Gambierdiscus, *Prorocentrum* y *Amphidinium* mostraron por lo general abundancias celulares menores que *Ostreopsis* y *Coolia*, pues estas oscilaron entre 0 y 220 ± 72 , 26 ± 27 y 1304 ± 217 y 0 y 422 ± 125 células 100 cm^{-2} respectivamente (Tabla II). En contraposición con el patrón observado para *Ostreopsis* y *Coolia*, se observó que estos tres géneros aumentaban su abundancia celular conforme aumentaba la profundidad (Fig. 4). Las abundancias celulares medias aumentaron significativamente de 5 a 10 y 20 m ($p<0,01$ en todos los casos, Tabla III). Sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias significativas entre 10 y 20 m (Tabla III). En general, la abundancia celular media de estos géneros fue, tal y como se observó para *Coolia*, mayor en agosto y noviembre que en abril (Fig. 4).

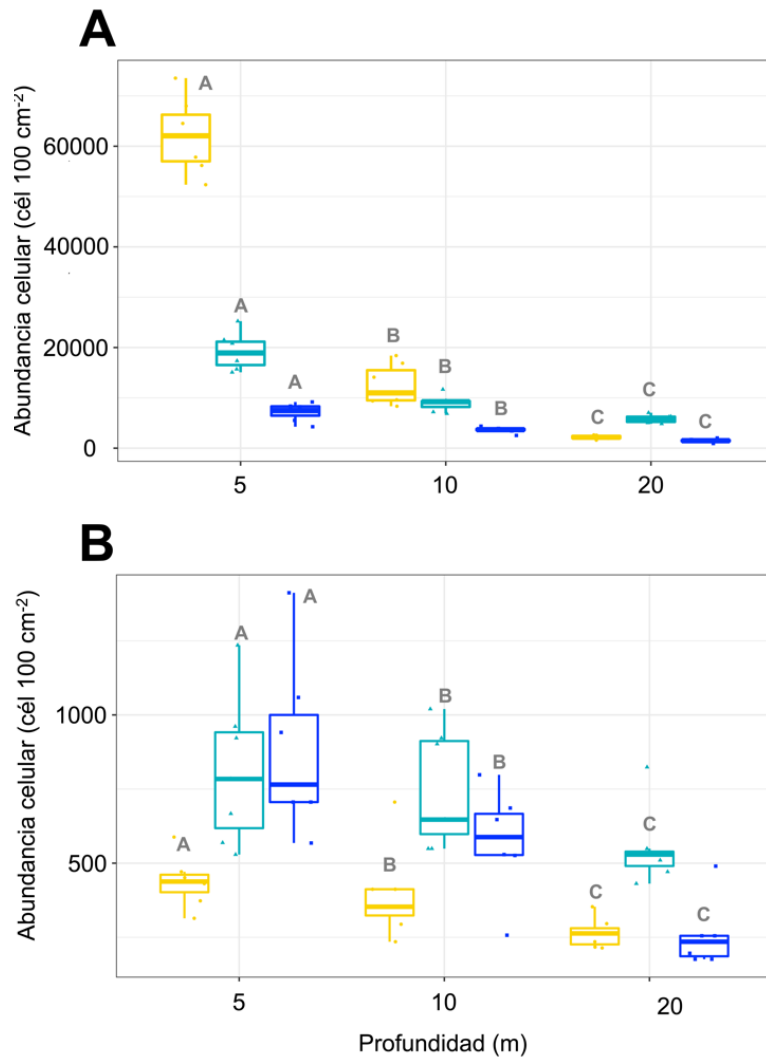


Figura 3. Diagrama de cajas donde se muestran las abundancias celulares (células 100 cm⁻²) de **(A)** *Ostreopsis* y **(B)** *Coolia* en 3 niveles de profundidad (5, 10 y 20 m) a lo largo del tiempo: abril (amarillo/círculos), agosto (verde/triángulos) y noviembre (azul/cuadrados). Las diferencias significativas entre profundidades se indican con letras; profundidades asociadas a la misma letra no fueron significativamente diferentes.

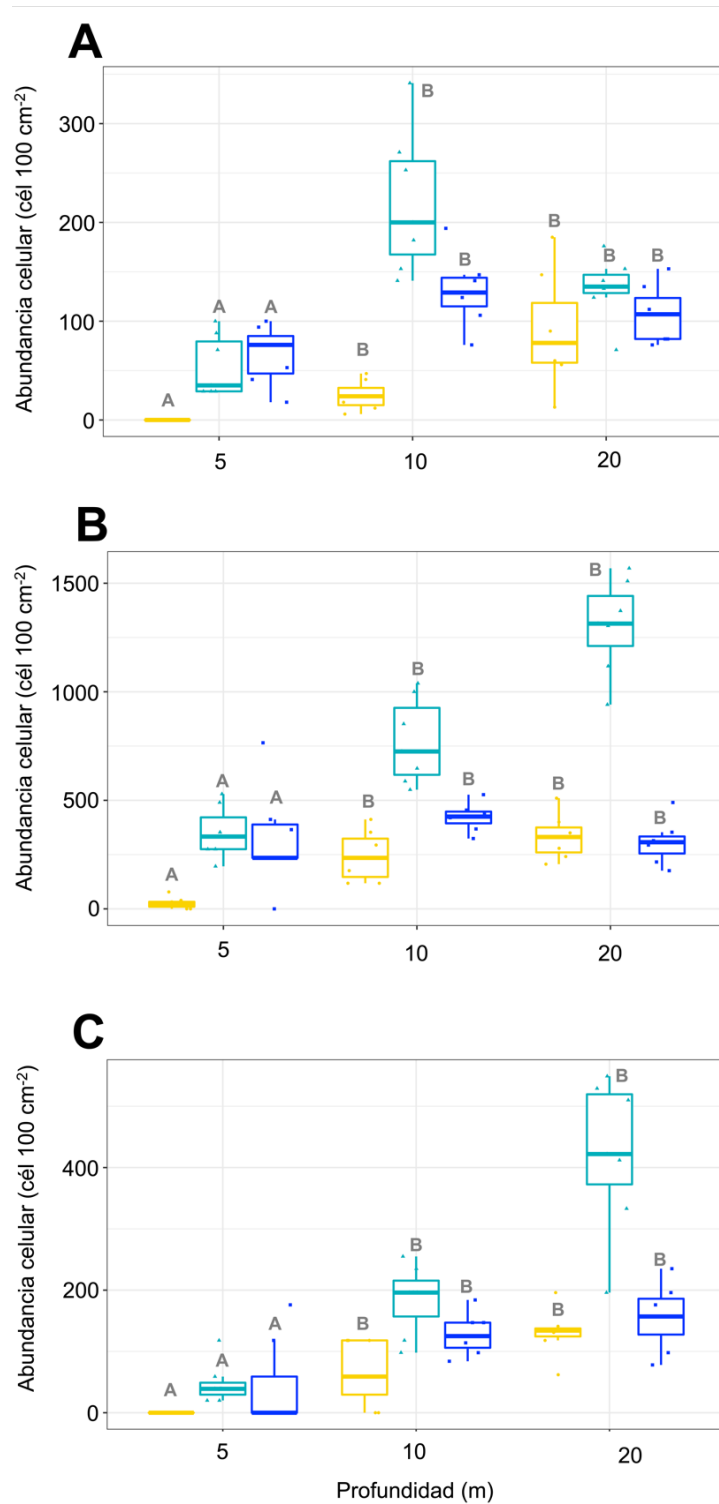


Figura 4. Diagrama de cajas donde se muestran las abundancias celulares (células 100 cm⁻²) de **(A)** *Gambierdiscus*, **(B)** *Prorocentrum* y **(C)** *Amphidinium* en 3 niveles de profundidad (5, 10 y 20 m) a lo largo del tiempo: Abril (amarillo/círculos), agosto (verde/triángulos) y noviembre (azul/cuadrados). Las diferencias significativas entre profundidades se indican con letras; profundidades asociadas a la misma letra no fueron significativamente diferentes.

Tabla III. Resultados de los GLMs realizados para evaluar diferencias en la abundancia de los géneros de dinoflagelados BHAB entre los tres niveles de profundidad (5, 10 y 20 m). Los valores p-significativos ($p < 0,05$) se destacan en negrita. Para cada par de comparaciones, los niveles de referencia son "10 m" y "5 m", respectivamente.

Coef.	<i>Ostreopsis</i>			<i>Coolia</i>			<i>Gambierdiscus</i>			<i>Prorocentrum</i>			<i>Amphidinium</i>		
	Est.	Z	p	Est.	Z	p	Est.	Z	p	Est.	Z	p	Est.	Z	p
Intercep.	8,9	25,2	<0,01	6,3	37,8	<0,01	4,5	9,5	<0,01	6,1	16	<0,01	4,8	10,8	<0,01
20 m	-0,9	-6,8	<0,01	-0,5	-5	<0,01	0,3	1,3	0,18	0,2	1	0,29	0,6	1,5	0,12
5 m	1,1	8,22	<0,01	0,21	2,23	0,025	-1,3	-5	<0,01	-0,9	-3,7	<0,01	-1,7	-4,1	<0,01
Intercep.	10	28,3	<0,01	6,5	39	<0,01	3,2	6,7	<0,01	5,2	13	<0,01	3	6,5	<0,01
10 m	-1,1	-8,2	<0,01	-0,2	-2,2	0,025	1,3	5	<0,01	0,9	3,7	<0,01	1,7	4,1	<0,01
20 m	-2	-14	<0,01	-0,7	-7,2	<0,01	1,7	5,6	<0,01	1,1	4,6	<0,01	2,3	5,4	<0,01

3.2. Influencia de los parámetros ambientales en la abundancia y distribución de los géneros de dinoflagelados BHAB

La luz, el movimiento del agua y la temperatura del agua mostraron un claro patrón asociado a la profundidad, disminuyendo a medida que esta aumentaba (Tabla S2). La temperatura del agua registrada en el lugar de estudio osciló entre 19,5 y 24,9 °C. La máxima diferencia observada entre 5 y 20 m de profundidad durante 24 h se registró en abril (1,8 °C), seguido de noviembre (1 °C) y agosto (0,8 °C). La temperatura media del agua fue mayor en agosto (~24° C), seguida de noviembre (~23,3 °C) y abril (~20,4 °C). El nivel máximo de luz se registró a 5 m de profundidad en agosto (39955 lx). En todos los tiempos de muestreo, la luz se atenuó aproximadamente un 70% entre los 5 y los 20 m de profundidad. Los niveles máximos del movimiento del agua se registraron a 5 m de profundidad en abril (18,1 m.s⁻²). La mayor variación del movimiento del agua entre 5 y 20 m de profundidad durante 24 horas (visualizada a través de la desviación estándar (SD) de este parámetro) se registró en abril (de 0,8 a 0,1

m.s⁻²). Por el contrario, esta variación fue menor en agosto y noviembre (de 0,3 a 0,1 m.s⁻²) (Tabla IV).

Tabla IV. Resumen de los datos ambientales en el que se incluye los valores medios (\bar{x}), la desviación estándar (SD) y los valores mínimos, máximos de la temperatura del agua (°C), los valores máximos de luz (lux) y los valores medios (\bar{x}), la desviación estándar (SD) y los valores mínimos y máximos del movimiento del agua (m.s⁻²) en los tres tiempos de muestreo (abril, agosto y noviembre) y tres niveles de profundidad (5, 10 y 20 m).

Tiempo	Profundidad (m)	Temperatura del agua (°C)				Iluminancia (lux)	Movimiento agua (m.s ⁻²)			
		\bar{x}	SD	Min	Máx		Max	\bar{x}	SD	Min
Abril	5	20,91	0,48	20	21,8	35822	10,9	0,8	4,8	18,1
	10	20,34	0,40	19,6	21,4	28933	10,7	0,2	9,7	12,3
	20	20,04	0,39	19,5	20,7	11711	10,9	0,15	10,5	11,5
Agosto	5	24,01	0,39	23,7	24,9	39955	10,6	0,3	9	12,8
	10	23,98	0,30	23,7	24,7	26178	10,8	0,2	9,9	12,2
	20	23,91	0,18	23,7	24,4	12401	10,9	0,1	10,6	12,6
Noviembre	5	23,32	0,22	22,9	23,9	34444	10,8	0,3	8,5	12,8
	10	23,26	0,18	22,7	23,7	15155	11	0,2	10	12
	20	23,26	0,20	22,3	23,4	10333	10,6	0,2	10	11

Los parámetros ambientales evaluados explicaron el 84% (R^2 ajustado del RDA= 0,84%) en la varianza de la abundancia celular y distribución de la comunidad de dinoflagelados BHAB. En particular, el movimiento del agua fue el parámetro que más contribuyó a explicar la variación observada, seguido de la luz y la temperatura del agua (Fig. 5). Considerando los diferentes géneros, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* fueron los más influenciados por el movimiento del agua (Fig. 5; $p < 0,01$ en todos los casos, Tabla V; Tabla VI) seguido por temperatura del agua (Fig. 5; $p < 0,05$, $p = 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente, Tabla V; Tabla VI). *Coolia* fue influenciada principalmente por la temperatura del agua (Fig. 5; $p = 0,01$, Tabla V; Tabla VI) y la luz (Fig. 5; $p = 0,04$, Tabla V; Tabla VI). Por último, la abundancia celular y distribución de *Ostreopsis* fue influenciada principalmente por la luz (Fig. 5; $p < 0,01$, Tabla V; Tabla VI)

seguida por el movimiento del agua (Fig. 5; $p=0,07$, Tabla V; Tabla VI). Por otro lado, la influencia que tuvieron los parámetros ambientales en la abundancia y distribución de los distintos géneros BHAB fue diferente. El movimiento del agua se correlacionó de manera negativa con *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* y positivamente (aunque esta correlación no llegó a ser significativa, $p=0,07$) con *Ostreopsis*. La luz se correlacionó de manera positiva con *Ostreopsis* y *Coolia*. Por último, la temperatura se correlacionó de manera positiva con *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* (Fig. 5; Tabla V).

Tabla V. Importancia relativa de los parámetros ambientales considerados en este estudio en la abundancia y distribución de los géneros de dinoflagelados del BHAB a lo largo de las profundidades y los tiempos de muestreo a partir del promedio multimodelo de los GLMs (método completo: suma de las ponderaciones de Akaike sobre todos los modelos posibles). Las variables significativas se destacan en negrita.

Género	Parámetro	Estimación	SE ajustado	z	p-valor
<i>Ostreopsis</i>	Luz	0,00004	0,00001	2,97	<0,01
	Movimiento agua	1,4	0,08	1,76	0,07
	Temperatura	-0,02	0,01	0,19	0,85
<i>Coolia</i>	Luz	0,000009	0,000005	2,003	0,04
	Movimiento agua	-0,01	0,47	0,02	0,1
	Temperatura	0,09	0,03	2,48	0,01
<i>Gambierdiscus</i>	Luz	0,0000003	0,00002	0,02	0,98
	Movimiento agua	-3,02	0,06	5,38	<0,01
	Temperatura	0,13	0,06	2,02	<0,05
<i>Prorocentrum</i>	Luz	0,000002	0,00001	0,22	0,82
	Movimiento agua	-1.868	0,3	6,29	<0,01
	Temperatura	0,1075	0,03	3,02	0,01
<i>Amphidinium</i>	Luz	0,0000003	0,00002	0,1	0,99
	Movimiento agua	-3,02	0,56	5,39	<0,01
	Temperatura	0,13	0,06	2,02	<0,05

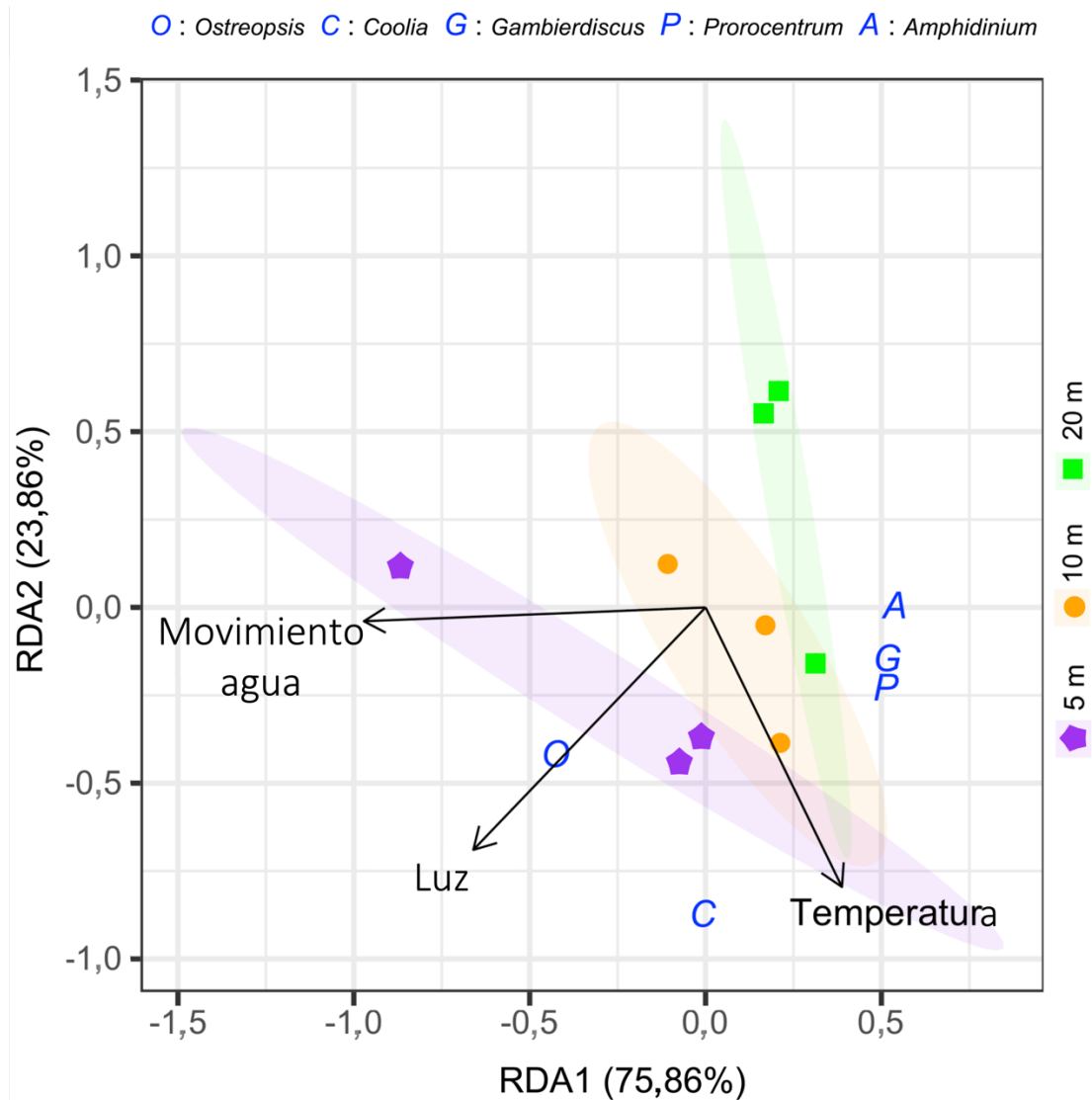


Figura 5. Gráfico de ordenación del Análisis de Redundancia (RDA) que donde se muestran las relaciones entre los géneros de dinoflagelados BHAB (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*) y los parámetros ambientales (temperatura del agua, movimiento del agua y luz). Los elipsoides muestran las áreas de límites de confianza (95%) que abarcan las comunidades de BHAB en cada profundidad (5, 10 y 20 m).

Tabla VI. Resultados de la "selección de modelos" para evaluar la importancia relativa de los parámetros ambientales en los patrones de distribución y abundancia celular de cada género de dinoflagelado. Se incluye la estructura de errores de la familia y sus funciones de enlace, así como los valores de las estimaciones de los modelos. Los modelos se clasifican según su parsimonia, aquí a través de los AIC, y también se incluye el peso de la evidencia de cada modelo.

Género	Modelo	Parámetros			Movimiento agua	Familia	df	LogLik	AICc	Delta	Peso
		Intercepc.	Luz	Temperatura							
Ostreopsis	7	3,014	0,00003575			gaussian	3	-0,343	11,5	0	0,673
	4	2,998	0,00002529		0,978	gaussian	4	1,756	14,5	3	0,15
	6	3,371			1,826	gaussian	3	-1,884	14,6	3,08	0,144
	3	3,977	0,00003661	-0,04236		gaussian	4	-0,074	18,1	6,66	0,024
	2	1,896		0,06227	1,934	gaussian	4	-1,479	21	9,47	0,006
5	3,86		0,0003308		gaussian	3	-5,895	22,6	11,1	0,003	
Coolia	3	0,5501	0,000008868	0,08345		gaussian	4	9,538	-1,1	0	0,457
	5	0,5219		0,09379		gaussian	3	5,762	-0,7	0,35	0,383
	7	2,447	0,00001056			gaussian	3	4,562	1,7	2,75	0,115
	2	0,2847		0,1013	0,2336	gaussian	4	6,346	5,3	6,38	0,019
	6	2,683			0,05707	gaussian	3	2,376	6	7,12	0,013
	4	2,455	0,00001551		-0,4629	gaussian	4	5,847	6,3	7,38	0,011
1	0,7379	0,00001094	0,07532	-0,1785	gaussian	5	9,974	10,1	11,13	0,002	
Gambierdiscus	6	2,576			-3,117	gaussian	3	-0,434	11,7	0	0,567
	2	-0,5061		0,1301	-2,89	gaussian	4	2,853	12,3	0,63	0,415
	4	2,542	0,0000023		-3,194	gaussian	4	-0,405	18,8	7,14	0,016
	1	-0,7767	0,000006531	0,1456	-2,644	gaussian	5	3,281	23,4	11,77	0,002
Proocentrum	2	0,5114		0,1074	-1,842	gaussian	4	8,171	1,7	0	0,863
	6	3,056			-2,029	gaussian	3	2,677	5,4	3,79	0,13
	4	2,979	0,00000521		-2,204	gaussian	4	2,979	12	10,38	0,005
	1	0,4483	-0,000001523	0,111	-1,785	gaussian	5	8,244	13,5	11,85	0,002
Amphidinium	6	2,798			-3,551	gaussian	3	4,757	1,3	0	0,568
	1	0,7732	-0,00001172	0,09278	-2,997	gaussian	5	13,47	3,1	1,77	0,234
	2	1,259		0,06499	-3,438	gaussian	4	7,129	3,7	2,46	0,166
	4	2,888	0,000006093		-3,347	gaussian	4	5,44	7,1	5,83	0,031

3.3. Abundancia y distribución vertical de las especies de *Gambierdiscus* a lo largo de los tiempos de muestreo

Durante el análisis cuantitativo de las especies de *Gambierdiscus* se examinaron un total de 180 células. En este análisis, se identificaron tres especies: *Gambierdiscus australes* Chinain y Faust, *Gambierdiscus caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester y *Gambierdiscus excentricus* (Fig. 6; Tabla I).

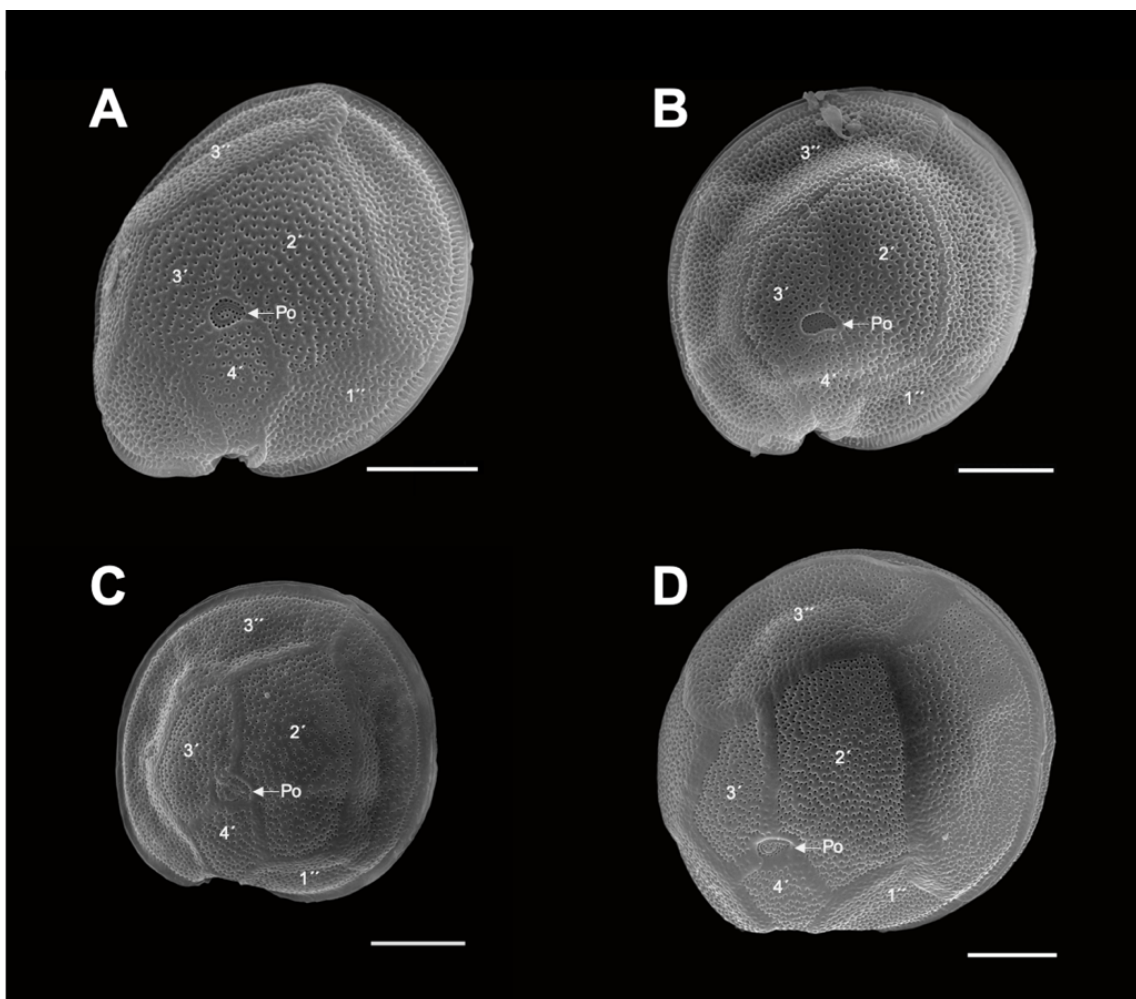


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las epitecas de las especies de *Gambierdiscus* encontradas en el área de estudio: **(A)** *G. australes*, **(B)** *G. belizeanus* **(C)** *G. caribaeus* **(D)** *G. excentricus*. Barra de escala: 20 μ m. Autor: E. Soler.

En general, las abundancias celulares relativas de las especies de *Gambierdiscus* se mantuvieron similares entre las profundidades y los tiempos de muestreo (Fig. 7). En todos los casos en los que se detectaron células de *Gambierdiscus* (no se detectaron a 5 m en abril), *G. caribaeus* fue la especie más abundante, representando 60 - 85% de la abundancia celular total del género, lo que correspondió a 20 - 154 células 100 cm⁻². *G. australes* fue por lo general la segunda especie más abundante, representando entre el 10 y el 35%, lo que correspondió a 2 - 55 células de 100 cm⁻². Por último, *G. excentricus* fue la especie menos abundante, alcanzando un máximo del 15% de la abundancia celular total, lo que correspondió a 0 - 20 células 100 cm⁻² (Fig. 7).

En abril, las abundancias celulares de *G. caribaeus* y *G. australes* aumentaron de 10 a 20 m. En agosto y noviembre, las abundancias celulares aumentaron de 5 a 10 m, pero disminuyeron de 10 a 20 m (Fig. 7). En contraposición con estas especies, *G. excentricus* presentó una distribución más restringida, pues estuvo siempre ausente a 5 m de profundidad y en noviembre a todas las profundidades. En abril y agosto, la abundancia de células de esta especie aumentó con la profundidad de 10 a 20 m (Fig. 7).

Además de las tres especies ya mencionadas, el análisis cualitativo de las muestras reveló la presencia de *Gambierdiscus belizeanus* Faust en la zona de estudio (Fig. 6; Tabla I).

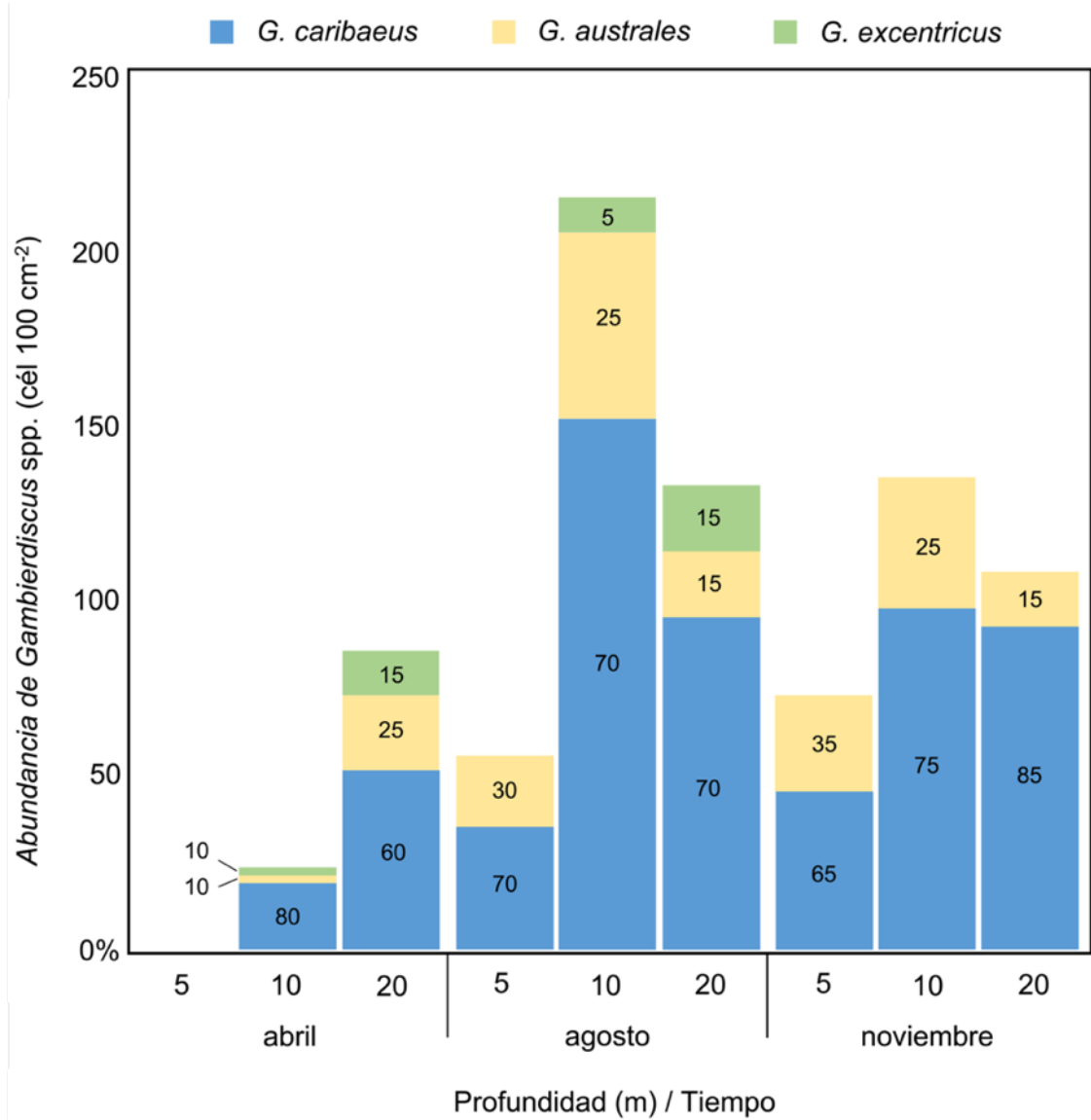


Figura 7. Abundancia celular total y relativa de las especies de *Gambierdiscus* encontradas en el área de estudio en las distintas profundidades y tiempos de muestreo. Los valores de abundancia relativa (%) se muestran dentro de las barras.

4. Discusión

4.1. Patrones de distribución vertical de dinoflagelados BHAB

Este estudio investigó la presencia y distribución con la profundidad de la comunidad de dinoflagelados BHAB presente en el sur de la isla de El Hierro en tres tiempos diferentes a lo largo de un año (abril, agosto y noviembre). En este contexto, se registró la presencia de cinco géneros BHAB, es decir, *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, pero la estructura de la comunidad cambió de acuerdo a la profundidad y el tiempo de muestreo evaluado. Así, los resultados obtenidos indicaron que los géneros de dinoflagelados BHAB estudiados siguieron dos patrones de distribución vertical de forma consistente en el tiempo: *Ostreopsis* y *Coolia* presentaron sus mayores abundancias celulares cerca de la superficie y disminuyeron en todos los casos con la profundidad, mientras que las abundancias celulares de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* fueron siempre mayores por debajo de los 5 m.

El conocimiento que existe en la actualidad en relación a la distribución vertical de los dinoflagelados BHAB es limitado (Tester *et al.*, 2020). Por un lado, el número de estudios que han evaluado esta cuestión resulta aún escaso. Por otro, el patrón de distribución vertical observado para un mismo género entre estos estudios ha sido, en algunos casos, contradictorio (Fig. S1). *A priori*, esta situación podría estar simplemente indicando que el patrón de distribución que presenta un género no es constante entre regiones o épocas de muestreo, probablemente como consecuencia de la presencia de distintas especies (Fukani *et al.*, 2022) o distintas condiciones ambientales (Nishimura *et al.*, 2020), o ambas. Sin embargo, la diversidad de estrategias de muestreo empleada en dichos estudios impide, por el momento, corroborar estas hipótesis (Tabla SI), pues supone un obstáculo que dificulta una comparación realista de sus resultados. Una de estas discrepancias ha sido, por ejemplo, el rango de profundidad considerado y el número de niveles investigado dentro de este (Tabla SI). Mientras que algunos estudios establecieron rangos de profundidad amplios y un número elevado de niveles (p. ej. Cohu y Lemeé, 2012 o Boisnoir *et al.*, 2018), en otros el rango establecido fue más estrecho y el número de

niveles menor (p. ej. Xu *et al.*, 2014 o Loeffler *et al.*, 2015), lo que podría haber llevado a la observación parcial, y por tanto poco realista, de los patrones de distribución vertical de los géneros investigados. Por ejemplo, Loeffler *et al.* (2015) no encontraron diferencias significativas en la concentración celular de *Gambierdiscus* spp. entre 10 y 20 m en las Islas Vírgenes de EE.UU. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas entre estas profundidades en el presente estudio. Sin embargo, el establecimiento de un nivel más somero a 5 m en la localidad de Los Saltos, sí permitió la observación de un patrón constante en el tiempo para este género.

Sin duda, una de las mayores discrepancias entre estudios ha sido el tipo de sustrato empleado. Una gran mayoría de estudios emplearon macrófitos (Tabla S1). Sin embargo, la distribución tan heterogénea que a menudo presentan las comunidades macroalgales en los gradientes verticales hace imposible el uso de una única especie para una comparación realista entre niveles de profundidad (Cohu y Lemeé, 2012). En este sentido, el empleo de sustratos artificiales en el sur de la isla de El Hierro sí permitió una comparación de niveles de profundidad y tiempos de muestreo.

A pesar de la variabilidad de estrategias de muestreo empleadas, los patrones de distribución vertical observados en el presente estudio coincidieron en muchos casos con los observados en estudios anteriores. En particular, el patrón de distribución vertical de *Ostreopsis*, uno de los géneros que ha sido más frecuentemente investigado en este tipo de estudios, parece haber alcanzado un consenso; todos los estudios excepto uno (Mabrouk *et al.*, 2011) observaron el mismo patrón (Fig. S1). Estos resultados pueden sugerir una distribución sólida (constante) de *Ostreopsis*, que podría observarse a través de diferentes enfoques de muestreo. Sin embargo, los resultados obtenidos por Mabrouk *et al.* (2010) también sugieren que, bajo condiciones ambientales particulares, como los altos niveles de turbulencia del agua observados en su estudio que podrían haber actuado dispersando las células de *Ostreopsis* en el nivel menos profundo, los patrones de distribución vertical pueden verse alterados.

4.2. Influencia de los parámetros ambientales en la distribución vertical de dinoflagelados BHAB en la isla de El Hierro

El registro consistente de las máximas abundancias celulares de algunos géneros a 10 - 20 m en el sur de la isla de El Hierro indicó que los hábitats situados en zonas más profundas de las que se investigan de manera habitual en estudios ecológicos y programas de seguimiento ofrecen una serie de condiciones ambientales que pueden resultar más favorables para determinadas poblaciones de dinoflagelados BHAB, mientras que dificultan el desarrollo de otras. El estudio de estas condiciones parece, por tanto, ser clave para poder explicar, e incluso predecir, los patrones de distribución de dinoflagelados BHAB en un gradiente vertical. En concreto, los tres parámetros evaluados en el sur de la Isla de El Hierro resultaron ser responsables en gran medida de los patrones observados.

4.2.1. Movimiento del agua

El movimiento del agua fue el parámetro que más contribuyó a explicar la estructura y distribución de la comunidad de dinoflagelados BHAB en el sur de la isla de El Hierro. Este parámetro ha sido comúnmente ignorado en muchos estudios de campo y de laboratorio, en los que la temperatura del agua se ha considerado el principal, a veces único, parámetro que influye en la dinámica de los dinoflagelados BHAB (p. ej. Faimali *et al.*, 2012; Kibler *et al.*, 2015 o Jang *et al.*, 2018). Sin embargo, ya en los primeros estudios sobre ecología de dinoflagelados bentónicos, las características hidrodinámicas de los sistemas estudiados se consideraban un parámetro ambiental clave capaz de modular las comunidades de estos organismos (Tindall y Morton, 1998). El movimiento del agua puede afectar a los dinoflagelados bentónicos a diferentes niveles. Se sabe que las células de estos organismos son muy sensibles a la turbulencia del agua a nivel celular, a las que posiblemente produce daños mecánicos, interferencias en la natación, influencias en la disponibilidad (captación) de nutrientes o daños

en su fisiología entre otros (Estrada y Berdalet, 1998). Desde un punto de vista de la comunidad, la turbulencia del agua causada por las olas y las corrientes también influye en la abundancia celular de los dinoflagelados epibentónicos, ya que éstos se encuentran, en muchas ocasiones, poco adheridos a sus sustratos, siendo fácilmente desprendidos por las olas y las corrientes y dispersados en la columna de agua (Tindall y Morton, 1998; Accoroni y Totti, 2016).

En este estudio, el movimiento del agua demostró tener un efecto significativamente negativo sobre *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, lo que explica sus máximas abundancias celulares lejos de la superficie del mar, a 10 o 20 m, donde los valores del movimiento del agua disminuyeron rápidamente. La influencia negativa del movimiento del agua sobre *Gambierdiscus* y *Amphidinium* fue probablemente causante de la ausencia de estos dos géneros a 5 m en el muestreo realizado en abril, momento en el que se registraron los valores máximos para este parámetro en la localidad de estudio. Richlen y Lobel (2011) también observaron que el movimiento del agua influía negativamente en la abundancia celular de estos géneros, lo que los llevó a documentar un patrón similar de distribución vertical en el atolón Johnston (Océano Pacífico). Varios estudios han evaluado el efecto del movimiento del agua en la abundancia y distribución de *Gambierdiscus*, mientras que el número de estudios para *Prorocentrum* y *Amphidinium* es comparativamente mucho menor. En concordancia con este estudio, la gran mayoría de los estudios han documentado una mayor abundancia celular de *Gambierdiscus* en ambientes protegidos, los cuales corresponderían a las zonas más profundas muestreadas en el presente estudio, que en zonas expuestas (revisado en Parsons *et al.*, 2012 y Tester *et al.*, 2020).

En contraposición a *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, se observó que el movimiento del agua influía de manera positiva en el crecimiento de *Ostreopsis*. Esta influencia no sólo fue evidente en el gradiente vertical, con la máxima abundancia celular en el nivel más somero, sino también entre los tiempos de muestreo; la abundancia celular de *Ostreopsis* fue entre 3 y 6 veces mayor a 5 m de profundidad en abril, coincidiendo con los máximos valores del movimiento del agua registrados en este estudio, que a esta profundidad en

épocas posteriores de muestreo. A pesar de que aún no se ha alcanzado un consenso sobre la influencia exacta de este parámetro sobre el género *Ostreopsis*, el movimiento del agua es uno de los parámetros ambientales que se evocan con más frecuencia en los estudios que han investigado la dinámica de sus proliferaciones. Muchos estudios han sugerido que niveles de hidrodinamismo moderados parecen afectar positivamente al crecimiento de *Ostreopsis* (Vila *et al.*, 2001, Totti *et al.*, 2010, Selina *et al.*, 2014, Santos *et al.*, 2019), mientras que niveles altos, a menudo registrados en zonas poco profundas, pueden impedir su crecimiento (Santos *et al.*, 2019) o actuar desprendiendo las células de los sustratos a los que estas se encuentran adheridas (Mabrouk *et al.*, 2011).

En cuanto a la influencia del movimiento del agua en la distribución de *Coolia*, el patrón vertical ya referido para este género, caracterizado por mayores densidades celulares en la superficie y un marcado descenso con la profundidad, junto con los resultados del RDA, sugieren que es menos sensible al movimiento del agua que *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*. Sin embargo, en comparación con *Ostreopsis*, *Coolia* parece verse favorecida por niveles de movimiento del agua más bajos, como evidencian las mayores abundancias celulares a 5 m de profundidad en agosto y noviembre, tiempos de muestreo en los que los niveles del movimiento del agua disminuyeron de forma significativa. En concordancia con los resultados de este estudio, Vila *et al.* (2001) observaron que en la costa catalana del Mediterráneo *Ostreopsis* y *Coolia* parecen tolerar ciertas condiciones de turbulencia (a las que se refieren en su trabajo como "agitado" y "ligeramente agitado"), bajo las cuales *Ostreopsis* demostró tener una mayor tolerancia.

La medición del movimiento del agua para evaluar su influencia en la abundancia celular y distribución de dinoflagelados BHAB se ha llevado a cabo de diferentes maneras. Algunos estudios han evaluado este parámetro visualmente, estableciendo categorías como "tranquilo", "moderado" o "fuerte" (Vila *et al.*, 2001, Totti *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de medidas subjetivas del movimiento del agua conlleva que la relación que se establece entre este parámetro y la dinámica de las comunidades de dinoflagelados BHAB sea

imprecisa. Por el contrario, el uso de métodos de medición cuantitativos resulta más apropiado para el establecimiento de relaciones más precisas. En este sentido, algunos estudios han empleado métodos cuantitativos indirectos tales como mediciones del desgaste de piezas de escayola o "*clod-cards*" (Richlen y Lobel, 2011) o la estimación de la altura de las olas (Santos *et al*, 2019) mientras que, en este estudio se registró directamente el movimiento del agua ($m.s^{-2}$) mediante dispositivos digitales (acelerómetros). A pesar de que todos estos métodos cuantitativos han permitido avanzar en el establecimiento de una relación más precisa entre *Ostreopsis* y el movimiento del agua, el uso de diferentes enfoques para estimar o medir este parámetro impide una comparación realista de los resultados obtenidos entre diferentes estudios. Por lo tanto, hasta que no se incorporen estimaciones cuantitativas precisas y estandarizadas del movimiento del agua en los estudios ecológicos, su influencia en la dinámica de los BHABs seguirá siendo incierta. En cualquier caso, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan las observaciones realizadas en estudios previos, las cuales indican diferentes niveles de tolerancia al movimiento del agua para los géneros BHAB estudiados: *Ostreopsis* (menos susceptible) < *Coolia* < *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* (más susceptibles). Estos niveles de susceptibilidad al movimiento del agua parecen ser un rasgo ecológico importante que influye de manera muy notable en la distribución vertical de los dinoflagelados BHAB.

4.2.2. Luz

La luz fue el segundo parámetro que más influyó en la distribución de la comunidad de dinoflagelados BHAB. Al igual que se observó para el movimiento del agua, las variaciones de luz se produjeron principalmente entre los niveles de profundidad y, por lo tanto, su influencia fue más evidente en la distribución vertical de los dinoflagelados BHAB. Sin embargo, la duración del día no debe ser descartada como un importante factor limitante de la luz con influencia en el crecimiento de algunos géneros entre los tiempos de muestreo. En este sentido, se observó que las abundancias celulares de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, mostraron una reducción significativa de sus abundancias

celulares en noviembre a 10 y 20 m, cuando la duración del día es, en comparación con los otros tiempos de muestreo, significativamente más corta.

En el gradiente vertical, la luz demostró influenciar de manera significativamente positiva en el crecimiento de *Ostreopsis* y *Coolia*. Esto fue especialmente evidente para *Ostreopsis*, para el que la luz fue el parámetro más determinante. La mayoría de estudios previos han encontrado las máximas abundancias celulares de este género en zonas poco profundas y bien iluminadas (por ejemplo, Totti *et al.*, 2010 o Richlen y Lobel, 2011), hecho que los llevó a sugerir una dependencia, o una mayor tolerancia, a niveles altos de luz en comparación con otros géneros (Accoroni y Totti, 2016). Sin embargo, la presencia de poblaciones de *Ostreopsis* a 20 m de profundidad, con densidades celulares significativamente altas indica que, incluso a esa profundidad, no se alcanza el límite inferior de luz que este género necesita para crecer. Esto sugiere que el nicho ecológico de *Ostreopsis* con respecto a la luz es bastante amplio. Los estudios de laboratorio que han investigado el papel de la luz como parámetro que influye en el crecimiento de este género son limitados (revisados en Tester *et al.*, 2020) pero, en concordancia con los resultados de este estudio, estos también indicaron que *Ostreopsis* es capaz de crecer en un amplio rango de intensidades de luz (p. ej. Monti y Cecchin, 2012).

Del mismo modo, la abundancia celular de *Coolia* fue siempre mayor en el nivel más superficial estudiado, lo que sugiere requisitos de luz similares a los de *Ostreopsis*. Ambos géneros pueden ser observados con frecuencia en la columna de agua (Mangialagio *et al.*, 2011; Jauzein *et al.*, 2018, Santos *et al.*, 2019), lo que sugiere que estos tienen una menor dependencia por los sustratos que otros dinoflagelados epibénticos. Así, la mayor tolerancia a estar expuestos a altas intensidades de luz podría ser una ventaja adaptativa que favorecería la estrategia ecológica picoplánctónica que caracteriza a estos dos géneros. Sin embargo, tal y como se observó en otros estudios de campo (Cohu y Lemée, 2012; Bravo *et al.*, 2020; capítulo 2) las abundancias celulares de *Ostreopsis* fueron siempre superiores a las de *Coolia* bajo las mismas intensidades de luz. La razón detrás de la dominación consistente de *Ostreopsis* en la superficie parece reflejar una mejor adaptación de este género a las condiciones lumínicas

presentes en la superficie. De acuerdo con esta observación, los resultados obtenidos por Heil *et al.* (1993) bajo condiciones experimentales de laboratorio sugirieron que altas intensidades de luz podrían inducir a las células de *Ostreopsis* a agregarse produciendo capas mucus para protegerse, lo que podría representar una estrategia competitiva para proliferar sobre otros dinoflagelados epibentónicos como *Coolia* en zonas poco profundas.

La luz no influyó significativamente en la distribución con la profundidad de los otros géneros estudiados, pero, en cualquier caso, el aumento consistente en la abundancia celular por debajo de 5 m, con máximos a 10 m de profundidad (*Gambierdiscus*) y a 20 m (*Prorocentrum* y *Amphidinium*) sugiere que estos géneros están bien adaptados a condiciones de poca luz, lo que contrasta fuertemente con los géneros *Ostreopsis* y *Coolia*. Sin embargo, en este contexto *Gambierdiscus* pareció tener un comportamiento diferente al de *Prorocentrum* y *Amphidinium*. El hecho de que *Gambierdiscus* tuviera sus mayores densidades celulares a 10 m de profundidad en la época de muestreo más cálida (agosto), sugiere que su nicho ecológico óptimo asociado a la luz se encuentra en torno a los niveles encontrados a esa profundidad, y que los valores por encima o por debajo de ella ya se encuentran cerca del límite superior e inferior de tolerancia a la luz respectivamente. Por otro lado, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, presentaron sus mayores abundancias celulares en el tiempo de muestreo más cálido (agosto) a 20 m de profundidad, lo que sugiere que la ventana lumínica óptima de este género podría extenderse por debajo del entorno lumínico registrado a esa profundidad.

Los resultados obtenidos en el área de estudio indican que los géneros de dinoflagelados BHAB estudiados presentan diferentes preferencias ecológicas asociadas a la luz, las cuales son en parte responsables de su distribución vertical. De esta manera, los cinco géneros pueden ordenarse de acuerdo a su decreciente tolerancia a la luz: *Ostreopsis* < *Coolia* < *Gambierdiscus* < *Prorocentrum* y *Amphidinium*.

4.2.3. Temperatura del agua

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la temperatura del agua fue el parámetro que menos influyó en la abundancia celular y distribución vertical de la comunidad de dinoflagelados BHAB. Esto contrasta con la mayoría de estudios, en los que la temperatura del agua se ha considerado tradicionalmente uno de los parámetros que mayor influencia tiene en el crecimiento de estos organismos. Aun así, este estudio demostró que la temperatura del agua tenía una influencia significativamente positiva en el crecimiento de *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, pero esta parecía estar mucho más relacionada con el gradiente temporal (tiempos de muestreo), donde las diferencias de temperatura fueron mayores que las observadas en el gradiente vertical. Esto fue evidenciado por el registro de mayores concentraciones celulares en todas las profundidades en agosto, el mes más cálido, y una menor abundancia celular en abril, el mes más frío. Por el contrario, la distribución con la profundidad observada para *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* no puede atribuirse de manera directa a la influencia de la temperatura del agua, ya que la abundancia celular de estos géneros fue, en la mayoría de los casos, mayor a 10 - 20 m de profundidad, donde se registraron temperaturas ligeramente inferiores a las registradas a 5 m. A diferencia de lo observado para estos géneros, la temperatura del agua podría haber contribuido, además, a la distribución vertical observada para *Coolia*, ya que su abundancia celular siempre disminuyó con la profundidad al mismo tiempo que se registraron sutiles descensos de la temperatura del agua.

De acuerdo con los resultados de este estudio, la temperatura del agua no influyó en la abundancia celular y distribución observada para *Ostreopsis*. Este hecho podría haber enmascarado la influencia global de este parámetro sobre la comunidad de dinoflagelados BHAB, ya que *Ostreopsis* fue siempre el género más abundante en todas las profundidades y tiempos estudiados. Sin embargo, es importante destacar que el crecimiento de *Ostreopsis* parece verse favorecido, como se pudo observar a partir de su dinámica temporal, por una

menor temperatura del agua en comparación con el resto de géneros: las densidades celulares máximas se registraron en abril, cuando se registró la temperatura media del agua más baja de este estudio. Esto contrasta con lo que se ha descrito de manera general en zonas más templadas, como el mar Mediterráneo, donde las proliferaciones de *Ostreopsis* a menudo coinciden con temperaturas del agua relativamente altas. Sin embargo, también hay algunos estudios llevados a cabo en esa región en los que se ha observado que las mayores abundancias de este género no están siempre asociadas de manera necesaria a las temperaturas más altas del agua (Accoroni y Totti, 2016). En este sentido, Accoroni *et al.* (2014) sugirieron que, aunque se necesita un umbral de temperatura relativamente alto para desencadenar el inicio de una proliferación de *Ostreopsis* (probablemente asociada a la germinación de sus quistes), el mantenimiento de una alta abundancia celular en fases posteriores de la proliferación puede darse a temperaturas más bajas. De acuerdo con estas observaciones, los resultados de los experimentos de laboratorio llevados a cabo por Scalco *et al.* (2012) con diferentes cultivos de *O. cf. ovata* aislados en el mar Mediterráneo, sugirieron que la fotosaturación en condiciones de alta temperatura e irradiación podría ser también responsable de la aparición de proliferaciones fuera del periodo más cálido del año. Así, en concordancia con las observaciones llevadas a cabo en el mar Mediterráneo y aquellas realizadas en otras zonas del archipiélago (capítulo 2), en las que ya se ha documentado la existencia de altas concentraciones celulares de *Ostreopsis* durante la mayor parte del año, las observaciones realizadas en este estudio demuestran que las proliferaciones celulares de *Ostreopsis* en las Islas Canarias no están necesariamente asociadas a las temperaturas más altas del agua.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que dentro del régimen templado-cálido que presentan las aguas de El Hierro, los géneros de dinoflagelados BHAB estudiados muestran diferentes afinidades de temperatura: *Ostreopsis* (afinidad por una menor temperatura del agua) < *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* (afinidad por una mayor temperatura del agua).

4.2.4. Otros parámetros ambientales

Además de los parámetros ya comentados en esta sección, otros parámetros contribuyeron sin duda en la distribución y dinámica de la comunidad de dinoflagelados BHAB en la isla de El Hierro. En este sentido, varios estudios llevados a cabo en otras áreas geográficas han identificado y documentado la influencia que tienen, por ejemplo, la competencia entre diferentes géneros de dinoflagelados BHAB y otras especies de microalgas (García-Portela *et al.*, 2016), las posibles interacciones alelopáticas con las macroalgas (Accoroni *et al.*, 2015), la depredación por otros organismos, como los peces herbívoros (Loeffler *et al.*, 2015), las concentraciones de nutrientes (Fricke *et al.*, 2018) o la salinidad (Tawong *et al.*, 2016) en el crecimiento de estos organismos. Como ya se ha descrito en la sección de métodos, la influencia de algunos de estos parámetros (es decir, la cobertura de macroalgas y la salinidad) fue minimizada en la medida de lo posible mediante la selección del lugar de estudio. A pesar de que la contribución global de otros parámetros a la variación observada en la comunidad de dinoflagelados BHAB no fue analizada en este estudio, cuando esta se compara con la influencia de las tres principales variables predictoras identificadas en El Hierro, es decir, el movimiento del agua, la luz y la temperatura del agua, esta resulta mucho menor (~16% de la variación explicada). Por lo tanto, la capacidad de otros parámetros como predictores de los patrones de distribución vertical y temporal del BHAB parece ser limitada en el sur de El Hierro, y es por ello que no se recomienda su medición durante las labores de seguimiento de dinoflagelados BHAB realizados en esta parte del archipiélago.

4.3. Variabilidad temporal en la abundancia celular y distribución vertical de *Gambierdiscus* spp.

En las Islas Canarias, los primeros casos de intoxicación por ciguatera (CP), un síndrome humano de origen alimentario causado por las neurotoxinas que

producen especies del género *Gambierdiscus* (Chinain *et al.*, 2021), fueron registrados a principios de este siglo, y hoy en día suponen el mayor riesgo para la salud humana relacionado con microalgas en la región (Pérez-Arellano *et al.*, 2005; Boada *et al.*, 2010; Núñez *et al.*, 2012). Debido a la repercusión que puede tener en la salud pública de las Islas Canarias, el género *Gambierdiscus* fue investigado en detalle en el sur de la isla de El Hierro para aclarar los patrones ecológicos de sus especies a través de gradientes de distribución verticales y temporales.

Cuatro de las seis especies del género *Gambierdiscus* descritas en el archipiélago, es decir, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus* y *G. excentricus* fueron identificadas en el área de estudio. *G. excentricus* y *G. belizeanus* fueron fácilmente discriminadas entre las cuatro especies a partir de características morfológicas únicas; la excentricidad del Po (R2) y un patrón de la superficie celular fuertemente areolada, respectivamente. En el caso de *G. australes* y *G. caribaeus*, las relaciones entre las suturas de las placas (R1 y R2) fueron lo suficientemente informativas para poder discriminar entre ellas. Sin embargo, los análisis moleculares realizados a partir de los cultivos establecidos de dos estas especies facilitaron la observación de estas características morfológicas, pues permitieron asociar inequívocamente sus secuencias genéticas con los fenotipos mostrados por las células del cultivo, para ser después reconocidos en las células presentes en las muestras de campo. A diferencia de estas tres especies, *G. belizeanus* nunca se detectó durante el análisis cuantitativo. Por lo tanto, su contribución al patrón de distribución vertical observado para el género puede considerarse insignificante.

La distribución de *Gambierdiscus* en el sur de El Hierro se caracterizó por una marcada dominancia de *G. caribaeus* en todas las profundidades y tiempos de muestreo (60 - 85% de la abundancia celular total) y, por lo tanto, el patrón de distribución vertical ya descrito para el género reflejó en gran medida el patrón vertical de esta especie. Este resultado, junto con una proliferación masiva de esta especie documentada por Soler-Onís *et al.* (2016) en un punto de muestreo cercano, sugiere que las condiciones ambientales presentes en el sur de la isla de El Hierro favorecen la dominancia de *G. caribaeus* sobre el resto de especies

del género. La distribución con la profundidad de *G. australes*, la segunda especie más abundante (10 - 35% de la abundancia celular total), fue similar a la de *G. caribaeus* en todos los tiempos de muestreo, lo que indica que ambos comparten requerimientos ecológicos muy similares. Así, las dos especies mostraron una distribución vertical y estacional que sugiere, como se había observado anteriormente a nivel de género, una afinidad por temperaturas altas del agua, una adaptación a niveles bajos de luz y una baja tolerancia al movimiento del agua. Las mayores densidades de estas especies se registraron a 10 m de profundidad en los meses más cálidos (agosto y noviembre), a temperaturas dentro de su rango óptimo de temperatura tal y como se ha observado de manera previa bajo condiciones experimentales (Ramilo *et al.*, 2021), mientras que sus densidades más bajas se registraron a 10 m en el mes más frío (abril). Esta distribución también sugiere que, cuando sus requerimientos térmicos se cumplen, estas especies parecen tener preferencia por las intensidades de luz intermedias que se encuentran a 10 m de profundidad. Esta observación concuerda con los resultados experimentales obtenidos por Xu *et al.* (2016) para *G. caribaeus*, los cuales demostraron que, a la temperatura que produce sus máximas tasas de crecimiento, esta especie crecía mejor en el nivel de irradiación más alto evaluado.

En este estudio, *G. excentricus* fue la especie menos abundante (0 - 15% de la abundancia celular total) y la que presentó la distribución más restringida, pues sólo estuvo presente a 10 y 20 m en abril y agosto. De acuerdo con su distribución latitudinal, *G. excentricus* es considerada, en comparación con otras especies del género, como una especie adaptada a aguas más frías (Tester *et al.*, 2020). De acuerdo con esta observación, los experimentos de laboratorio realizados por Ramilo *et al.* (2021) sobre la influencia de la temperatura en el crecimiento de las especies de *Gambierdiscus* de las Islas Canarias han demostrado que *G. excentricus* presenta un rango térmico óptimo menor que *G. caribaeus* y *G. australes* y, por lo tanto, produce su máximo crecimiento (0,08 divisiones día⁻¹) a temperaturas 2,5 - 3,5 °C menores que las otras dos especies (25 °C). Estos experimentos también han demostrado que la tasa de crecimiento de *G. excentricus* es la más baja de las tres especies (0,08 frente a 0,18 divisiones día⁻¹) a las temperaturas que producen sus máximas tasas de

crecimiento. Estos resultados pueden explicar por qué *G. excentricus* presentó, en todos los casos, las abundancias celulares más bajas.

Los datos ambientales registrados en este estudio no permitieron explicar por qué no se detectó *G. excentricus* en noviembre. Sin embargo, la explicación más plausible es que las condiciones ambientales entre agosto y noviembre podrían haber resultado desfavorables para esta especie. En este sentido, las temperaturas máximas diarias de la superficie del mar (*Sea Surface Temperatures*, SSTs) entre agosto y noviembre (>25 °C, Fig. 8), podrían haber superado el límite superior de tolerancia térmica de *G. excentricus*. Esto sugiere que el límite superior de tolerancia térmica de esta especie en el campo es menor que el registrado en condiciones controladas de laboratorio (29 °C, Ramilo *et al.*, 2021). A pesar de que todavía se conoce muy poco sobre las estrategias de “hibernación” de *Gambierdiscus*, una posible explicación para la desaparición de *G. excentricus* en noviembre podría estar relacionada con la formación de formas de resistencia (quistes) bajo condiciones ambientales desfavorables (Anderson *et al.*, 2003). Sin embargo, los quistes de este género no se han observado hasta ahora en muestras de campo. Por el momento, sólo hay pruebas de observaciones de laboratorio realizadas en cultivos de *Gambierdiscus balechii* Fraga, Rodríguez y Bravo, (Fraga *et al.*, 2016). En cualquier caso, las observaciones realizadas en este estudio indican que las especies de *Gambierdiscus* presentan una fenología diferente, pero se requieren más estudios para comprender mejor la variabilidad temporal de *G. excentricus* en el campo.

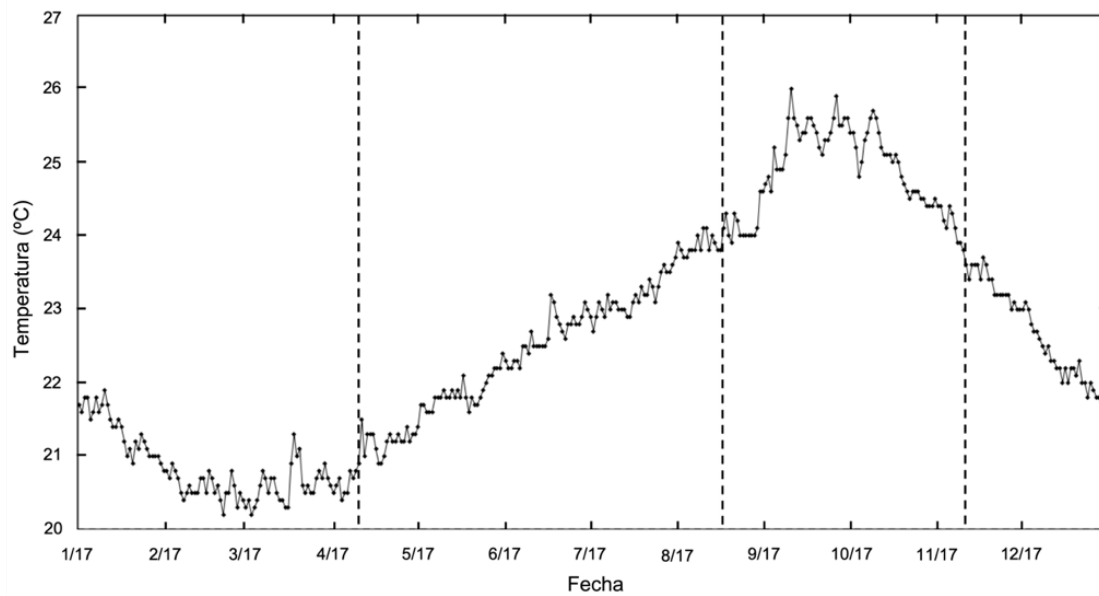


Figura 8. SSTs máximas diarias en el área de la “Punta de Los Saltos” durante el año 2017. Las líneas punteadas indican los tiempos en los que se realizaron los muestreos: 25 - 26 de abril, 17 - 18 de agosto y 6 - 7 de noviembre. Datos proporcionados por el Servicio de Vigilancia del Medio Marino de Copernicus (CMEMS, <http://marine.copernicus.eu/>).

Como se ha comentado en la sección 4.1, la temperatura del agua tuvo una influencia positiva en el género *Gambierdiscus*, por lo que su distribución vertical no pudo asignarse directamente a este parámetro. Sin embargo, debido a su afinidad por aguas más frías, la influencia de la temperatura del agua en la distribución vertical de *G. excentricus* no puede ser descartada, ya que podría haber actuado favoreciendo el crecimiento de esta especie por debajo de los 5 m de profundidad. Aunque las diferencias de temperatura registradas entre niveles de profundidad en el presente estudio fueron muy pequeñas, éstas podrían haber sido suficientes para favorecer su crecimiento. Los resultados obtenidos por Kibler *et al.* (2012) en condiciones experimentales, donde pequeñas diferencias de tan sólo 1 °C en la temperatura del agua afectaron en gran medida a los potenciales de crecimiento de las especies de *Gambierdiscus*, avalan esta hipótesis. La distribución vertical de *G. excentricus* estuvo, además, muy probablemente influenciada por la ya comentada baja tolerancia de *Gambierdiscus* a altas intensidades lumínicas, la cual podría haber sido incluso más baja que para las otras dos especies, pudiendo así haber sido responsable

de su desaparición a 5 m en agosto. Lamentablemente, la influencia de la luz en esta especie aún no se ha evaluado experimentalmente.

Antes de este estudio, *G. excentricus* había sido identificado en todas las islas del archipiélago canario excepto en El Hierro (Rodríguez *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2019, 2020; Tudò *et al.*, 2020). Tudò *et al.* (2020) sugirieron que las aguas de El Hierro, que son las más cálidas del archipiélago, podrían resultar inadecuadas para el crecimiento de esta especie debido a su afinidad por aguas más frías en comparación con otras especies del género. Sin embargo, en estos estudios el muestreo se realizó en lugares costeros relativamente poco profundos entre septiembre y noviembre, cuando los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado una menor probabilidad de encontrar *G. excentricus*.

De acuerdo con las observaciones realizadas en este estudio, la distribución espacial de *Gambierdiscus* propuesta para las Islas Canarias podría haber estado sesgada por las restringidas épocas y rangos de profundidad considerados en estudios anteriores. Algunos de los estudios realizados en la región han sugerido que las especies de este género se distribuyen de acuerdo al gradiente de la SST que existe entre las aguas cálidas de las islas occidentales y las aguas frías de las islas orientales (Rodríguez *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2019, 2020; Tudò *et al.*, 2020; Ramilo *et al.*, 2021). Tudò *et al.* (2020) ya advirtieron la dificultad de explicar la distribución de este género basándose de forma exclusiva en la SST, y reconocieron que, o bien la información sobre la distribución de *Gambierdiscus* spp. podría permanecer aún incompleta, o que otros parámetros ambientales diferentes al gradiente de temperatura podrían estar influyendo en ella.

Aunque la necesidad de realizar más estudios para comprender mejor la diversidad, concentración y distribución de este género en el archipiélago es innegable, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el conjunto de diferentes condiciones ambientales creadas por los gradientes de profundidad a escala local debe considerarse junto con los procesos que ocurren a mayor escala para evitar "jugar al escondite" con algunas especies del género

Gambierdiscus. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que esto es especialmente relevante en dos situaciones: i) en lugares muy expuestos cuando se realizan muestreos durante periodos en los que el movimiento del agua es alto, lo que puede impedir la presencia de *Gambierdiscus* spp. en zonas poco profundas (por ejemplo, de 0 a 5 m) y ii) en las islas occidentales de aguas cálidas como El Hierro, donde las especies adaptadas a aguas más frías, como *G. excentricus*, presentan distribuciones más restringidas en comparación con otras especies. Esta última consideración es de especial importancia en el escenario actual de cambio climático (IPCC, 2013). A medida que aumenta la temperatura del agua se espera que estas especies busquen refugio térmico en zonas más profundas durante los períodos más cálidos del año (Tester *et al.*, 2020). De ser cierto, en los próximos años algunas especies, como *G. excentricus*, podrían desaparecer de los primeros metros de la franja infralitoral (0 - 20 m) en El Hierro, y empezar a desaparecer de zonas cercanas a la superficie (0 – 5 m) en otras islas, siguiendo el gradiente térmico de oeste (cálido) a este (frío) presente en la región.

Bibliografía

Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichiéri, S., Totti, C., 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 34, 7–16.

Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: A review. *Advances in Oceanography and Limnology* 7, 1-15. *Harmful Algae* 117 (2022) 102271

Anderson, D.M., Fukuyo, Y., Matsuoka, K., 2003. Cyst methodologies. *Manual on harmful marine microalgae, Monographs on oceanographic methodology* 11, 165-190.

Bartón, K., 2019. MuMIn: multi-model inference. R package version 1.43.6. Beck, M.W., 2017. ggord: Ordination Plots with ggplot2. R package version 1.0.0.

Boada, L.D., Zumbado, M., Luzardo, O.P., Almeida-González, M., Plakas, S.M., Granade, H.R., Abraham, A., Jester, E.L.E., Dickey, R.W., 2010. Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon* 56 (8), 1516-1519.

Boisnoir, A., Pascal, P.Y., Cordonnier, S., Lemée, R., 2018. Depth distribution of benthic dinoflagellates in the Caribbean Sea. *Journal of Sea Research* 135, 74-83.

Braun, J., Molina, M., 1988. El mar, el Atlántico en el área de Canarias. In: Afonso, L., Galán, F.M., Rodríguez-Martín, J.A. (Eds.), *Geografía de Canarias. Interinsular Canaria, Santa Cruz de Tenerife*, pp. 18–28.

Bravo, I., Rodríguez, 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.

Bravo, I., Rodríguez, F., Ramilo, I., Afonso-Carrillo, J., 2020. Epibenthic harmful marine dinoflagellates from Fuerteventura (Canary Islands), with special reference to the ciguatoxin-producing *Gambierdiscus*. *Journal of Marine Science and Engineering* 8 (11), 909.

Chinain, M., Gatti, C.M.I., Darius, H.T., Quod, J.P., Tester, P.A., 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae* 102, 101873.

Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cahiers de Biologie Marine* 53, 373–380.

David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., Orive, E., 2020. *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *European Journal of Phycology* 55 (1), 76–88.

Edler, L., Elbrächter, M., 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microsc. Mol. Methods Quant. Phytoplankt. Anal.* 13–20.

Estrada, M., Berdalet, E., 1998. Effects of turbulence on phytoplankton. In: Anderson, D. M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series, vol. G 41. Springer-Verlag, Berlin, pp. 601-618.

Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine environmental research*, 76, 97-107.

Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., Zapata, M., 2008. *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of phycology* 44 (4), 1060–1070.

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.* 21:662–4.

Funaki, H., Gaonkar, C. C., Kataoka, T., Nishimura, T., Tanaka, K., Yanagida, I., Abe, S., Yamaguchi, H., Nagasaki, K., Adachi, M., 2022. Horizontal and vertical distribution of *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) including novel phylotypes in Japan identified by 18S rDNA metabarcoding. *Harmful Algae*, 111, 102163.

GEOHAB, 2012. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark.

Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Belin, C., Bottein, M.Y.D., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C.H., Sunesen, I., Pitcher, G.C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P.A., Trainer, V.L., Yñiguez, A. T., Zingone, A., 2021. Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. *Communications Earth & Environment* 2.

Harrison, X.A., Donaldson, L., Correa-Cano, M.E., Evans, J., Fisher, D.N., Goodwin, C.E. D., Robinson, B.S., Hodgson, D.J., Inger, R., 2018. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ* 6, e4794.

Heil, C.A., 1993. Mucus-associated dinoflagellates: large scale culturing and estimation of growth rate. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 501–506.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2013. Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), *Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge and New York, pp. 1535.

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.

Jauzein, C., Açaf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116–127.

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.

Kibler, S. R., Tester, P. A., Kunkel, K. E., Moore, S. K., Litaker, R. W., 2015. Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Ecological Modelling*, 316, 194-210.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H., 2017. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *Journal of statistical software* 82, 1–26.

Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J., Tester, P.A., 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. *Journal of phycology* 39 (4), 754–761.

Lobel, P.S., Anderson, D.M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of Ciguatera Dinoflagellate Populations: Sample variability and algal substrate selection. *Biol. Bull.*

Mabrouk, L., Hamza, A., Brahim, M. ben, Bradai, M.N., 2011. Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia. *Marine Ecology* 32, 148–161.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfun'e, A., Cabrini, M., Cattaneo-vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Gossel, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Maria, A., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lem'ee, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, 408–420.

Monti, M., Cecchin, E., 2012. Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions. *Cryptogamie Algol* 33, 113–119.

Nishimura, T., Uchida, H., Noguchi, R., Oikawa, H., Suzuki, T., Funaki, H., Ihara, C., Hagino, K., Arimitsu, S., Tanii, Y., Abe, S., Hashimoto, K., Mimura, K., Tanak, K., Yanagida, I., Adachi, M., 2020. Abundance of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum* and the diversity, distribution, and diarrhetic shellfish toxin production of *Prorocentrum lima* complex and *P. caipirignum* in Japan. *Harmful Algae*, 96, 101687.

Núñez, D., Matute, P., García, A., García, P., Abadía, N., 2012. Outbreak of Ciguatera Food Poisoning by consumption of amberjack (*Seriola* spp.) in the Canary Islands, May 2012. *Eurosurveillance* 17 (23), 20188.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, Eduard, M.H., Wagner, H., 2019. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.

Parsons, M.L., Aligizaki, K., Bottein, M.-Y.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.

Pérez-Arellano, J.L., Luzardo, O.P., Pérez Brito, A., Hernández Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Ángel-Moreno, A., Dickey, R.W., Boada, L.D., 2005. Ciguatera Fish Poisoning, Canary Islands. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1981–1982.

R Core Team, 2016. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

Ramilo, I., Figueroa, R.S., Rayón-Viña, F., Cuadrado, A., Bravo, I., 2021. Temperature-dependent growth and sexuality of the ciguatera producer dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. in cultures established from the Canary Islands. *Harmful Algae* 110.

Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R.I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity ‘hotspot’ of *Gambierdiscus*: implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae* 67, 131–143.

Rodríguez, F., Riobó, P., Crespín, G.D., Daranas, A.H., de Vera, C.R., Norte, M., Fernández, J.J., Fraga, S., 2018. The toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum maculosum* Faust is a synonym of *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. *Harmful Algae* 78, 1–8.

Richlen, M.L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 421, 51–66.

Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., Anderson, D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30, 999–1011.

Santos, M., Oliveira, P.B., Moita, M.T., David, H., Caeiro, M.F., Zingone, A., Amorim, A., Silva, A., 2019. Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal bays (SW Iberia): Insights from the plankton. *Harmful algae* 86, 20–36.

Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A., Montresor, M., 2012. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. *Harmful Algae* 17, 25–34.

Harmful Algae 117 (2022) 102271.

Berdalet, E., Tester, P.A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., Zingone, A., 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30 (1), 36-45.

Besada, E.G., Loeblich, L.A., Loeblich III, A.R., 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bull. Mar. Sci.* 32 (3), 723-735.

Betancor, S., Tuya, F., Gil-Díaz, T., Figueroa, F.L., Haroun, R., 2014. Effects of a submarine eruption on the performance of two brown seaweeds. *Journal of Sea Research* 87, 68-78.

Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae* 32, 1-10.

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algal News* 55, 15-17.

Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2016. Temperature and salinity effects and toxicity of *Gambierdiscus caribaeus* (Dinophyceae) from Thailand. *Phycologia*, 55(3), 274-278.

Tester, P.A., Vandersea, M.W., Buckel, C.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Davenport, E.D., Clark, R.D., Edwards, K.F., Taylor, J.C., Vander Pluym, J.L., Hickerson, E.L., Litaker, R.W., 2013. *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species diversity in the flower garden banks national marine sanctuary, Northern Gulf of Mexico, USA. *Harmful Algae* 29, 1-9.

Tester, P.A., Litaker, R.W., Berdalet, E., 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* 91, 101655.

Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/ benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D.M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin, pp. 293–314 vol. G 41.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233-239.

Tudó, A., Gaiani, G., Rey Varela, M., Tsumuraya, T., Andree, K.B., Fernández- Tejedor, M., Campas, M., Diogène, J., 2020. Further advance of *Gambierdiscus* species in the Canary Islands, with the First Report of *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins* 12 (11), 692.

Tuya, F., Cisneros-Aguirre, J., Ortega-Borges, L., Haroun, R.J., 2007. Bathymetric segregation of sea urchins on reefs of the Canarian Archipelago: role of flow-induced forces. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73, 481–488.

Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 51–60.

Villareal, T.A., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 6 (2), 253–259.

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), e0153197

Material suplementario

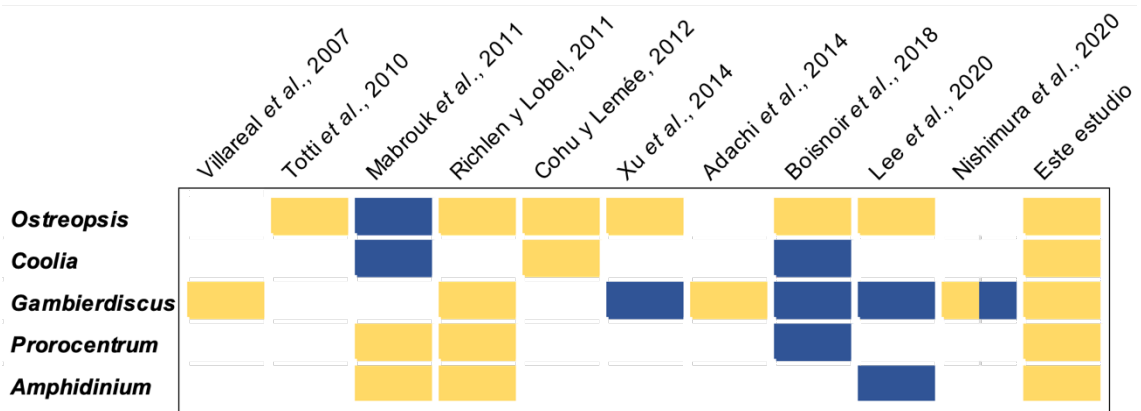


Figura S1. Patrones de distribución vertical observados en estudios anteriores. El color amarillo indica que el patrón documentado por un estudio coincide con el patrón observado en el presente estudio, mientras que el color azul indica lo contrario.

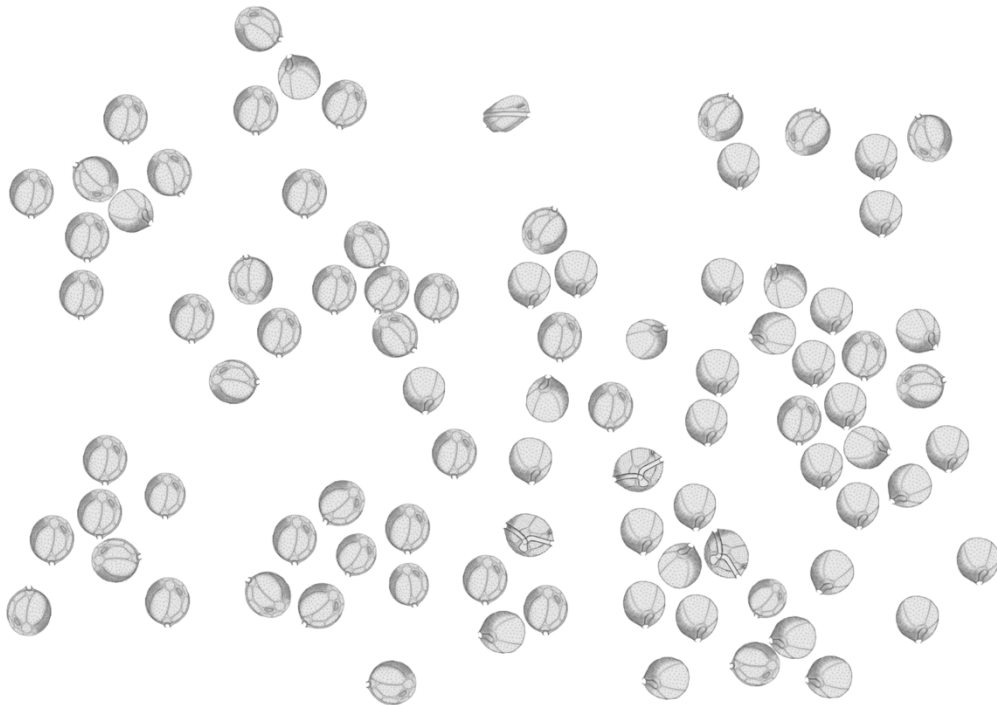
Tabla S1. Resumen de las estrategias de muestreo seguidas en los estudios de campo que evaluaron la concentración celular y distribución con la profundidad de dinoflagelados BHAB (sólo se consideran los estudios realizados a partir de 5 m de profundidad). Los datos relativos al presente estudio aparecen indicados en color azul.

Área de estudio	Nº sitios de muestreo	Nº tiempos muestreo/sitio	Rango de profundidad (m)	Nº niveles de profundidad	Disposición de niveles de profundidad	Hábitat(s)	Sustrato	Normalización de la concentración celular	Replicación	Factores ambientales registrados	Géneros/ especies de dinoflagelados BHAB	Referencia
Conero Rivera, Italia (Mar Mediterráneo)	2	1	0.5 - 9	4	Transecto?	Fondo rocoso cubierto por macroalgas	Distintas especies de macroalgas	Cél cm ⁻²	Sin especificar	Movimiento agua (visualmente)	O. cf. ovata	Totti et al., 2010
Maldia, Túnez (Mar Mediterráneo)	1	2	3 - 12	4	Transecto	Pradera monoespecífica de <i>Posidonia Oceanica</i>	<i>P. oceanica</i>	Cél g ⁻¹	3	Temperatura Salinidad Movimiento agua (visualmente)	<i>O. siamensis</i> ; <i>C. monolis</i> ; <i>P. lima</i> ; <i>P. rathymum</i> ; <i>P. concavum</i> ; <i>A. carterae</i>	Mabrouk et al., 2011
Atolón de Johnston, EE. UU. (Océano Pacífico)	14	1	2 - 13	7	Dispersos	Distintos hábitats de arrecife sin categorizar	<i>Caulerpa serrulata</i>	Cél g ⁻¹	≥ 10	Movimiento agua	<i>O. ovata</i> ; <i>O. lenticularis</i> ; <i>O. siamensis</i> ; <i>Gambierdiscus</i> spp.; <i>P. concavum</i> ; <i>P. emarginatum</i> ; <i>P. lima</i> ; <i>P. cf. rathymum</i> ; <i>A. cf. carterae</i> ; <i>A. cf. Meibsil</i>	Richten y Lobel, 2011
Villefranche, Francia (Mar Mediterráneo)	2	1	0.2 - 30	7	Transecto	Fondo rocoso cubierto por macroalgas	Distintas especies de macroalgas	Cél g ⁻¹	3	Temperatura PAR	<i>O. cf. ovata</i> ; <i>C. monolis</i> ; <i>P. lima</i>	Cohu y Lemée, 2012
Miaraki, Kiribati (Océano Pacífico)	4	1	2 - 15	2	Transecto	Macroalgas y coral muerto	<i>Hallimeda</i> sp. (macroalga)	Cél g ⁻¹	2 - 7	-	<i>Ostreopsis</i> spp.; <i>G. belizeanus</i> <i>G. carpenteri</i> ; <i>G. pacificus</i>	Xu et al., 2014
Islas Virgenes de los EE.UU. (Océano Pacífico)	3	2	10 - 20	2	Transecto	-10% de cobertura de coral duro, y una combinación de fondo duro, parches de arena, coral muerto con algas, turf algae y macroalgas	Malla galvanizada recubierta de zinc	Cél cm ⁻²	7 - 8	Movimiento agua Nutrientes Ramoneo peces	<i>Gambierdiscus</i> spp.	Loeffler et al., 2015
Achipléago de Guadalupe, Francia (Mar Caribe)	1	2	0 - 20	9	Transecto (aunque profundidades de transectos diferentes son comparadas)	Pradera monoespecífica e ininterrumpida de <i>Halgilla stipitata</i>	<i>Halgilla stipitata</i>	Cél g ⁻¹	3	Temperatura Salinidad	<i>Ostreopsis</i> spp.; <i>Coelia</i> spp.; <i>Gambierdiscus</i> spp.; <i>Prorocentrum</i> spp. <i>Amphidinium</i> spp.	Bolsnoir et al., 2018
Islas Penhantian, Malasia (Océano Pacífico)	5	2 - 10	1 - 20 (25)	Sin especificar	Dispersos	8 hábitats distintos categorizados tales como: macroalgas, turf algae, corales, rocas, sedimentos o invertebrados	Redes fibra plástica	Cél cm ⁻²	Sin especificar (elevada)	Temperatura Luz	<i>Ostreopsis</i> spp.; <i>Coelia</i> spp.; <i>Gambierdiscus</i> spp.; <i>Prorocentrum</i> spp.; <i>Amphidinium</i> spp.	Lee et al., 2020
Shikoku, Japón Okinawa, Japón (Océano Pacífico)	2	15 y 16	3 - 30	3 y 7	Transecto	Fondos cubiertos por macroalgas sin describir	Distintas especies de macroalgas	Cél g ⁻¹	1 - 2	-	<i>P. lima</i> ; <i>P. calvirigrum</i> ; <i>Prorocentrum</i> spp. sin describir	Nishimura et al., 2020
El Hierro, Islas Canarias, España (Océano Atlántico)	1	3	5 - 20	3	Transecto	Fondo rocoso cubierto por macroalgas	Redes fibra plástica enmarcadas	Cél cm ⁻²	7	Temperatura Luz Movimiento agua	ver Tabla I	Este estudio

CAPÍTULO

4

EL GÉNERO *COOLIA* MEUNIER EN LAS ISLAS CANARIAS



Ilustraciones realizadas por Meunier (1919) para la descripción de *Coolia monotis*

Resumen del capítulo

La mayor parte de los estudios sobre dinoflagelados bentónicos realizados en las Islas Canarias se han centrado en el género *Gambierdiscus* por ser el productor de las toxinas relacionadas con los casos de Ciguatera (CP) acaecidos en la región a partir del año 2004. Los resultados obtenidos durante este tiempo han mostrado que este género está formado por una notable diversidad de especies. Además, estos estudios también han documentado la presencia de otros géneros bentónicos potencialmente tóxicos (BHAB) en la región. A pesar de que la diversidad observada para *Gambierdiscus* sugiere que la riqueza de especies de estos géneros podría ser también alta, hasta el momento esta permanece siendo en gran parte desconocida. El presente capítulo se centró en el estudio de la diversidad y distribución de *Coolia*, un género BHAB cuya taxonomía ha resultado controvertida en los últimos años a raíz del descubrimiento de una considerable diversidad críptica. Para ello, se recogieron muestras en localidades situadas en todas las islas del archipiélago canario, a partir de las cuales se establecieron con éxito un total de 50 cultivos que permitieron realizar análisis moleculares complementarios a los análisis morfológicos basados en la región LSU del ADNr. Además, también se realizaron análisis morfológicos directamente en muestras recogidas en el medio marino. Como resultado, se identificaron un total de seis especies, es decir, *C. areolata*, *C. canariensis*, *C. malayensis*, *C. monotis*, *C. palmyrensis* y *C. tropicalis*, aunque en algunas especies esto solo fue posible de acuerdo a sus diferencias genéticas. Junto con la reciente descripción de *C. guanchica* en la isla de Tenerife, los resultados obtenidos en este estudio permiten situar a las Islas Canarias como la región del mundo que alberga la mayor diversidad del género hasta el momento con siete de las ocho especies taxonómicamente aceptadas, lo que a su vez supone un aumento en el número de especies potencialmente tóxicas que deben ser tenidas en consideración durante el estudio y seguimiento de BHABs en esta región. Además, los análisis filogenéticos señalaron la presencia de un nuevo filogrupo del “complejo *C. canariensis*” en Canarias, incrementando la diversidad críptica aún por dirimir que presenta este género en el archipiélago. Por último, las identificaciones realizadas en este estudio también permitieron observar que *C. malayensis* es la especie que parece presentar la distribución más amplia en la región, mientras que esta podría ser más restringida para el resto de especies.

1. Introducción

En las últimas décadas, el aumento de las proliferaciones producidas por dinoflagelados bentónicos se ha convertido en motivo de gran preocupación debido a la capacidad de algunas especies (especies BHAB) para sintetizar potentes biotoxinas o mucilagos, o ambos, que pueden afectar la salud humana y los ecosistemas marinos (Berdalet *et al.*, 2016). A pesar de su relevancia, el conocimiento sobre la biodiversidad de este grupo ha permanecido en gran parte desconocido durante años. La clásica descripción de nuevas especies, basada casi de manera exclusiva en características morfológicas de la célula, y a veces escasa en detalles, ha sido reconocida como un motivo importante para ello (Durán-Riveroll *et al.*, 2019), pues algunas especies presentan fenotipos muy similares que, *a priori*, pueden resultar indistinguibles. La introducción de las técnicas moleculares en los estudios taxonómicos sobre dinoflagelados bentónicos a partir de finales del siglo XX ha facilitado advertir la existencia de una inusitada diversidad dentro de este grupo (Hoppenrath *et al.*, 2014). En algunos casos, lo que se consideraba una única especie ha resultado ser en realidad un conjunto de especies cuya morfología difiere en pequeños y sutiles detalles que hasta entonces habían pasado desapercibidos, o a los que no se les había concedido mayor importancia (Fraga *et al.*, 2014), lo que ha permitido posteriores descripciones taxonómicas. En otros casos, tras el reconocimiento de la existencia de diferencias genéticas significativas, estas no se han podido asociar a diferencias morfológicas claras para la descripción de nuevas especies, dificultando la consideración taxonómica de los especímenes evaluados (Ott *et al.*, 2022). De manera general, el conjunto de estas “especies” es referido como "diversidad críptica" (Mann y Evans, 2008), y su existencia es de especial relevancia en el caso de los géneros que incluyen especies potencialmente tóxicas, pues supone un impedimento en los estudios ecológicos y programas de seguimiento de especies HAB para distinguir entre las especies tóxicas de las que no lo son.

Este es el caso de *Coolia* Meunier, un género erigido a principios del siglo pasado por el naturalista Alphonse François Meunier con una única especie, es decir, *Coolia monotis* Meunier (Meunier, 1919), a partir de una muestra de agua recogida años atrás en Nieuwpoort (Bélgica) por su amigo farmacéutico de apellido Cool, al cual dedicaría su nombre.

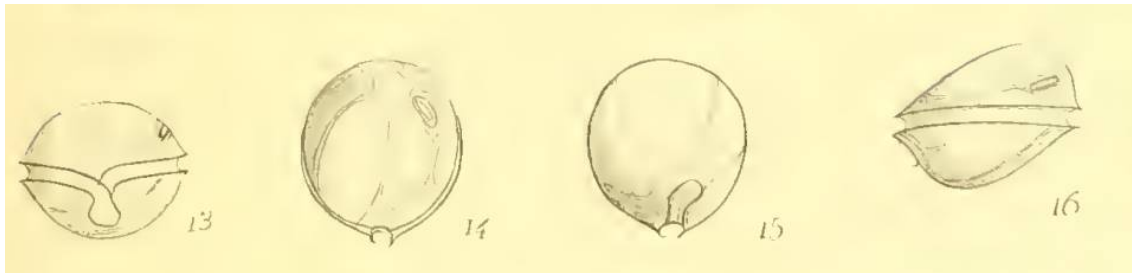


Figura 1. Ilustraciones realizadas por Meunier para la descripción de *Coolia monotis* (Meunier, 1919)

Durante décadas, *Coolia* fue considerado un género monoespecífico y ampliamente distribuido en diferentes regiones del planeta. Después, se describieron dos nuevas especies, *Coolia tropicalis* Faust y *Coolia areolata* Ten-Hage, Turquet, Quod y Couté (Faust 1995; Ten-Hage *et al.* 2000, respectivamente), y se observó la existencia de una notable variabilidad morfológica apoyada por la existencia de diferencias genéticas entre especímenes de *C. monotis* aislados en diferentes regiones del mundo (p. ej. Penna *et al.*, 2005), sugiriendo la existencia de una diversidad críptica asociada a esta especie. *Coolia canariensis* Fraga fue la primera especie en ser descrita combinando técnicas morfológicas y moleculares (Fraga *et al.*, 2008). En su estudio, los autores mostraron que *C. canariensis* se separaba filogenéticamente en dos clados o filogrupos; sin embargo, no se documentaron diferencias morfológicas entre ellos (David *et al.*, 2014). Subsecuentemente, Nascimento *et al.* (2019) y Phua *et al.* (2021) encontraron dos nuevos filogrupos para los que tampoco se documentaron diferencias morfológicas, reforzando así la existencia de una diversidad críptica dentro del conocido como “complejo *C. canariensis*”. Leaw *et al.* (2010) describieron *Coolia malayensis* Leaw, Lim y Usu con un morfotipo similar al de *C. monotis* y redefinieron la especie *C. monotis sensu*

stricto, mientras que Karafas *et al.* (2015) describieron *Coolia santacroce* Karafas, Tomas y York y *Coolia palmyrensis* Karafas, Tomas, York a partir de especímenes cuyas morfologías también se ajustaban a la variabilidad morfológica ya reconocida dentro de la descripción original de esta especie. En la actualidad, estas cuatro especies forman el “complejo *C. monotis*”, un conjunto de especies considerado pseudocríptico pues, a pesar de su gran similitud, existen características sutiles en la morfología de sus integrantes que, de acuerdo con Leaw *et al.* (2010) y Karafas *et al.* (2015), hacen posible su diferenciación mediante el uso de técnicas microscópicas, a pesar de lo cual el uso de la biología molecular fue indicado por estos autores para confirmar las identificaciones. La validez de estas diferencias fue después cuestionada en algunos estudios (p. ej. Gómez *et al.*, 2016). *Goolia guanchica* David, Laza-Martínez, Rodríguez y Fraga ha sido la última especie en ser descrita (David *et al.*, 2020).

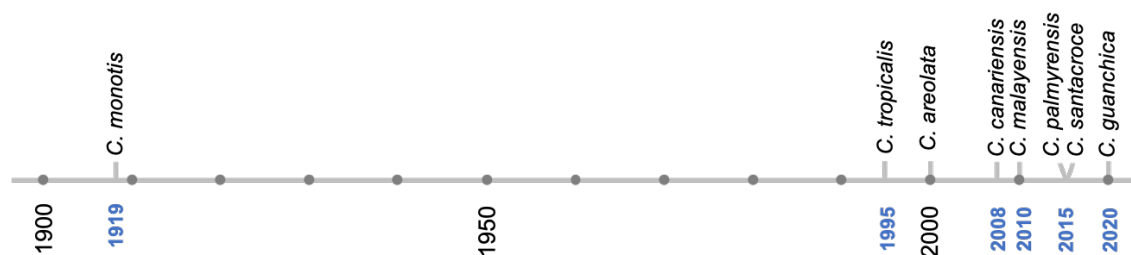


Figura 2. Cronología de la descripción de especies que forman el género *Coolia*.

La controversia taxonómica que ha caracterizado a este género ha dificultado la evaluación de la toxicidad de sus especies. La toxicidad de *Coolia* se documentó por primera vez a principios de la década de los 80 (Nakayima *et al.*, 1980), y estudios posteriores la asignaron a la única especie descrita en aquel momento, es decir, *C. monotis* (p. ej. Nakayima *et al.*, 1981; Holmes *et al.*, 1995; Rhodes y Thomas 1997; Rhodes *et al.*, 2010). Tras la redefinición de *C. monotis sensu stricto* y la descripción de nuevas especies dentro de “complejo *C. monotis*”, no se han vuelto a documentar indicios de toxicidad durante experimentos llevados a cabo con cultivos de esta especie (Leaw *et al.*, 2016). En la actualidad, cuatro

especies, es decir, *C. tropicalis*, *C. malayensis*, *C. santacroce* y *C. palmyrensis*, están consideradas como potenciales productores de moléculas como cooliatoxinas y otros análogos de las yesotoxinas (YTXs) (Holmes *et al.*, 1995; Wakeman *et al.*, 2015) y, más recientemente, de análogos maiotoxinas (MTX) (Tibiriçá *et al.*, 2020), que pueden ser tóxicas para invertebrados, ratones y líneas celulares humanas *in vitro* (referencias en Lassus *et al.* 2016).

La comprensión de la biogeografía de las especies de *Coolia* también se ha visto afectada por la incertidumbre taxonómica en cultivos y muestras de campo (Larsson *et al.*, 2019). Durante años se consideró que *C. monotis* era una especie cosmopolita (p. ej. Hallegraeff *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos autores sugirieron que la distribución de esta especie podría haber sido sobreestimada al haber abarcado las biogeografías particulares de las otras especies que forman el “complejo *C. monotis*” (Leaw *et al.*, 2016). La combinación de técnicas morfológicas y moleculares en los estudios realizados en los últimos años ha permitido empezar a delimitar mejor los patrones de distribución específicos dentro del género. En la actualidad, *C. malayensis* es la especie que presenta la distribución más amplia, pues ha sido documentada desde zonas tropicales a zonas templadas del océano Atlántico y el Océano Pacífico, así como en el Océano Índico, el Mar Mediterráneo y el Mar Caribe (Leaw *et al.*, 2016; Gómez *et al.*, 2016; Larsson *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021; Abdennadher *et al.*, 2021; Phua *et al.*, 2021; Morquecho *et al.*, 2022). *Coolia palmyrensis* presenta también una distribución relativamente amplia, que incluye zonas tropicales y subtropicales del Océano Pacífico, así como del Océano Atlántico Occidental (Larsson *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.*, 2020; Phua *et al.*, 2021; Morquecho *et al.*, 2022). Por el contrario, las otras dos especies del “complejo *C. monotis*” parecen tener una distribución más limitada; tras su redefinición, *C. monotis* ha quedado restringida a regiones templadas del hemisferio norte, donde se ha documentado principalmente en el Mar Mediterráneo y el norte de Océano Atlántico (Leaw *et al.* 2016; Lewis *et al.*, 2018; Larsson *et al.*, 2019; Alvaréz *et al.*, 2022), mientras que *C. santacroce* presenta la distribución más restringida del “complejo *C. monotis*”, permaneciendo únicamente documentada hasta la fecha en aguas tropicales y subtropicales del Océano Atlántico Occidental (Karafas *et al.*, 2015;

Tibiriçá *et al.* 2020). *C. tropicalis* ha sido principalmente observada en zonas tropicales del Océano Pacífico Occidental, y también del Océano Atlántico Occidental y Océano Índico Occidental (Larsson *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Phua *et al.*, 2021; Morquecho *et al.*, 2022). Por último, *C. areolata*, *C. canariensis* y *C. guanchica* presentan las distribuciones más limitadas dentro del género, permaneciendo hasta la fecha restringidas básicamente a sus localidades tipo (Fraga *et al.*, 2008; Ten-Hage *et al.*, 2000; David *et al.*, 2020). Cabe señalar que la distribución de *C. canariensis* podría haber estado siendo también sobreestimada, como ocurrió con *C. monotis*, al considerar la distribución de otros miembros del “complejo *C. canariensis*” (p. ej. Leaw *et al.*, 2016; Larsson *et al.*, 2019).

Pese a los avances realizados en los últimos años, la distribución mundial de este género resulta todavía tentativa, y resulta necesario realizar más estudios en regiones en las que el conocimiento es limitado o inexistente para seguir clarificando los patrones de distribución de las distintas especies. El caso de las Islas Canarias resulta llamativo; a pesar de incluir las localidades tipo de dos especies, es decir, *C. canariensis* y *C. guanchica* (Fraga *et al.*, 2008; David *et al.*, 2020), aún no se ha realizado ningún estudio exhaustivo en la actualidad centrado en conocer la diversidad y distribución del género en esta región. Estudios previos han mostrado que este archipiélago subtropical reúne una destacada biodiversidad de biota terrestre y marina (Moro-Abad *et al.*, 2013), que se explica por la combinación de características climáticas y oceanográficas singulares (p. ej. Hernández *et al.*, 2013) y por su historia geoambiental (Fernández-Palacios y Whittaker, 2008). Los estudios realizados en las Islas Canarias también han documentado la existencia de una notable diversidad de dinoflagelados marinos, en la que se incluye varios representantes bentónicos (Ojeda, 1998; Afonso-Carrillo, 2014). En particular, la región ha sido recientemente señalada como un punto caliente o “hotspot” de biodiversidad de *Gambierdiscus* (Rodríguez *et al.*, 2017; Tudó *et al.*, 2020), un género intensamente investigado a raíz de su evidenciada implicación en los casos de ciguatera acaecidos en las Islas Canarias a partir del año 2004, y que a menudo se ha observado formando parte de las mismas comunidades

microfitobentónicas que *Coolia* (p. ej. Bravo *et al.*, 2019). Todo ello sugiere que el género *Coolia* podría estar representado en esta región por un número de especies mayor del que se supone en la actualidad.

En este contexto, se ha investigado por primera vez la diversidad y distribución del género *Coolia* en las Islas Canarias. Los resultados obtenidos en este estudio son relevantes para la investigación y seguimiento de dinoflagelados BHAB dentro en esta región, al mismo tiempo que permiten seguir clarificando la taxonomía y los patrones de distribución de las especies que forman este género a escala global.

2. Material y métodos

2.1. Recogida y tratamiento de muestras

Este estudio se llevó a cabo en las Islas Canarias entre septiembre de 2013 y febrero de 2019, y en él participaron cuatro grupos de investigación: el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA) La Ràpita, la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), el Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO) y El Observatorio Canario de Algas Nocivas (OCHAB). Durante dicho periodo se visitaron un total de 85 localidades situadas en todas las islas principales del archipiélago (Tabla I). Los puntos de muestreo abarcaron una variedad de hábitats marinos situados en los primeros metros de la franja infralitoral superior (hasta 20 metros de profundidad) a los que se accedió mediante equipos de *snorkel* y buceo. La estrategia de muestreo implicó la recogida de distintas especies de macroalga y sustratos artificiales, siguiendo los procedimientos detallados en el capítulo 2. Adicionalmente se recogieron muestras de sedimento en algunas localidades, siguiendo los procedimientos detallados en Hopperanth *et al.* (2014). Una vez fuera del agua las células de dinoflagelados se desprendieron de sus sustratos (macroalgas y sustratos artificiales) mediante agitación vigorosa durante 1 minuto. Para separar las macroalgas y los sustratos artificiales del agua de mar que contenía las células, las muestras se filtraron con

un tamiz de 150 μm . Después, las muestras de agua de mar se depositaron en recipientes de plástico donde se dejó que las células sedimentaran. A diferencia de estas muestras, las muestras de sedimento no fueron filtradas. En todos los casos, una parte de la muestra se fijó de forma inmediata con formaldehído al 4% en agua de mar, mientras que otra parte se mantuvo viva. Las muestras vivas se mantuvieron alejadas de la luz directa a una temperatura $< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el laboratorio, las muestras vivas se procesaron de manera inmediata para evaluar la presencia de células de *Coolia* que permitieran el establecimiento de cultivos monoclonales para su análisis morfológico y genético. A partir de este punto, los materiales y los métodos empleados por cada grupo de investigación difirieron ligeramente. Con el objetivo de simplificar su descripción, sólo se detallan los materiales y los métodos empleados por el OCHAB.

El aislamiento de las células se llevó a cabo mediante un microscopio invertido LEICA DMI3000 B (LEICA, Alemania) utilizando capilares estériles obtenidos tras la modificación de pipetas Pasteur de vidrio (VWR, España). Cada célula se transfirió de forma individual a un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos que contenía 2 ml de medio de cultivo f/10 (a base de agua de mar filtrada). Las placas se mantuvieron a una temperatura de $22 - 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo un ciclo de luz:oscuridad de 8:16 h, con luz fluorescente blanca y una tasa de flujo de fotones de $10 - 40\text{ }\mu\text{mol de fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Cuando los pocillos alcanzaron un número suficiente de células (> 100 células), estas se transfirieron a placas Petri de vidrio (Anumbra[®]) de 6 cm de diámetro con 20 ml del medio de cultivo que fueron mantenidas en las mismas condiciones de laboratorio referidas anteriormente.

Tabla I. Localidades de muestreo investigadas en las Islas Canarias entre los años 2013 y 2019. H (El Hierro), LP (La Palma), G (La Gomera), TF (Tenerife), GC (Gran Canaria), FTV (Fuerteventura), LZ (Lanzarote) y La Graciosa (GR).

Ref.	Isla	Localidad	Ref.	Isla	Localidad
1	H	El Tamaduste	44	TF	Punta Hidalgo
2	H	La Caleta	45	TF	La Tejina
3	H	La Restinga	46	GC	Puerto de Las Palmas
4	H	Los Saltos	47	GC	Piscinas de La Laja
5	H	Tacorón	48	GC	Taliarte
6	H	El Desierto	49	GC	Melenara
7	H	Orchilla	50	GC	Risco Verde
8	H	Charco Azul	51	GC	Arinaga
9	H	Charco Los Sargos	52	GC	Juan Grande
10	H	La Maceta	53	GC	Maspalomas
11	H	Las Calcosas	54	GC	Pasito Blanco
12	H	Charco Manso	55	GC	Playa de Amadores
13	LP	Puerto Espindola	56	GC	Piscinas de Agaete
14	LP	Charco Azul	57	GC	Sardina del Norte
15	LP	Puerto Trigo	58	GC	Las Canteras
16	LP	Aeropuerto de la Palma	59	FTV	Dunas de Corralejo
17	LP	La Salemera	60	FTV	Puerto Lajas
18	LP	La Cabras	61	FTV	Salinas del Carmen
19	LP	Fuencaliente	62	FTV	Las Playitas
20	LP	Punta Larga	63	FTV	Gran Tarajal
21	LP	Charco Verde	64	FTV	Risco del Paso
22	LP	Playa Nueva	65	FTV	Muelle de Morro Jable
23	LP	Tazacorte	66	FTV	Playa de los Charcos
24	LP	Punta Gorda	67	FTV	Caleta de Marrajo
25	LP	Fajana de franceses	68	FTV	El Charcón
26	LP	Fajana de Barlovento	69	FTV	Majanicho
27	G	Hermigua	70	FTV	El Río
28	G	Playa de Ávalos	71	FTV	Muelle Isla de Lobos
29	G	San Sebastián	72	LZ	Arrecife
30	G	Puerto Santiago	73	LZ	Puerto Calero
31	G	Valle Gran Rey	74	LZ	Playa Blanca
32	G	Charco del Conde	75	LZ	Los Charcones
33	G	Alojera	76	LZ	Montaña Bermeja
34	G	Arguamul	77	LZ	La Santa
35	TF	San Andrés	78	LZ	Caleta Caballo
36	TF	Puerto de Santa Cruz	79	LZ	Punta Fariones
37	TF	El Poris de Abona	80	LZ	Caletón Blanco
38	TF	El Medano	81	GR	Caleta de Sebo
39	TF	La Galletas	82	GR	El Salado
40	TF	Playa de las Cuevitas	83	GR	Playa Francesa
41	TF	Los Gigantes	84	GR	Montaña Amarilla
42	TF	Punta de Teno	85	GR	Baja del Corral
43	TF	Charco del Viento			

2.2. Análisis Morfológicos

El análisis morfológico de las células se realizó a partir de muestras procedentes de cultivos establecidos con éxito. En el caso de *C. areolata*, el análisis morfológico se realizó directamente a partir de muestras recogidas en el medio marino como consecuencia de la ausencia de cultivos celulares. En el caso de *C. guanchica*, el análisis morfológico se realizó a partir de una muestra preservada en formaldehído (4%) suministrada por la Universidad del País Vasco. En todos los casos, las células fueron observadas por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las células procedentes de los cultivos se preservaron añadiendo formaldehído (4%) en el medio de cultivo. Para evitar cualquier forma teratológica, las células se extrajeron de los pocillos tan pronto como el cultivo alcanzó un número suficiente de estas que permitiera llevar a cabo su análisis morfológico. Este paso no fue necesario en el caso de las células recuperadas directamente de las muestras recogidas en el medio marino, dado que estas ya habían sido fijadas anteriormente. En todos los casos, las muestras se filtraron con filtros de policarbonato Isopore™ (diámetro: 13 mm, tamaño de poro: 5 µm, Millipore®, Irlanda) mediante filtración suave, se enjuagaron en agua destilada y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (10, 30, 60, 80 y 100%) durante 10 minutos cada una. A continuación, los filtros se montaron en portafiltros (Sigma-Aldrich, Alemania), se secaron durante una noche a 50 °C y se recubrieron con oro-paladio utilizando un metalizador Polaron E5000 (Polaron PLC, Reino Unido). Una vez finalizado este proceso, las muestras se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6380 LV (JEOL, Japón) en el Departamento de Biodiversidad Micro-Morfológica-Reproductiva (Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" - Unidad asociada al CSIC, Gran Canaria, España).

Algunas de las principales características morfológicas analizadas en este estudio fueron las dimensiones de la célula (longitud AP, profundidad DV y anchura); la longitud del Po; el tamaño y posición de la placa 4' o la ornamentación de la superficie celular. Para la numeración de las placas tecaes se siguió el sistema de tabulación kofoidiano (Kofoid, 1909) modificado por Besada *et al.* (1982).

2.3. Extracción del ADN y amplificación por PCR

La extracción y amplificación del ADN se realizó a partir de la biomasa obtenida en los cultivos monoclonales establecidos en este estudio. De cada cultivo se recogieron 1 - 2 ml mediante centrifugación (13000 rpm) utilizando una centrífuga MiniSpin® (Eppendorf, EE. UU.). Los pellets se enjuagaron en 1 ml de agua destilada, se centrifugaron de nuevo y, tras desechar el sobrenadante, se congelaron a -20°C hasta su análisis. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región D1 - D3 de la subunidad larga (LSU) del ADN ribosomal se realizó utilizando un *mastermix* para PCR (Takara Bio, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los cebadores D1R - LSUB (Scholin *et al.*, 1994; Litaker *et al.*, 2003) para un volumen final de 25 µl. El protocolo de PCR consistió en 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 seg, alineamiento a 55 °C durante 30 seg y elongación a 72 °C durante 1 min y un paso final de elongación a 72 °C durante 10 seg. Los productos de PCR se purificaron con un kit de purificación QIAquick® (Quiagen, Alemania) y se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen Spain.

2.4. Análisis filogenético de las secuencias de la LSU del ADN

Las secuencias amplificadas se inspeccionaron visualmente y se alinearon utilizando el alineamiento múltiple CLUSTALW en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Los análisis filogenéticos de la LSU del ADNr incluyeron un total de 82 secuencias de *Coolia* spp. y dos secuencias de *Ostreopsis* spp. que se utilizaron para enraizar el árbol. El alineamiento original del LSU incluía 977 posiciones, incluyendo los huecos y los datos que faltaban. Las secuencias de *Coolia* spp. obtenidas en este estudio oscilaron entre 451 - 929 pb.

Las relaciones filogenéticas para la LSU se determinaron utilizando análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) en MEGA X, y la inferencia filogenética bayesiana (Mr. Bayes v3.2.4; Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Antes de los análisis de ML, se realizó una prueba para encontrar el modelo de sustitución del ADN que mejor se ajustaba en MEGA X. Se considera que el modelo con el Criterio de Información Bayesiano más bajo es el que mejor describe el patrón de sustitución. El modelo más apropiado para los datos de LSU fue el modelo Tamura-Nei (T93 + I + G; Tamura y Nei, 1993), con proporción de sitios invariables I = 8,90% y parámetro de forma gamma, G = 2,470. Se eliminaron todas las posiciones que contenían huecos y datos perdidos y se obtuvo un total de 961 posiciones en el conjunto de datos final. Los valores Bootstrap se estimaron a partir de 1000 réplicas.

La elección de los modelos de sustitución en los análisis bayesianos (BA) se realizó mediante el muestreo en todo el espacio de modelos GTR de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de Mr. Bayes v3.2. Los parámetros del programa fueron statefreqpr = dirichlet (1,1,1,1), nst = mixed, rates = gamma. Los análisis filogenéticos incluyeron dos análisis paralelos, cada uno con cuatro cadenas. Los árboles iniciales para cada cadena se seleccionaron al azar utilizando los valores por defecto del programa. El número correspondiente de patrones de sitios únicos fue de 780. El número de generaciones utilizadas en estos análisis fue de 1 000 000. Las probabilidades posteriores se calcularon a partir de cada 100 árboles muestreados después de la estabilización de la log-verosimilitud (fase de "burn-in"). Todas las frecuencias finales de división fueron < 0,02. Los árboles filogenéticos se representaron utilizando los resultados de ML y los valores bootstrap de ML, y los valores de probabilidad posterior de BA. Las distancias genéticas medias netas ($dA = dXY - (dX + dY) / 2$), donde dXY es la distancia media entre los grupos X e Y, y dX y dY son las distancias medias

dentro de los grupos (Nei, 1987), se calcularon entre los clados de *Coolia* a partir del alineamiento original de la LSU del ADNr utilizando el software MEGA 7.

3. Resultados

3.1. Diversidad de *Coolia* en las Islas Canarias

Los análisis morfológicos y filogenéticos realizados a partir de 50 aislamientos de *Coolia*, junto con los análisis morfológicos realizados directamente a partir de las células de *Coolia* presentes en muestras recogidas en el medio marino, permitieron identificar un total de seis especies en el área de estudio, es decir, *C. areolata*, *C. canariensis*, *C. tropicalis*, *C. malayensis*, *C. monotis* y *C. palmyrensis*.

3.1.1. Análisis morfológicos

Todas las especies identificadas en este estudio presentaron la misma fórmula tecal: Po, 4', 6", 6c, 6?s, 5"', 2''''.

***Coolia monotis* Meunier**

Células esféricas, con una ligera compresión anteroposterior y una longitud AP de 21,2 a 34,4 μm ($28,6 \pm 3,3 \mu\text{m}$, $n = 62$), una anchura de 18,5 a 31,3 μm ($24,8 \pm 3,0 \mu\text{m}$, $n = 60$) y una profundidad DV de 24,5 a 32,2 μm ($27,6 \pm 2,2 \mu\text{m}$, $n = 17$). Superficie tecal lisa y con poros redondeados, de 0,22 a 0,4 μm de diámetro ($0,29 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $n=19$) (Fig. 3). Po con una longitud de 6 a 9,2 μm ($7,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $n = 20$). Relación entre las longitudes de la Po y de la placa 2' de 0,67 – 0,71 μm ($n=13$). Placa 4' larga, estrecha y situada en el lado central izquierdo de la célula en vista apical (Fig. 3A y B). Placa 5" es la más grande de la epiteca y ocupa casi todo el lado derecho de la célula en vista apical (Fig. 3B). Número de poros

en las placas 4' y 5'' > 50. Placa 6'' cuadrangular (Fig. 3A y B), con una longitud de 4,8 a 7,2 μm ($6,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$), una anchura de 3,7 a 5,4 μm ($4,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$) y una relación A/L de 1,1 a 1,3 ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$) (n = 25).

Localidad tipo: Deswartes, Nieuport, Bélgica.

Distribución en Canarias: Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura.

Distribución mundial: Océano Atlántico Norte, Mar Mediterráneo

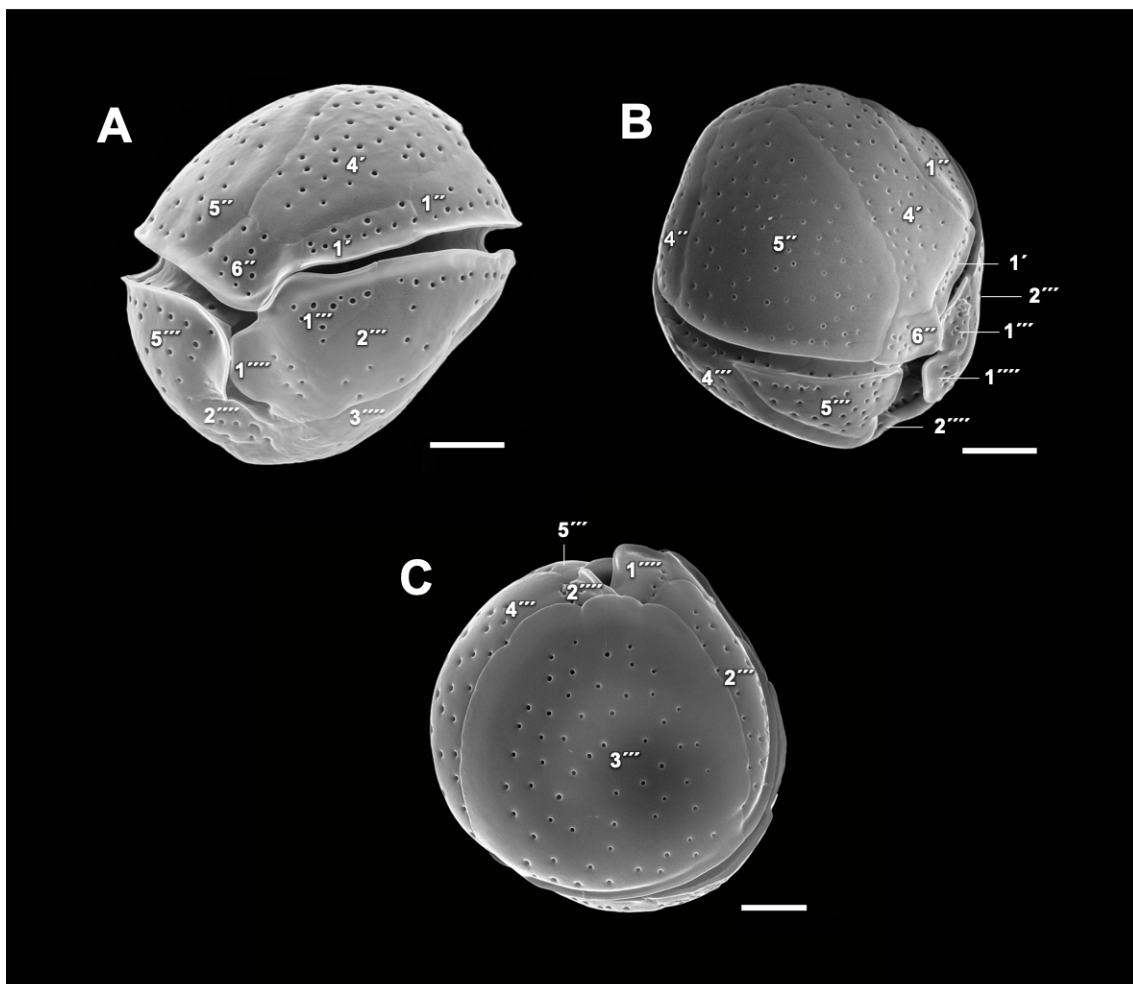


Figura 3. Imágenes de MEB de *C. monotis*: (A) vista ventral, (B) vista apical-lateral derecho (C) vista antapical. Barra de escala: 5 μm . Autor: E. Soler.

***Coolia malayensis* Leaw, Lim y Usup**

Células esféricas, comprimidas anteroposteriormente y con una longitud AP de 20,7 a 26,3 μm ($23,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $n = 27$), una anchura de 19,2 a 26,0 μm ($23,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $n = 35$) y una profundidad DV de 20,8 a 25,9 μm ($23,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $n = 9$). Superficie tecal lisa, con poros de redondeados a ovalados de 0,17 a 0,29 μm de diámetro ($0,24 \pm 0,03 \mu\text{m}$, $n = 24$) y distribuidos de forma irregular (Fig. 4). Po de 5,6 a 6,3 μm de longitud ($5,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$, $n = 8$). Relación entre las longitudes de la Po y de la placa 2' de 0,62 – 0,68 μm ($n=6$). Placa 4' larga, estrecha y situada en el lado central izquierdo de la célula en vista apical (Fig. 4A y B). Placa 5" es la más grande de la epiteca, ocupando casi todo el lado derecho de la célula en vista apical (Fig. 4A y B). Número de poros > 50 en la placa 4' y entre 30 - 50 en la placa 5''. Placa 6" pequeña, casi tan ancha como larga (Fig. 4B), con una longitud de 4,1 a 5,7 μm ($4,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$), una anchura de 3,7 – 4,5 μm ($4,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$) y una relación A/L de 1,1 – 1,3 μm ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$) ($n = 9$).

Localidad tipo: Kota Kinabalu, Sabah, Malasia.

Distribución en Canarias: El Hierro, La Palma, La Gomera, Tenerife, Gran Canaria, Fuerteventura, Lanzarote, La Graciosa.

Distribución mundial: Océano Atlántico, Mar Caribe, Mar Mediterráneo, Océano Índico, Oceano Pacífico

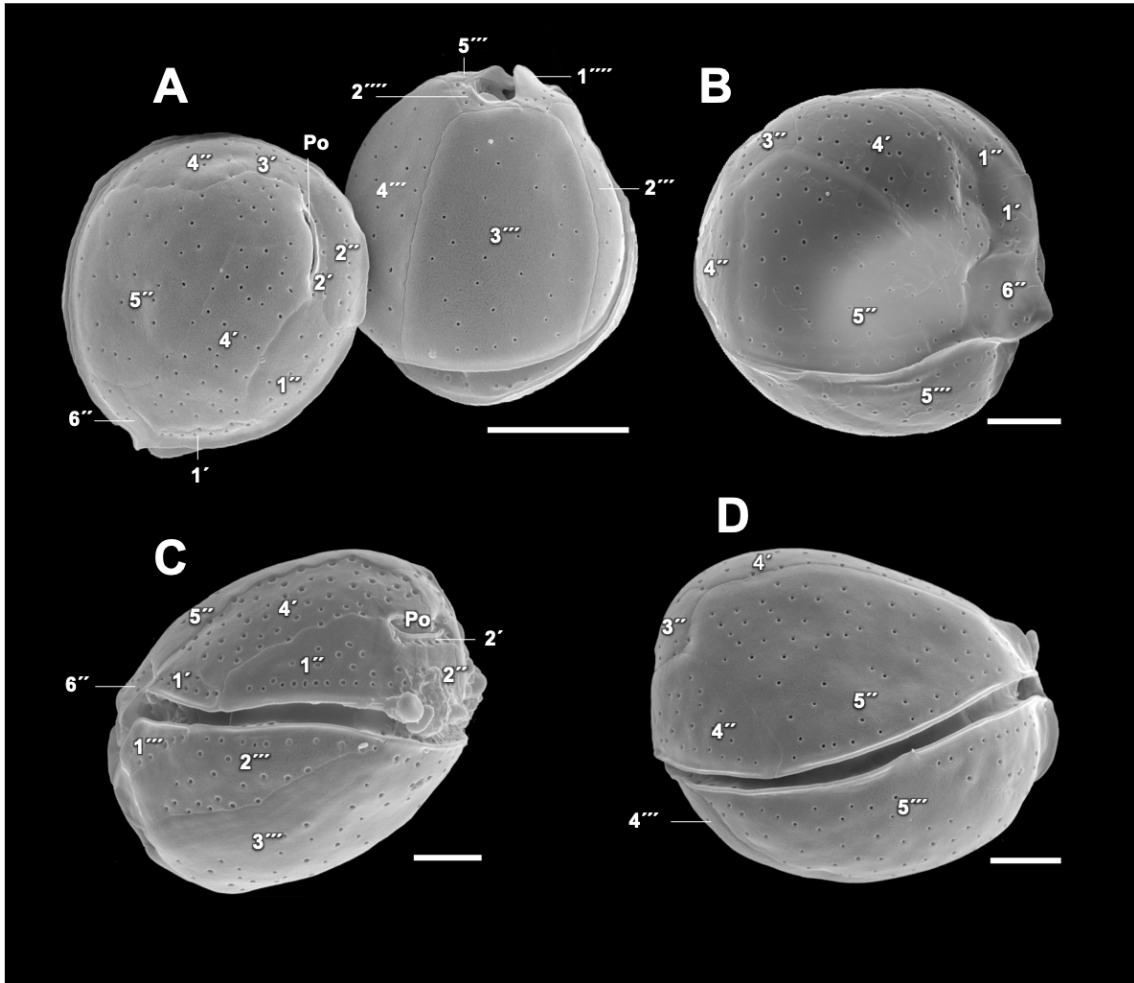


Figura 4. Imágenes de MEB de *C. malayensis*: **(A)** vista apical y antapical, **(B)** vista apical-lateral derecho **(C)** lateral izquierdo, **(D)** lateral derecho. Barra de escala: A= 10 μm ; B, C, D= 5 μm . Autor: E. Soler.

***Coolia palmyrensis* Karafas, Tomas y York**

Células subesféricas con una longitud AP de 18,9 a 26,4 μm ($22,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$, $n = 27$), una anchura de 21,2 a 27,1 μm ($23,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$, $n = 37$) y una profundidad DV de 19,7 a 24,2 μm ($21,9 \pm 1,4 \mu\text{m}$, $n = 13$). Superficie tecal lisa cubierta por poros con un diámetro entre 0,17 y 0,32 μm ($0,23 \pm 0,04 \mu\text{m}$, $n = 22$) distribuidos al azar (Fig. 5). Po de 4,9 a 6 μm longitud ($5,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$, $n = 11$). Relación entre las longitudes de la Po y de la placa 2' de 0,58 – 0,68 μm ($n=8$). Placa 4' situada en el lado central izquierdo de la epiteca en vista apical (Fig. 5). Placa 5'' es la más grande de la epiteca, y ocupa la mayor parte del lado derecho de la célula

(Fig. 5). Número de poros en las placas 4' y 5'' ~ 20. Placa 6'' con una longitud de 4,4 a 5,8 μm ($5,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$), una anchura de 3,3 a 4,5 μm ($3,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$) y una relación A/L de 1,1 – 1,3 μm ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$) (n = 15).

Localidad tipo: Atolón de Palmyra, Pacífico Central, EE. UU.

Distribución en Canarias: Tenerife, Lanzarote.

Distribución mundial: Océano Atlántico Norte y Suroeste, Mar Caribe, Océano Pacífico Oeste, Central y Noreste.

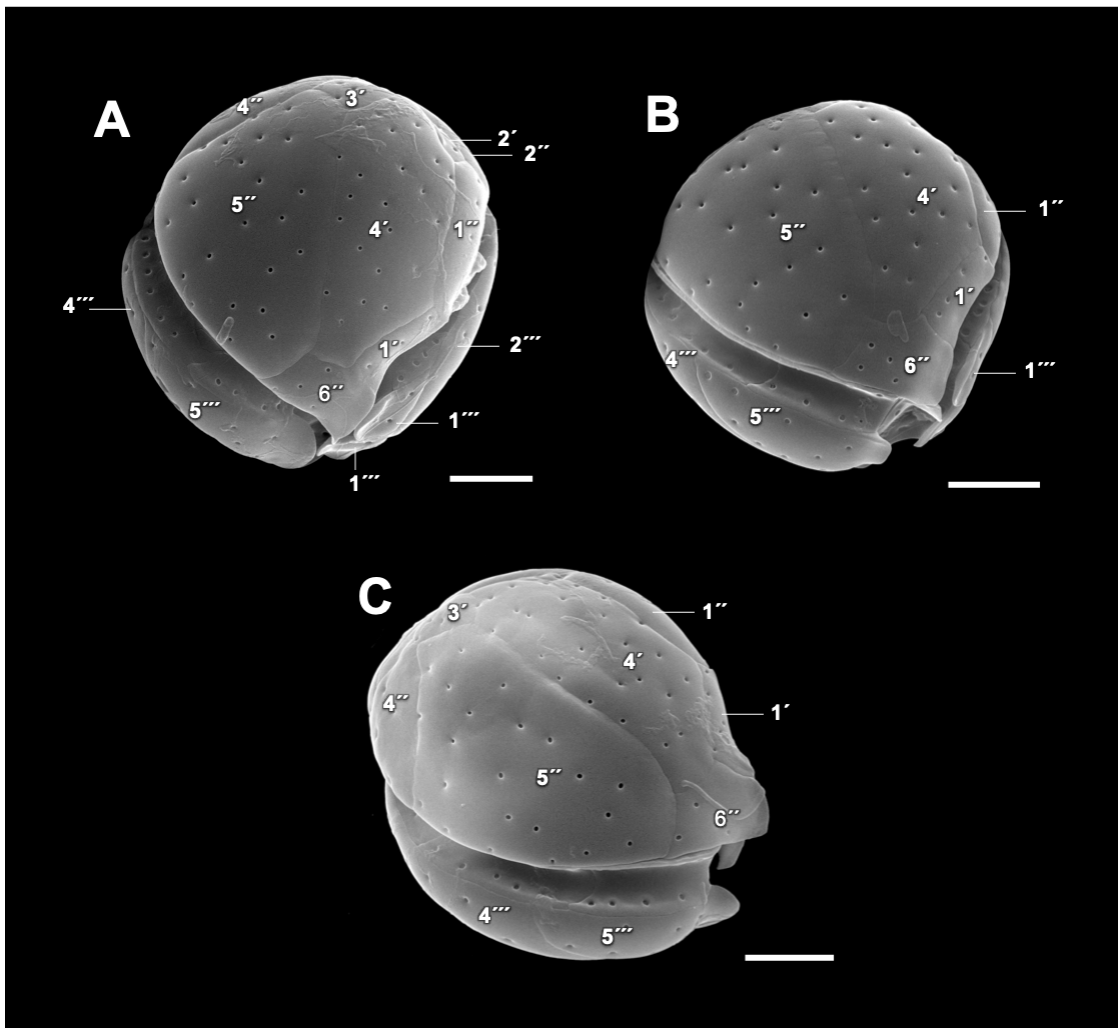


Figura 5. Imágenes de MEB de *C. palmyrensis*: (A) y (B) vista apical-ventral, (C) vista apical-lateral derecho. Barra de escala: 5 μm . Autor: E. Soler.

***Coolia canariensis* Fraga**

Células esféricas, con una longitud AP de 27,5 a 39 μm ($31,3 \pm 2,8 \mu\text{m}$, $n = 32$), una anchura de 25,1 a 40,9 μm ($31,7 \pm 3,5 \mu\text{m}$, $n = 53$) y una profundidad DV de 24,7 a 39,4 μm ($30,9 \pm 3,7 \mu\text{m}$, $n = 23$). La epiteca presenta una ornamentación diferente a la de la hipoteca; mientras que la primera es lisa, la segunda presenta un aspecto rugoso (Fig. 6). Superficie tecal con poros dispersos de 0,17 y 0,41 μm de diámetro ($0,28 \pm 0,05 \mu\text{m}$, $n = 36$) de forma ovalada a redondeada (Fig. 6). Po de $6,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$ de longitud ($n = 16$). Placa 4' es la más grande de la epiteca, y está situada en la parte central de la célula en vista apical (Fig. 6). Placa 6'' rectangular y grande (Fig. 6B), con una longitud de 11 a 14,2 μm ($12,6 \pm 1,6 \mu\text{m}$), una anchura de 5,9 a 8,5 μm ($7,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$) y una relación A/L de 1,6 a 2 μm ($1,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$) ($n = 17$).

Localidad tipo: Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España.

Distribución en Canarias: Tenerife.

Distribución mundial: Océano Atlántico Noreste

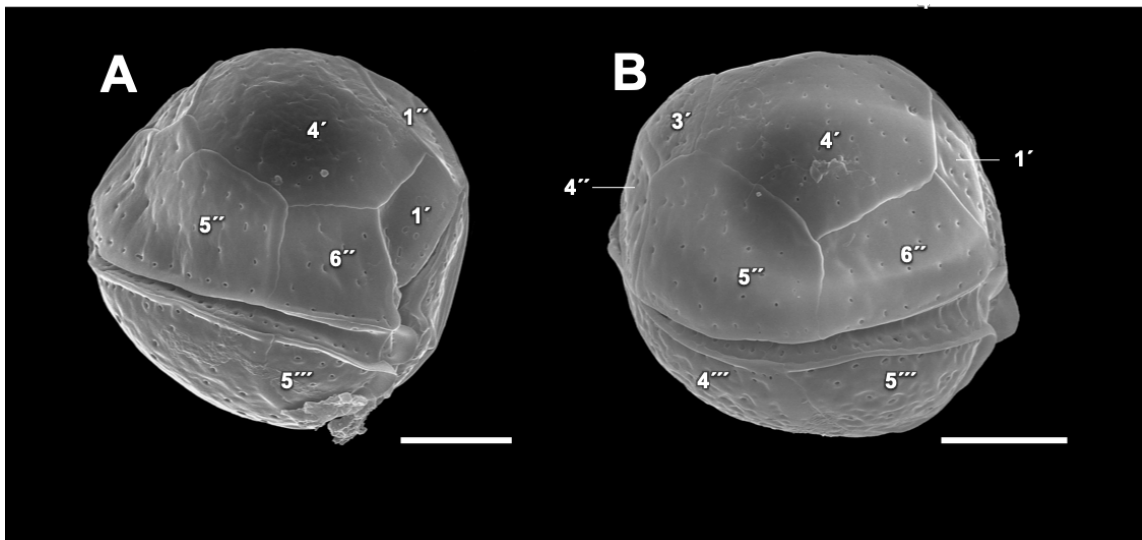


Figura 6. Imágenes de MEB de *C. canariensis*: **(A)** vista apical-ventral y **(B)** vista apical-lateral derecho. Barra de escala: 10 μm . Autor: E. Soler.

***Coolia tropicalis* Faust**

Células esféricas con una longitud AP de 32,8 a 41,6 μm ($36,9 \pm 2,7 \mu\text{m}$, $n = 16$), una anchura de 27,5 a 45,2 μm ($36,3 \pm 4,7 \mu\text{m}$, $n = 26$) y una profundidad DV de 32,9 a 44,3 μm ($39,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$, $n = 15$). Superficie celular lisa, con poros distribuidos al azar (Fig. 7) de 0,25 a 0,58 μm de diámetro ($0,37 \pm 0,08 \mu\text{m}$, $n = 37$). Po de 6,1 - 9,8 μm de longitud ($8,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$, $n = 11$). Placa 4' es la más grande de la epiteca y situada en la parte central de esta (Fig. 7A y B). Placa 6" con una anchura de 13,8 a 16 μm ($14,9 \pm 1,1 \mu\text{m}$), una longitud de 3,8 a 5,2 μm ($4,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$) y una relación A/L de 2,8 a 4 μm ($3,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$) ($n = 9$).

Localidad tipo: Carrie Bow Cay, Belice.

Distribución en Canarias: El Hierro, Tenerife, Gran Canaria, Lanzarote.

Distribución mundial: Mar Caribe, Océano Atlántico Suroeste y Noreste, Océano Pacífico Oeste, Central y Noreste.

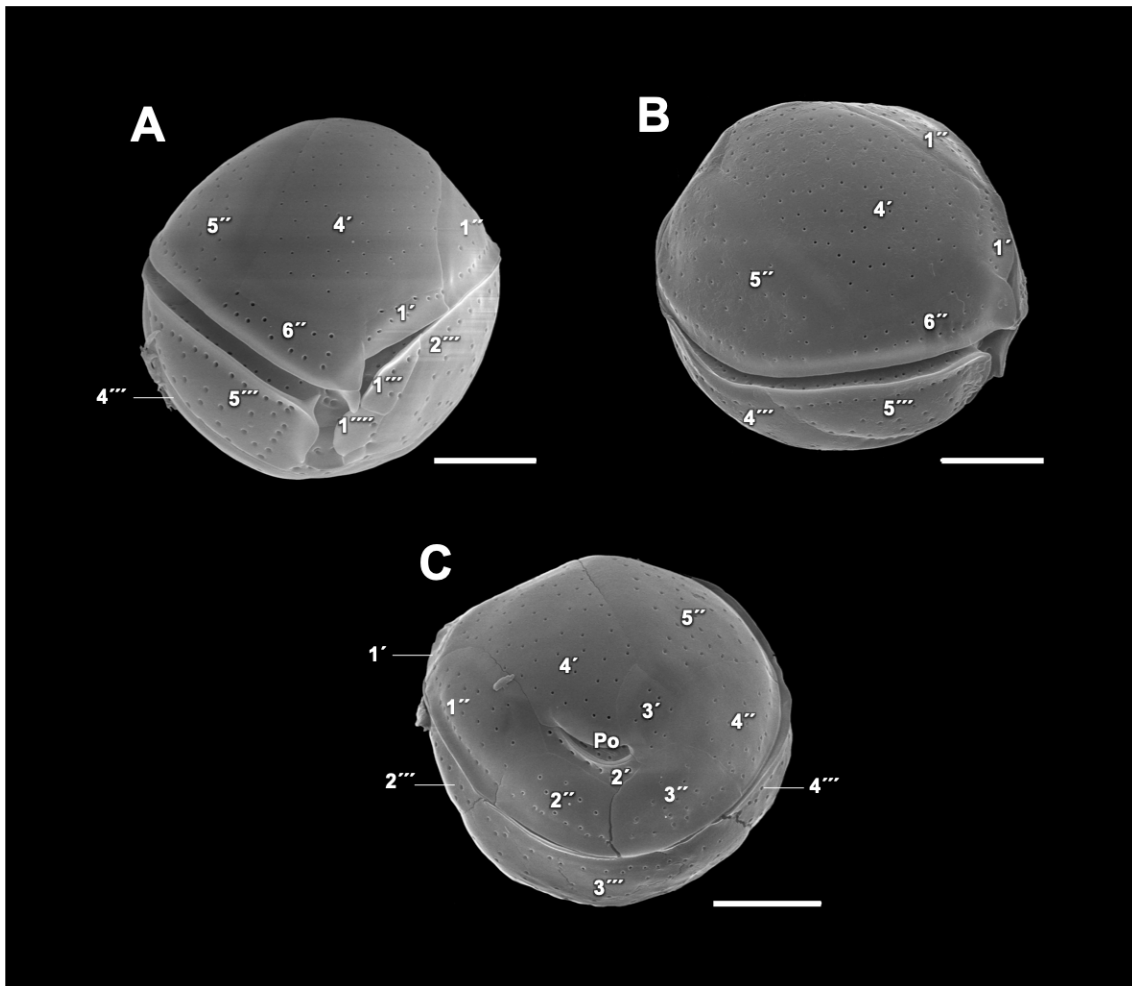


Figura 7. Imágenes de MEB de *C. tropicalis*: **(A)** vista apical-ventral, **(B)** vista apical-lateral derecho **(C)** vista apical-dorsal. Barra de escala: 10 μ m. Autor: E. Soler.

***Coolia areolata* Ten-Hage, Turquet, Quod y Couté**

Células esféricas, con una longitud AP de 30 - 51 μ m y una anchura de 33 - 55 μ m. Superficie celular areolada (Fig. 8), excepto en la placa 4', que es lisa (Fig. 8A y C). Tecas con poros circulares y dispersos, presentes tanto dentro como fuera de las areolas. Algunos especímenes presentan areolas multiporadas (Fig. 8D). Po con una longitud de 10 μ m y ligeramente curvada (Fig. 8C). Placa 4' es la más grande de la epiteca y está situada en la parte central de la célula en vista apical (Fig. 8A y C). Placa 6'' con una relación A/L ~ de 1,5.

Localidad tipo: La Possession Bay, Réunion.

Distribución en Canarias: El Hierro, Fuerteventura.

Distribución mundial: Océano Atlántico Noreste, Océano Índico.

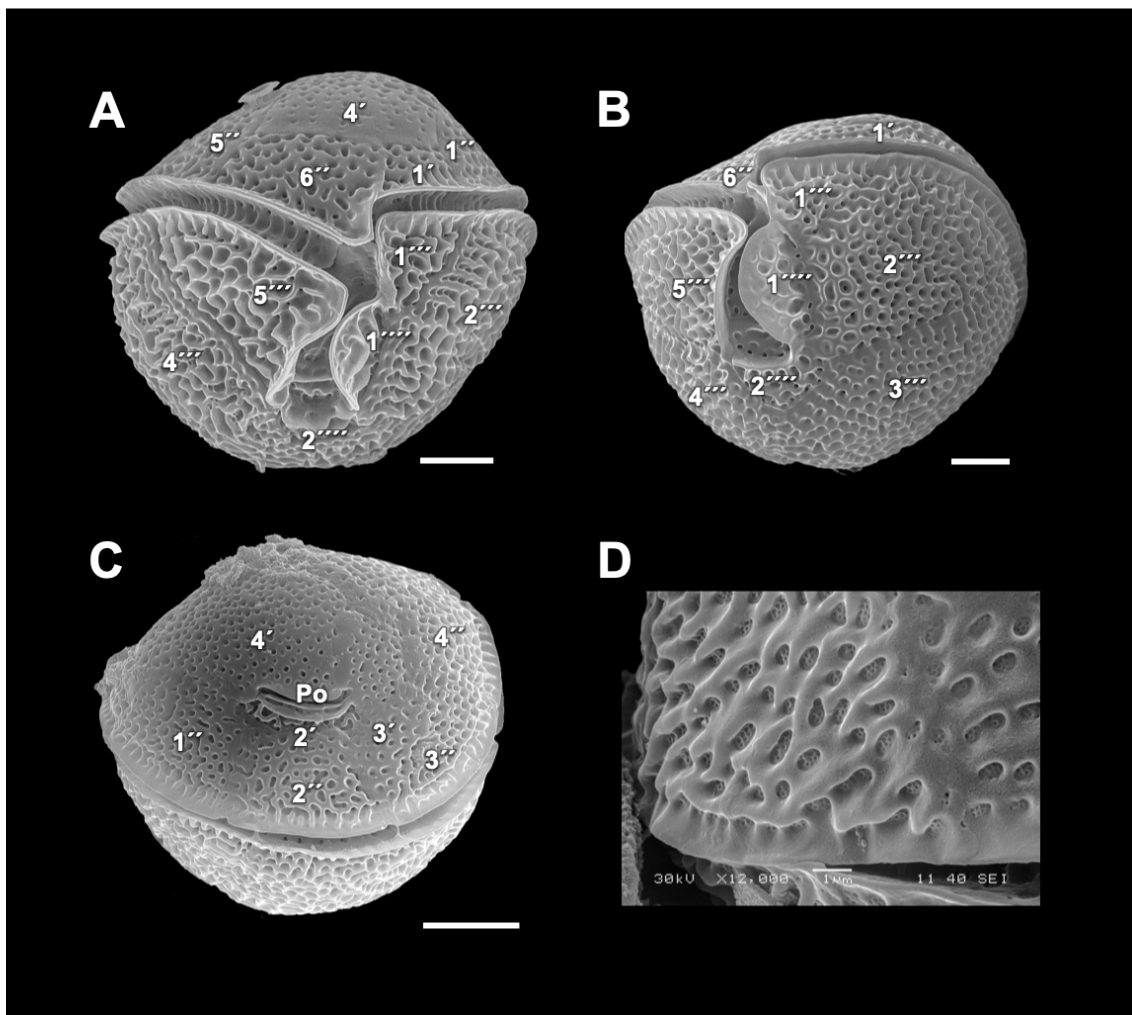


Figura 8. Imágenes de MEB de *C. areolata*: **(A)** vista apical, **(B)** vista antapical-lateral izquierdo **(C)** vista apical-dorsal, **(D)** detalle de areolas multiporadas. Barra de escala: A, B, C= 10 µm; D= 1 µm. Autor: E. Soler.

***Coolia guanchica* David, Laza-Martínez, Rodríguez y Fraga**

Células subesféricas con una longitud AP de 31 μm , una anchura de 32 μm y una profundidad DV de 33 μm . Superficie celular lisa, con poros de circular a ovalados de 0,4 μm de diámetro distribuidos aleatoriamente (Fig. 9). Po de 8 μm de longitud. Placa 4' es la más grande de la epiteca y está situada en la parte central de esta (Fig. 9). Placa 6'' rectangular y grande (Fig. 9), con una anchura de 6 μm , una longitud de 11,5 μm y una relación A/L de 1,4 - 2.

Localidad tipo: Adeje, Tenerife, Islas Canarias, España.

Distribución en Canarias: Tenerife.

Distribución mundial: Océano Atlántico Noreste.

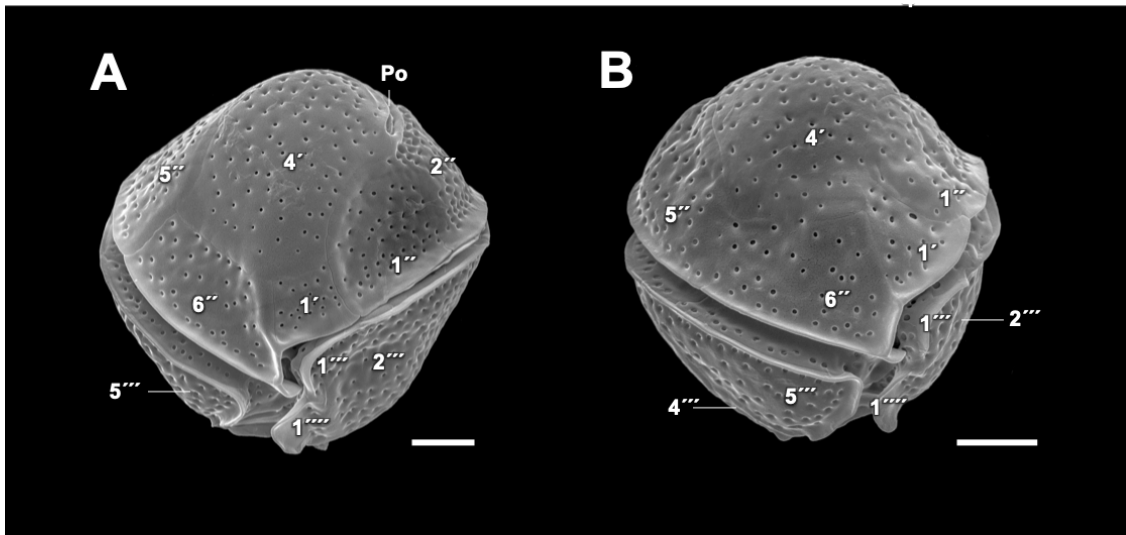


Figura 9. Imágenes de MEB de *C. guanchica*: (A) y (B) vista apical-ventral. Barra de escala: 10 μm . Autor: E. Soler.

3.1.2. Análisis filogenéticos

Las filogenias inferidas a través de los análisis de máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI) mostraron los mismos patrones de ramificación y, por tanto, en este estudio sólo se muestra el árbol filogenético de ML (Fig. 10). Dado que algunas de las secuencias obtenidas para una misma especie resultaron ser idénticas, estas se muestran agrupadas en el árbol filogenético.

De acuerdo con los análisis de la LSU del ADNr, los valores de *bootstrap* y las probabilidades posteriores indicaron de forma clara la existencia de diez clados equivalentes a siete especies taxonómicamente aceptadas en la actualidad (para *C. areolata* aún no existen secuencias en *Genbank*). Las secuencias de *Coolia* obtenidas en el presente estudio se agruparon en siete clados diferentes y bien establecidos, con al menos un representante en cada uno de ellos. Estos clados se dividieron en tres grupos principales apoyados por fuertes valores *bootstrap*. El primer grupo incluía cuatro clados pertenecientes a las especies *C. malayensis*, *C. santacroce*, *C. monotis* y *C. palmyrensis*. El 71 % de las secuencias obtenidas en este estudio pertenecieron a este grupo; *C. monotis* (n=17), *C. malayensis* (n=15) y *C. palmyrensis* (n=3). El segundo grupo contenía cuatro clados del “complejo *Coolia canariensis*”, es decir, *C. canariensis* y tres filogrupos denominados en el presente estudio como como *C. cf. canariensis* I (Fraga *et al.*, 2008), *C. cf. canariensis* II (filogrupo II en Nascimiento *et al.*, 2019) y *C. cf. canariensis* III (filogrupo IV en Phua *et al.*, 2021), y el clado de *C. guanchica*. El 17 % de las secuencias obtenidas pertenecieron a este grupo; *C. canariensis* (n=4), *C. cf. canariensis* I (n=3) y *C. cf. canariensis* II (n=2). El tercer y último grupo principal del árbol filogenético incluía un único clado que contenía secuencias identificadas como *C. tropicalis*, las cuales representaron el 12 % de las secuencias obtenidas en este estudio.

Tabla II. Listado de cultivos en el que se incluye la fecha y localidad de muestreo, el número de acceso en *GenBak* y la región de la LSU del ADNr secuenciada para cada cultivo. * Ver Tabla I.

Especie	Código cultivo	Fecha muestreo	Localidad*	Nº Acceso	Región LSU
<i>C. canariensis</i>	VGO1157	11/9/13	TF-40	KU514001	D1/D2
	TNB	11/9/13	TF-44	KU514002	D1/D2
	TNK	12/9/13	TF-35	KU514003	D1/D2
	TNL	12/9/13	TF-35	KU514004	D1/D2
<i>C. cf. canariensis</i> (I)	TNQ	12/9/13	TF-35	KU514005	D1/D2
	OCH-195	20/1/19	GC-48	MW280577	D1/D3
	OCH-209	20/1/19	GC-48	MW280578	D1/D3
<i>C. cf. canariensis</i> (II)	IRTA-SMM-17-315	27/10/17	TF-43	MW280576	D1/D3
	OCH-180	14/12/18	H-4	MW280578	D1/D3
<i>C. malayensis</i>	VGO1163	11/9/13	TF-44	KU513993	D1/D2
	TNC	11/9/13	TF-44	KU513991	D1/D2
	TNG	11/9/13	TF-44	KU513992	D1/D2
	TNO	12/9/13	TF-35	KU513990	D1/D2
	IRTA-SMM-17-028	15/10/16	FTV-60	MW280552	D1/D3
	IRTA-SMM-17-032	15/10/16	FTV-60	MW280553	D1/D3
	IRTA-SMM-17-033	15/10/16	FTV-60	MW280554	D1/D3
	IRTA-SMM-17-026	14/10/16	GC-49	MW280551	D1/D3
	IRTA-SMM-17-055	14/10/16	GC-57	MW280557	D1/D3
	IRTA-SMM-16-291	17/10/16	LZ-73	MW280561	D1/D3
	OCH-50	26/6/17	G-58	MW280555	D1/D3
	OCH-89	6/7/17	LP-14	MW280556	D1/D3
	OCH-94	16/9/17	GR-82	MW280558	D1/D3
	OCH-110	8/10/19	H-5	MW280560	D1/D3
	OCH-199	20/1/19	GC-48	MW280559	D1/D3

Tabla II. (Continuación)

Especie	Código cultivo	Fecha muestreo	Localidad*	Nº Acceso	Región LSU
<i>C. monotís</i>	TNE	12/9/13	TF-39	KU513997	D1/D2
	TNH	11/9/13	TF-44	KU513998	D1/D2
	TNJ	11/9/13	TF-44	KU513994	D1/D2
	TNT	11/9/13	TF-40	KU513996	D1/D2
	TNY	11/9/13	TF-40	KU513995	D1/D2
	IRTA-SMM-17-067	15/10/16	FTV-40	MW280562	D1/D3
	IRTA-SMM-17-071	14/10/16	GC-57	MW280563	D1/D3
	OCH-216	8/2/19	GC-58	MW280564	D1/D3
	OCH-217	8/2/19	GC-58	MW280565	D1/D3
	OCH-218	8/2/19	GC-58	MW280566	D1/D3
	OCH-224	8/2/19	GC-58	MW280567	D1/D3
	OCH-225	8/2/19	GC-58	MW280568	D1/D3
	OCH-226	8/2/19	GC-48	MW280569	D1/D3
	OCH-227	8/2/19	GC-58	MW280570	D1/D3
	OCH-228	8/2/19	GC-58	MW280571	D1/D3
	OCH-229	8/2/19	GC-48	MW280572	D1/D3
OCH-234	8/2/19	GC-48	MW280573	D1/D3	
<i>C. palmyrensis</i>	TNM	12/9/13	TF-35	KU513999	D1/D2
	TNP	12/9/13	TF-35	KU514000	D1/D2
	IRTA-SMM-17-014	17/10/16	LZ-78	MW280574	D1/D3
<i>C. tropicalis</i>	TNA	11/9/13	TF-44	KU514011	D1/D2
	TNI	11/9/13	TF-44	KU514009	D1/D2
	OCH-108	8/10/17	H-5	MW280579	D1/D3
	OCH-109	8/10/17	H-5	MW280580	D1/D3
	OCH-232	8/2/19	GC-58	MW280581	D1/D3
	OCH-233	25/11/18	LZ-80	MW280582	D1/D3

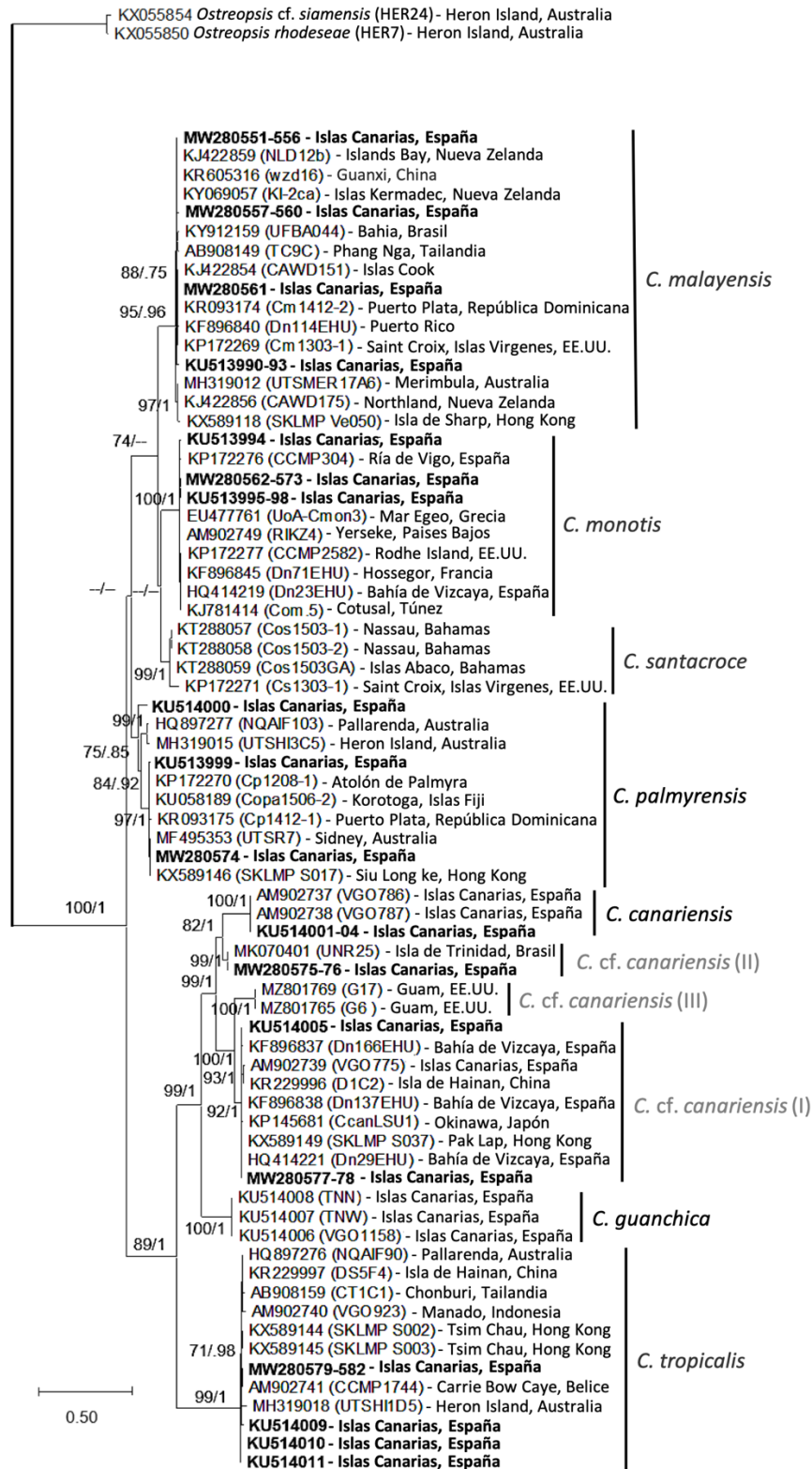


Figura 10. Árbol filogenético obtenido por el modelo ML y basado en secuencias del LSU (D1-D2). Las secuencias obtenidas en este estudio se destacan en negrita. En los clados de *C. malayensis*, *C. monotis* y *C. tropicalis* las secuencias idénticas se muestran agrupadas. Los números en las ramas son la probabilidad posterior y los porcentajes de *bootstrap* (n = 1000) después de ML y BA, respectivamente. Los niveles de apoyo inferiores al 60%/60 se indican con guiones. Autor: F. Rodríguez (IEO-Vigo).

Las distancias genéticas medias netas (p) entre los cuatro filogrupos del “complejo *C. canariensis*” oscilaron entre 0,122 y 0,261, valores similares al límite interespecífico establecido entre *C. monotis* y *C. malayensis* ($p= 0,122$) y más altos que el establecido entre otros miembros del “complejo *C. monotis*” (p. ej. entre *C. santacroce* y *C. monotis* ($p= 0,095$) o entre *C. santacroce* y *C. malayensis* ($p= 0,107$)). La mayor distancia genética entre dos especies se encontró entre *C. tropicalis* y *C. monotis* ($p=0,407$) (Tabla III).

Tabla III. P-valores genéticos no corregidos (distancias genéticas netas medias) entre las secuencias de *Coolia* obtenidas y las secuencias analizadas en este estudio. Autor: Francisco Rodríguez/ IEO-Vigo.

ESPECIE	<i>C. cf. canariensis</i> III	<i>C. cf. canariensis</i> II	<i>C. cf. canariensis</i> I	<i>C. canariensis</i>	<i>C. monotis</i>	<i>C. palmyrensis</i>	<i>C. malayensis</i>	<i>C. santacroce</i>	<i>C. guanchica</i>
<i>C. cf. canariensis</i> II	0,199								
<i>C. cf. canariensis</i> I	0,128	0,126							
<i>C. canariensis</i>	0,261	0,122	0,183						
<i>C. monotis</i>	0,434	0,368	0,365	0,393					
<i>C. palmyrensis</i>	0,404	0,324	0,338	0,343	0,164				
<i>C. malayensis</i>	0,425	0,358	0,362	0,374	0,122	0,151			
<i>C. santacroce</i>	0,378	0,352	0,362	0,378	0,095	0,114	0,107		
<i>C. guanchica</i>	0,276	0,182	0,21	0,235	0,358	0,317	0,335	0,339	
<i>C. tropicalis</i>	0,391	0,363	0,366	0,368	0,407	0,377	0,392	0,393	0,361

3.2. Distribución de *Coolia* en las Islas Canarias

La distribución de género *Coolia* en el archipiélago canario fue evaluada a partir de las observaciones (presencia/ ausencia) realizadas directamente en las muestras vivas recogidas en el medio marino bajo el microscopio óptico invertido. De acuerdo con estas observaciones, este género demostró estar ampliamente distribuido en todas las islas del archipiélago, pues sus células fueron observadas en 42 de las 85 localidades investigadas en este estudio (Fig. 11).

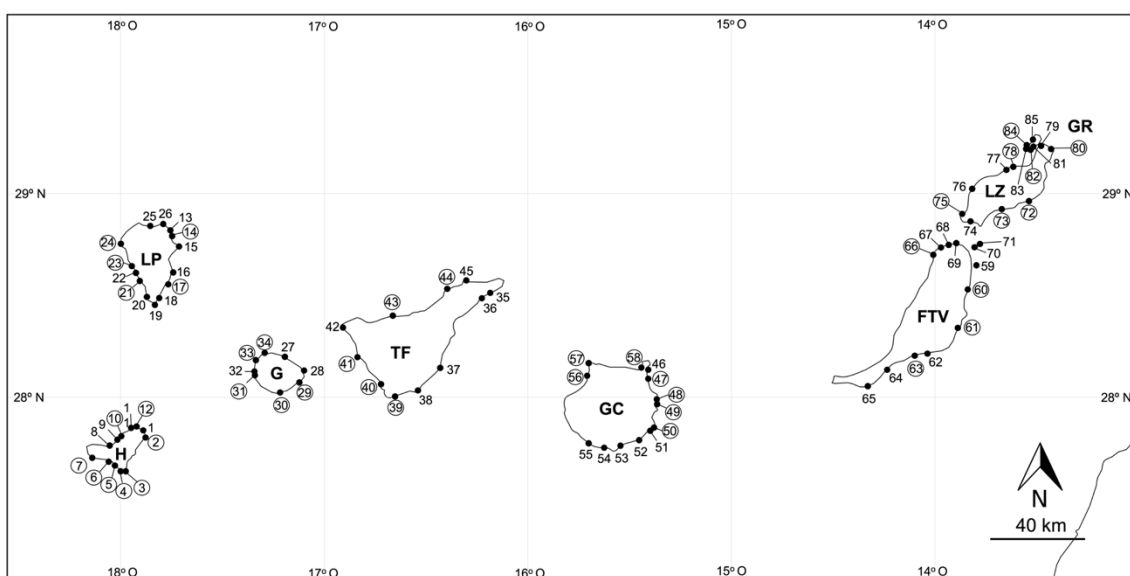


Figura 11. Localidades de muestreo visitadas entre los años 2013 y 2019 en las Islas Canarias: H (El Hierro), LP (La Palma), G (La Gomera), TF (Tenerife), GC (Gran Canaria), FTV (Fuerteventura), LZ (Lanzarote) y La Graciosa (GR). Los números incluidos en un círculo representan las localidades en las que se observaron células de *Coolia*. El nombre de las localidades aparece recogido en la Tabla I.

La distribución de las especies que forman este género en las Islas Canarias fue estimada a partir de las identificaciones realizadas combinando análisis morfológicos y moleculares en 50 cultivos obtenidos a partir de muestras recogidas en 17 localidades distribuidas por todas las islas principales del archipiélago (Fig. 12; Tabla I). En este estudio no se obtuvieron cultivos de *C. areolata*, y por ello la distribución de esta especie se estimó a partir de las

identificaciones morfológicas realizadas directamente a partir de muestras recogidas en el medio marino. De acuerdo con las identificaciones realizadas, *C. malayensis* mostró la distribución más amplia de las seis especies, dado que esta fue identificada en todas las islas principales del archipiélago (Fig. 12). *Coolia tropicalis* también demostró estar ampliamente distribuida en la región, pues esta fue identificada en cuatro islas (El Hierro, Tenerife, Gran Canaria y Lanzarote). En comparación con estas especies, *C. areolata*, *C. canariensis*, *C. palmyrensis* y *C. monotis* presentaron distribuciones más restringidas; *C. monotis* y *C. palmyrensis* fueron identificadas en las islas centro-orientales (Tenerife - Gran Canaria - Fuerteventura y Tenerife - Lanzarote, respectivamente), *C. areolata* fue identificada tanto en la zona occidental (El Hierro) como oriental (Fuerteventura) del archipiélago, mientras que *C. canariensis* sólo fue observada en Tenerife (Fig. 12).

En cuanto a la diversidad de especies encontrada dentro de cada isla, el mayor número de especies fue observado en Tenerife, donde estuvieron presentes todas las especies identificadas en este estudio a excepción de *C. areolata*. En concreto, la localidad de Punta del Hidalgo (TF-44) fue la que presentó una mayor diversidad entre todas las localidades visitadas en este estudio con un total de cuatro especies (Fig. 12). Después de Tenerife, las islas en las que se identificó un mayor número de especies fueron El Hierro, Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote, con un total de tres, mientras que en el resto de las islas solo fue identificada una especie (Fig. 12; Tabla II).

Con respecto a los otros miembros del complejo *C. canariensis*, *C. cf. canariensis* (I) fue identificada en Tenerife y Gran Canaria mientras que *C. cf. canariensis* (II) fue identificada en Tenerife y El Hierro (Tabla II).

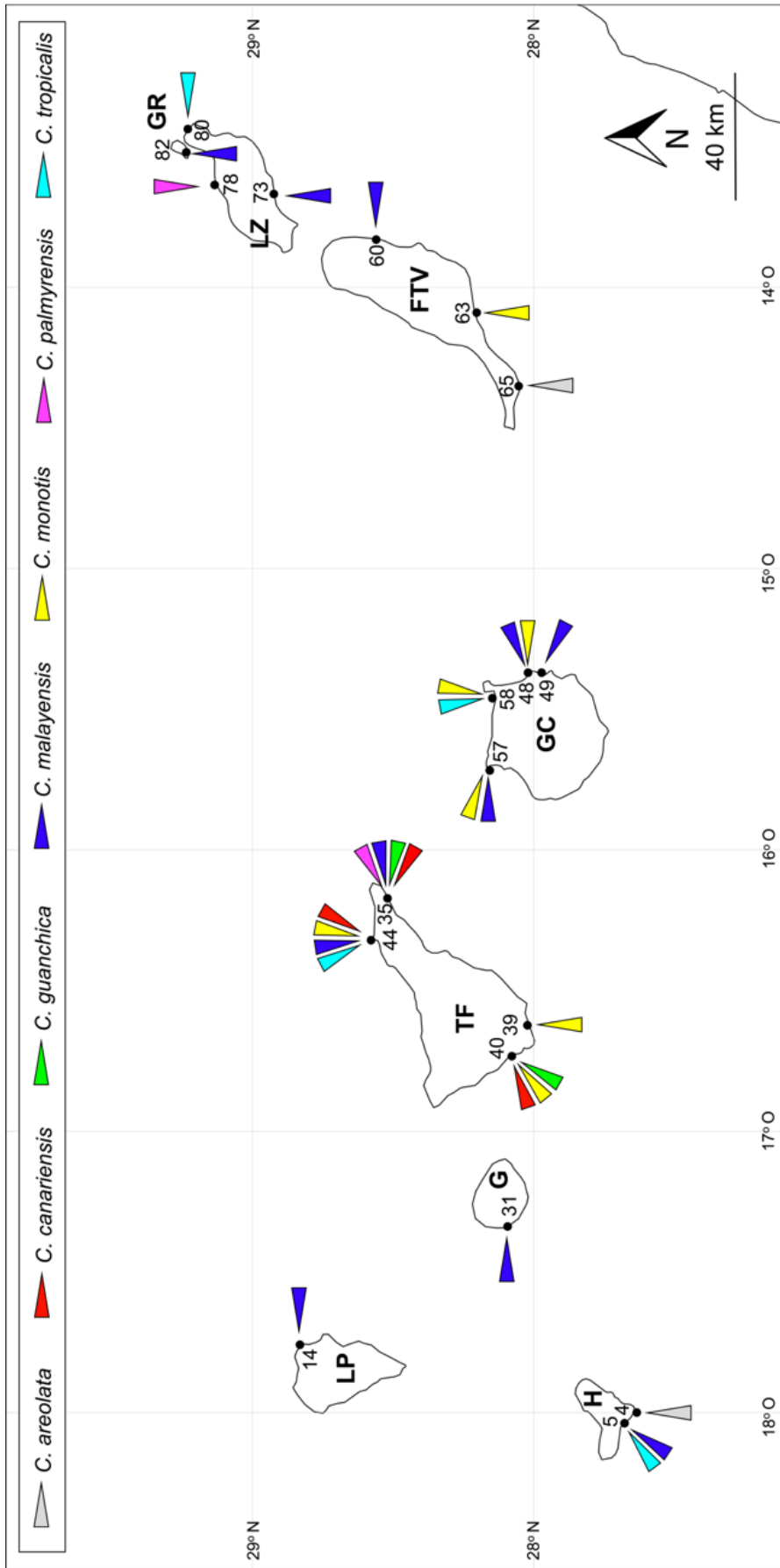


Figura 12. Distribución de las especies de *Coolia* identificadas en las Islas Canarias mediante la combinación de análisis morfológicos y moleculares excepto para *C. areolata*, que fue identificada únicamente a través de su morfología. Se muestran además los resultados obtenidos por David et al. (2020) para *C. guanchica*. Los números corresponden a la numeración asignada al conjunto de localidades evaluadas en el archipiélago entre los años 2013 y 2019 (Tabla I). H (El Hierro), LP (La Palma), G (La Gomera), TF (Tenerife), GC (Gran Canaria), FTV (Fuerteventura), LZ (Lanzarote) y

4. Discusión

4.1. Dificultades en la taxonomía del género *Coolia*

Coolia está considerado un género BHAB por su capacidad para producir toxinas (Lassus *et al.*, 2016), aunque existen marcadas diferencias en la toxicidad de sus especies (Tibiriçá *et al.*, 2020). Esto hace crucial que su taxonomía sea precisa. Muchas de las especies que forman el género presentan una morfología muy similar, lo que puede dificultar su discriminación mediante el uso exclusivo de técnicas microscópicas. En los últimos años, la incorporación de las técnicas de biología molecular en el estudio taxonómico de *Coolia* ha demostrado ser de gran ayuda para acometer con éxito tal propósito. Al mismo tiempo, el uso de la biología molecular ha puesto de manifiesto la existencia de una diversidad de especies mayor de la que se conocía hasta entonces, pues ha permitido observar que una morfología aparentemente igual puede en realidad esconder diferencias genéticas significativas, es decir, especies crípticas (Penna *et al.*, 2005; Momigliano *et al.*, 2013). En algunos casos, este hallazgo ha llevado a encontrar pequeños detalles morfológicos que hasta entonces habían pasado desapercibidos, dando lugar a la descripción de nuevas especies que pasan a considerarse pseudocrípticas (Leaw *et al.*, 2010; Karafas *et al.*, 2015). Sin embargo, la eficacia de estas diferencias ha sido cuestionada en estudios posteriores como se explica más adelante (Leung *et al.*, 2012; Karafas y Tomas, 2015; Gómez *et al.*, 2016; Tibiriçá *et al.*, 2020). En otros casos, tras el hallazgo de diferencias genéticas no se han podido observar diferencias morfológicas singulares para la descripción de nuevas especies (Fraga *et al.*, 2008; David *et al.* 2014; Nascimento *et al.*, 2019; Phua *et al.*, 2021), lo que ha puesto de manifiesto la existencia de una diversidad críptica aún por dirimir. Dada la considerable incertidumbre taxonómica que aún arrastra este género en la actualidad, la evaluación de su diversidad en las Islas Canarias se abordó combinando técnicas microscópicas y moleculares. Sin embargo, a pesar del alto grado de similitud que presentan las especies de *Coolia*, existen algunas características morfológicas que han demostrado su capacidad para diferenciar de manera fiable ciertas especies o grupo de especies. A continuación, se

discute la eficacia de las características morfológicas utilizadas de manera más frecuente en la diferenciación de las especies de *Coolia*.

Una de estas características ha sido la posición y el tamaño de la placa 4' en la epiteca. Esta característica ha demostrado ser eficaz para la diferenciación de dos grupos principales de especies. En *C. tropicalis*, *C. areolata*, *C. canariensis* y *C. guanchica*, la placa 4' es la más grande de la epiteca y, en vista apical, está situada en el centro de esta (Faust, 1995; Ten-Hage *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2008; David *et al.*, 2020). Por el contrario, en *C. monotis*, *C. malayensis*, *C. palmyrensis* y *C. santacroce* ("complejo *C. monotis*") la placa más grande de la epiteca es la 5'', mientras que la 4' es estrecha y está desplazada hacia el lateral izquierdo (Leaw *et al.*, 2010; Karafas *et al.*, 2015). La posición y el tamaño de la placa 4' en la epiteca ha sido documentada en la gran mayoría de estudios taxonómicos publicados hasta la fecha y, en aquellos en los que no se ha hecho, esta es fácilmente observable a partir de las imágenes incluidas en cada estudio (Tabla IV). En consonancia con estudios anteriores, esta característica fue observada de manera inequívoca en los especímenes investigados en las Islas Canarias. A pesar de que esta característica ha demostrado, por sí sola, su eficacia en la diferenciación de estos dos grupos, muchos autores han empleado otras características, como son el tamaño de la célula o la forma de la placa 6'', para tal propósito. Sin embargo, estas han demostrado no ser tan efectivas como lo es la posición y el tamaño de la placa 4'.

De acuerdo con la información recogida en la Tabla IV, las dimensiones de la célula (en particular la longitud AP y la anchura) ha sido una de las características más documentadas en los estudios taxonómicos sobre el género *Coolia*. Esto resulta lógico si se tiene en cuenta que estas medidas pueden ser tomadas incluso por medio de un sencillo microscopio óptico invertido. En general, las células de las especies en las que la placa 4' es central y la más grande de la epiteca se han descrito como células que presentan tamaños celulares mayores en comparación con el de las especies del "complejo *C. monotis*" (Leaw *et al.*, 2016; Karafas *et al.*, 2015; Tibiriçá *et al.*, 2020). Sin embargo, la mayoría de estudios ha documentado rangos amplios en los tamaños celulares de los especímenes evaluados en sus respectivas regiones, lo que ha dado lugar a su

solapamiento entre especies limitando por tanto ha su uso para la diferenciación de estos dos grupos principales (Tabla IV). En Canarias, las dimensiones celulares tampoco resultaron ser completamente útiles, pero sí contribuyeron a diferenciar entre ciertas especies de ambos grupos; los tamaños celulares observados para *C. tropicalis* y *C. areolata* fueron mayores que los de *C. malayensis* y *C. palmyrensis* (sin solapamiento de rangos). *C. canariensis* también mostró tener un rango de longitud AP mayor que *C. malayensis* y *C. palmyrensis*, mientras que los rangos de la anchura y profundidad DV se solaparon (Tabla IV).

En relación con estas observaciones, algunos autores han documentado la existencia de células más pequeñas de lo normal o “*small cells*” en cultivos clonales de *Coolia* y otros géneros (~50% de su tamaño habitual) (Yasumoto *et al.*, 1980; Silva y Faust, 1995; Aligizaki y Nikolaidis, 2006). A pesar de que la función exacta de estas células aún no se conoce completamente, algunos autores las han identificado, por ejemplo, con diferentes estadios en el ciclo de vida en ciertas especies (Amorim *et al.*, 2013). Silva y Faust (1995) observaron que este tipo de células proliferan sobre todo en las últimas etapas del crecimiento exponencial, pudiendo convertirse en la forma dominante en los cultivos cuando se agotan los nutrientes, y recalcaron las implicaciones que este hecho podría tener en los estudios taxonómicos sobre dinoflagelados. Además, Silva y Faust (1995) también documentaron la existencia de células más pequeñas en poblaciones naturales durante proliferaciones en el medio marino, que podrían ser producidas durante divisiones asexuales rápidas con el fin de rejuvenecer la población. Esta observación limita aún más el uso de las dimensiones celulares como una característica morfológica fiable.

Por otro lado, la variabilidad morfológica que presentan las células de dinoflagelados en cultivo parece no afectar únicamente a su tamaño. Por ejemplo, Lim *et al.* (2007) observaron que las células presentes en cultivos clonales de dos especies de *Alexandrium* mostraban una variabilidad importante en la forma de algunas de sus placas tecales, caracteres ampliamente utilizados en la identificación de las especies que forman este género. Esto también ha sido observado en cultivos de *Coolia*. Por ejemplo, Jeong *et al.* (2012)

documentaron diferencias importantes en la forma de algunas de las placas tecales (4', 3' o 2''') de *C. malayensis*, e indicaron que sería necesario examinar muchas células recogidas directamente a partir de poblaciones naturales para comprobar si estas variaciones se producen o no debido a las condiciones de cultivo. Estas observaciones son relevantes teniendo en cuenta que el aislamiento y cultivo de dinoflagelados representa la manera más realista, y por tanto más habitual, de evaluar el rango de diversidad fenotípica en células que se sabe con certeza que son genéticamente idénticas (Lim *et al.*, 2007). Por tanto, esta práctica podría haber supuesto una de las causas principales de la variabilidad morfológica documentada en muchos estudios taxonómicos. Con el objetivo de evitar o reducir variaciones morfológicas asociadas a cultivo, en este estudio las células se extrajeron de los cultivos tan pronto como estas alcanzaron un número suficiente que permitiera asegurar el éxito de los análisis morfológicos y moleculares.

La relación A/L de la placa 6' ha sido otra característica referida de manera frecuente en los estudios taxonómicos sobre el género *Coolia*. Las especies del "complejo *C. monotis*", presentan una 6'' corta, con un ancho y largo similares (Meunier, 1919; Leaw *et al.*, 2010; Karafas *et al.*, 2015) mientras que, en el resto de especies, esta placa es más larga que ancha (Faust, 1995; Ten-Hage *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2008; David *et al.*, 2020). Teniendo esto en cuenta, Fraga *et al.* (2008) sugirieron emplear la relación ancho/largo de la placa 6'' (A/L 6'') para diferenciar de manera más objetiva entre especies, y la definieron en ~ 1 para *C. monotis*, 2 para *C. canariensis* y *C. areolata*, y 4 para *C. tropicalis*. A pesar de que en las Islas Canarias la relación A/L 6'' sí permitió distinguir entre las especies del "complejo *C. monotis*" (1,1 – 1,3) del resto de especies (1,4 – 4), estudios realizados en otras regiones han demostrado que esta es muy variable para cada especie, lo que da lugar a un solapamiento de sus rangos entre especies de ambos conjuntos (Tabla IV). Por ejemplo, algunos estudios han documentado que esta relación puede ser el doble del valor establecido para *C. monotis* (Karafas *et al.*, 2015; Lewis *et al.*, 2018), mientras que otros han documentado valores menores de la mitad del valor establecido para *C. tropicalis* (Zhang *et al.*, 2021). Por tanto, estos hallazgos convierten a la relación A/L de la

placa 6' en un carácter impreciso, al menos en la diferenciación de los miembros del "complejo *C. monotis*" del resto de especies.

En este estudio, las especies incluidas en el grupo caracterizado por presentar epitecas con una placa 4' central y grande, es decir, *C. areolata*, *C. canariensis* y *C. tropicalis* demostraron tener alguna característica singular o conjunto de características que permitieron su identificación inequívoca. *C. areolata* fue fácilmente reconocible por ser la única especie en presentar, en concordancia con la descripción de Ten-Hage *et al.* (2000), una superficie fuertemente areolada a excepción de la placa 4', que era lisa. Las células de *C. canariensis* presentaron también una ornamentación singular de acuerdo con la descripción de Fraga *et al.* (2008); una epiteca lisa y una hipoteca rugosa. A diferencia de estas dos especies, *C. tropicalis* presentó una superficie celular lisa, similar a la de las especies del "complejo *C. monotis*" identificadas en este estudio. A pesar de ello, *C. tropicalis* fue discriminada de manera eficaz de estas especies, como ya se ha indicado anteriormente, por tamaño de la placa 4' y su diferente posición en la epiteca. Sin embargo, *C. tropicalis* también comparte esta característica con *C. guanchica*, una especie que no fue identificada en este estudio pero que se encuentra presente en la región (David *et al.*, 2020). En su estudio, David *et al.* (2022) discutieron las características morfológicas que podían ser usadas para diferenciar a esta especie de *C. areolata* y *C. canariensis*, pero no hicieron mención a las características que podrían ser usadas para diferenciarla de *C. tropicalis*, una especie con la que también parece presentar una gran similitud morfológica. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio y aquellos obtenidos en estudios anteriores, *C. tropicalis* podría ser diferenciada de *C. guanchica* principalmente por presentar un rango en la relación A/L de la placa 6'' mayor (2 – 4 en *C. tropicalis* vs 1,4 – 2 en *C. guanchica*; Tabla IV). En contraposición a esta observación, Zhang *et al.* (2021) fue el único estudio en el que se observó que el rango de *C. tropicalis* (1,8 – 2,8) podría presentar un cierto solapamiento con el de *C. guanchica*. A pesar de que este solapamiento es mínimo y aislado, en este estudio también se identificaron otras características morfológicas como son el tamaño celular, el tamaño del Po, la forma de la placa 3' o el tamaño relativo de la placa 3''' en comparación con la 4''' (Tabla IV) que, si bien no han demostrado resultar efectivas por sí solas, en muchos casos

difieren entre ambas especies y, por tanto, podrían ser empleadas como caracteres auxiliares en su diferenciación.

A diferencia del primer grupo de especies, la discriminación morfológica de las especies que forman el “complejo *C. monotis*” es complicada (Gómez *et al.*, 2016). Dada la confusión taxonómica que ha generado este grupo de especies, en esta discusión solo se han tenido en cuenta aquellos estudios en los que la identidad de *C. monotis* fue evaluada genéticamente (la identidad del resto de especies del complejo ha sido siempre evaluada con el apoyo de la biología molecular, Tabla IV). Leaw *et al.* (2010) y Karafas *et al.* (2015) indicaron que las tres especies presentes en las Islas Canarias, es decir, *C. malayensis*, *C. monotis* y *C. palmyrensis* podían ser diferenciadas por medio de varias características morfológicas. De acuerdo con estos autores, *C. monotis* es la especie que presenta los mayores tamaños celulares, mientras que *C. palmyrensis* es la especie más pequeña de las tres. Como ya se ha comentado anteriormente, el tamaño celular ha demostrado no ser una característica fiable pues, tal y como se observó en este y en otros estudios, existe un solapamiento importante de los rangos entre especies, particularmente entre *C. malayensis* y *C. palmyrensis* (Tabla IV). Sin embargo, si se observó que, en algunos casos, las células de *C. monotis* eran mayores que las de las otras dos especies y, por tanto, el tamaño celular podría ser usado de nuevo como un carácter auxiliar en la discriminación de esta especie en las Islas Canarias.

Leaw *et al.* (2010) describieron a *C. malayensis* con un Po de 5 μm , una longitud inferior que cualquiera de las documentadas para *C. monotis* hasta ese momento (Tabla IV), y Karafas *et al.* (2015) indicaron que la longitud del Po en *C. palmyrensis* era similar a la de *C. malayensis*. De acuerdo con lo indicado por estos autores, la longitud del Po en este estudio sí permitió diferenciar, a pesar de la existencia de cierto solapamiento, a *C. palmyrensis* (4,9 – 6 μm) y *C. malayensis* (5,6 – 6,3 μm) de *C. monotis* (6 – 9,2 μm). Sin embargo, algunos estudios han documentado longitudes superiores del Po para *C. malayensis* y *C. palmyrensis* a los observados en este estudio, los cuales se solapan ampliamente con los de *C. monotis* (p. ej. Leaw *et al.*, 2016; Morquecho *et al.*, 2022).

La forma de la placa 3' en *C. malayensis* fue descrita como cuadrangular, lo que llevó a Leaw *et al.* (2010) a proponerla como otra característica distintiva de esta especie, pues para *C. monotis* se había observado que esta era pentagonal (Tabla IV). Sin embargo, la forma de la placa 3' en *C. malayensis* ha resultado ser variable, aunque principalmente pentagonal como la de *C. monotis* (Tabla IV). Leaw *et al.* (2010) también propusieron utilizar la relación A/L de la placa 6'' para diferenciar a *C. malayensis* de *C. monotis*. Comparándola con la relación indicada por Fraga *et al.* (2008) para *C. monotis* (~1), estos autores observaron que esta relación era superior en *C. malayensis* (1,2 – 1,5). Sin embargo, como ha ocurrido con otras características, esta medida ha demostrado tornarse muy variable con el aumento de los estudios (Tabla IV). En este estudio, por ejemplo, ambas especies presentaron el mismo rango en esta relación.

Finalmente, Leaw *et al.* (2010) señalaron que la diferencia más importante entre *C. malayensis* y *C. monotis* reside en el tamaño de la placa 3''', la más grande de la hipoteca en *C. malayensis* e igual al tamaño de la placa 4''' en *C. monotis*. De acuerdo con estos autores, esta característica era, por sí sola, eficaz en la diferenciación de ambas especies. A pesar de ello, el tamaño relativo de la placa 3''' frente al de 4''' ha resultado ser de nuevo variable en estudios posteriores; Jeong *et al.* (2012), Gómez *et al.* (2016) y Tibiriçá *et al.* (2020) observaron que la placa 3''' y 4''' eran iguales en algunos de los especímenes de *C. malayensis* evaluados en sus respectivos estudios, mientras que Laza-Martínez *et al.* (2011), Karafas *et al.* (2015) y Abdennadher *et al.* (2021) observaron que la placa 3''' era la mayor en la hipoteca de *C. monotis*. Por otro lado, cabe señalar que el tamaño absoluto de esta placa no fue documentado en ningún estudio, si no que este fue siempre comparado con el de la placa 4''', lo que convierte la característica propuesta por Leaw *et al.* (2010) en una medida subjetiva. En este sentido, Tibiriçá *et al.* (2020) señalaron que la medición de una placa grande como la 3''' podría ser inexacta debido a la pronunciada curvatura de la célula. Todo ello hace inapropiado situar la mayor diferencia entre estas dos especies en el tamaño relativo de la placa 3'''. Por su parte, Karafas *et al.* (2015) destacaron el número de poros de *C. palmyrensis* como una característica única de esta especie. De acuerdo con estos autores, el número de poros en *C.*

palmyrensis es tan bajo, que estos pueden ser contados fácilmente en cualquiera de sus placas tecales, aunque reconocieron que en algunas podía existir un cierto solapamiento con otras especies del complejo *C. monotis*. Por ello, Karafas *et al.* (2015) señalaron que el número de poros debía ser evaluado específicamente en las placas 4' y 5''. Dado que la mayoría de estudios anteriores a Karafas *et al.* (2015) no documentaron el número de poros en las placas 4' y 5'' de *C. monotis* y *C. malayensis*, esto fue evaluado en el presente estudio a través de las imágenes publicadas por otros estudios. En general, en las imágenes evaluadas de estas dos especies se observó un número de poros superior a los documentados en la descripción de *C. palmyrensis* en ambas placas, aunque también se encontró que esta característica solo se cumplía en una de las dos placas (David *et al.*, 2014). Los pocos estudios en los que se ha evaluado la morfología de *C. palmyrensis* tras su descripción también parecieron confirmar esta diferencia (Tibiriçá *et al.*, 2020; Morquecho *et al.*, 2022; este estudio). Sin embargo, Tibiriçá *et al.* (2020) observaron que esta característica no se cumplía en todos los especímenes evaluados en su estudio, e indicaron que esto podía llevar a confundir a *C. malayensis* con *C. palmyrensis*.

Dadas las dificultades que había demostrado tener la diferenciación morfológica de *C. monotis* de *C. malayensis*, Karafas *et al.* (2015) sugirieron emplear la relación existente entre la longitud del Po y la placa 2' ($Po/2'$) para ayudar en la discriminación de las especies del "complejo *C. monotis*". En su estudio, estos autores encontraron rangos para esta relación que resultaron adecuados para la diferenciación de las tres especies (*C. palmyrensis* 0,9 – 1,6; *C. monotis* 0,6 – 0,7; y *C. malayensis* 0,7 – 0,8), aunque estos solo fueron confirmados en dos estudios posteriores para *C. malayensis* (Leaw *et al.*, 2016) y *C. monotis* (Lewis *et al.*, 2018). Los rangos en la relación $Po/2'$ obtenidos en el presente estudio, además de ser diferentes en algunos casos a los encontrados por Karafas *et al.*, se solaparon entre ellos (*C. palmyrensis* 0,58 – 0,68; *C. monotis* 0,67 – 0,71; *C. malayensis* 0,62 – 0,68), y, por tanto, no fueron eficaces en su propósito.

De acuerdo con las observaciones realizadas anteriormente por algunos trabajos (Karafas *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2016; Tibiriçá *et al.*, 2020), las características morfológicas observadas en las Islas Canarias en las especies incluidas el

“complejo *C. monotis*” no permitieron una clara diferenciación entre ellas. Estos resultados sugieren que las singularidades morfológicas asignadas a estas especies por Leaw *et al.* (2010) y Karafas *et al.* (2015) tras la detección de diferencias genéticas significativas podrían haber sido precipitadas pues, en general, estas han resultado ser muy variables en estudios posteriores realizados en regiones y bajo condiciones de cultivo diferentes, lo que ha dado lugar a un amplio solapamiento entre especies (Tabla IV). En concordancia con esta observación, Karafas y Tomas (2015) reconocieron, tras la evaluación de tres nuevos cultivos, que las características morfológicas asignadas a *C. santacroce* en su descripción por Karafas *et al.* (2015) aquel mismo año a partir de un único cultivo eran más variables que lo que se creía y, por tanto, se solapaban ampliamente con las de otras especies del “complejo *C. monotis*”, lo que llevó a estos autores a sugerir que *C. santacroce* debía ser tratada como una especie críptica (y no pseudocríptica) hasta la obtención de nuevas evidencias morfológicas. De la misma manera, el resto de especies que forman este complejo podrían recobrar su estatus de especies crípticas. Sin embargo, el límite en el que una especie es considerada críptica no parece estar claro; algunos autores han indicado que, si las especies pueden ser diferenciadas por los valores extremos de los rangos de sus medidas morfométricas (como sucede en algunos casos con las especies del “complejo *C. monotis*”, Tabla IV), estas no deberían ser tratadas como tal (Ott *et al.*, 2022). De acuerdo con esta consideración, en esos casos sería necesario establecer el número de repeticiones que una característica morfométrica tiene que ser medida para que esta resulte eficaz en su propósito.

Dada la dificultad que ha supuesto la identificación de las especies del “complejo *C. monotis*”, desde la descripción de *C. malayensis* y la redefinición de *C. monotis sensu stricto* esta tarea se ha llevado a cabo en la mayoría de los estudios con el apoyo de la biología molecular (Tabla IV), lo que ha supuesto una manera efectiva de diferenciarlas. En este estudio, las filogenias inferidas a partir de las secuencias parciales de la LSU del ADNr de los especímenes aislados en las Islas Canarias mostraron de forma clara que *C. malayensis*, *C. monotis* y *C. palmyrensis* constituyen, de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios anteriores, clados monofiléticos consistentes con especies distintas

aunque estrechamente relacionados, hecho que explica su enorme similitud morfológica (Leaw *et al.*, 2010; Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Karafas *et al.*, 2015; Wakeman *et al.*, 2015; David *et al.*, 2020).

La biología molecular también ha resultado ser una herramienta efectiva en la detección de una importante diversidad críptica asociada a *C. canariensis*. En las Islas Canarias se obtuvieron dos clados estrechamente relacionados con esta especie; el filogrupo I (*C. cf. canariensis* I), que ya fue identificado en la descripción original de *C. canariensis* por Fraga *et al.* (2008) en esta misma región y el filogrupo II (*C. cf. canariensis* II), que fue identificado por Nascimento *et al.* (2019) en la isla de Trinidad (Atlántico Occidental). Además, un tercer filogrupo (*C. cf. canariensis* III) de este complejo ha sido recientemente identificado por Phua *et al.* (2021) en la isla de Guam (Pacífico Occidental). A pesar de que las distancias genéticas observadas entre los miembros del “complejo *C. canariensis*” en este y otros estudios son mayores que las observadas entre las especies del “complejo *C. monotis*”, hasta el momento no ha sido posible apreciar ninguna diferencia morfológica significativa entre ellos (David *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2019, Phua *et al.*, 2021), lo que a frenado la descripción de nuevas especies. Esto sugiere que, en contraste a lo ocurrido con las especies del “complejo *C. monotis*”, la morfología de los miembros del “complejo *C. canariensis*” podría estar siendo evaluada con mayor cautela para discernir si existe algún rasgo distintivo y consistente entre especímenes aislados en diferentes regiones y cultivados bajo diferentes condiciones de laboratorio que garantice su delimitación inequívoca como especies separadas desde un punto de vista morfológico, dado que los resultados genéticos apoyan este hecho.

En el caso de *C. areolata*, no se consiguieron cultivos celulares que permitieran su caracterización genética. Sin embargo, esta especie presenta, como ya se ha indicado anteriormente, una característica morfológica distintiva; la presencia de una superficie teical fuertemente areolada en comparación con el resto de especies (Ten-Hage *et al.*, 2000), que permite su identificación inequívoca mediante el uso exclusivo de técnicas microscópicas. A pesar de ello, no se puede descartar la posibilidad de que los especímenes encontrados en el

presente estudio y aquellos encontrados en el Océano Índico por Ten-Hage *et al.* (2000) formen también parte de un conjunto críptico o pseudocríptico. En este sentido, algunos de los especímenes observados en el presente estudio mostraron areolas multiporadas que no fueron descritas por Ten-Hage *et al.* (2000). Por ello, futuros estudios deberían centrar sus esfuerzos en aislar, cultivar y secuenciar células que expresen el fenotipo descrito por Ten-Hage *et al.* (2000).

De manera frecuente, los estudios taxonómicos sobre el género *Coolia* se han referido a la biología molecular como una herramienta efectiva en la confirmación de la identidad de sus especies (p. ej. Leaw *et al.*, 2016), la cual se ha basado tradicional y fundamentalmente en las diferencias morfológicas que estas presentan (Taylor *et al.*, 2008). Sin embargo, la realidad es que en los últimos años la práctica totalidad de estudios parecen estar basando sus identificaciones principalmente en el análisis molecular (PCR) de sus cultivos monoclonales, mientras que el análisis morfológico de los mismos habría pasado a ser una labor confirmatoria, en ocasiones incluso testimonial. A pesar de que esta práctica supone en la actualidad la manera más sencilla, rápida y efectiva de identificar especies que resultan morfológicamente difíciles de diferenciar o incluso aparentemente indistinguibles, esta presenta limitaciones económicas, como la dependencia de costosos equipos, y prácticas, como la necesidad de establecer cultivos, la baja eficacia de la amplificación o tiempos largos de reacción, que restringen su aplicación generalizada (Lee *et al.*, 2021). Al mismo tiempo, la anteposición de las identificaciones basadas en la PCR podría actuar favoreciendo la laxitud en la búsqueda de posibles diferencias morfológicas en futuros estudios. En este sentido, la coexistencia de especies aparentemente iguales pero diferentes en cuanto a su toxicidad (p. ej. especies incluidas en el “complejo *C. monotis*”, Tibiriçá *et al.*, 2020), junto con la incapacidad actual que existe para diferenciar sus morfologías, supone un impedimento en la mayoría de los programas de seguimiento de especies HAB (John *et al.*, 2014), pues en ellos el microscopio sigue siendo la herramienta de referencia para su detección temprana (Berdalet *et al.*, 2016), particularmente en aquellas regiones con menos recursos económicos y donde los HABs producidos por especies bentónicas producen un mayor impacto. Por ello, resulta crucial seguir evaluando

la existencia de diferencias morfológicas que resulten eficaces en la diferenciación de especies en estudios ecológicos y programas de seguimiento. Mientras tanto, las especies crípticas (bien descritas formalmente o consideradas especies putativas), permanecen siendo solo reconocibles por la secuencia genética que les a sido asignada (ribotipo) y, dado que no es seguro que se encuentren diferencias morfológicas para su diferenciación (Ott *et al.*, 2022), será necesario al mismo tiempo seguir desarrollando métodos alternativos de detección rápidos, sencillos y rentables basados en sus diferencias genéticas (Lee *et al.*, 2021).

Tabla IV. Revisión bibliográfica de estudios en los que se ha evaluado la morfología de las especies de *Coolia*. Las características morfológicas reflejadas en la descripción original de cada especie están indicadas en letra negra. Las características morfológicas observadas en este estudio se señalan en letra azul. * Estudios que aportan biología molecular; - información no disponible o no deducible a partir de las imágenes aportadas por la publicación, ^ información deducida a partir de las imágenes aportadas por la publicación.

Forma	Longitud AP (µm)	Anchura (µm)	Profundidad DV (µm)	Superficie tecal	Largo Po (µm)	Tamaño relativo 4' - 5' y posición 4'	A/L 6''	Forma 3'	Tamaño relativo placa 3'' vs 4''	Tamaño poro	Nº poros en 4'	Nº poros en 5''	Por2'	Región	Referencia
C. monofis															
-	-	-	-	-	-	4' < 5''; lzda^	-	-	-	-	-	-	-	Atlántico NE	Meunier (1919)
-	-	-	-	-	-	4' < 5''; lzda^	-	Pentagonal	3''' > 4'''^	-	-	-	-	Atlántico NE	Balech (1965)
Lenticular	23 - 40	21 - 38	21 - 40	-	-	4' < 5''; lzda	-	-	3''' > 4'''^	-	-	-	-	Pacífico NO y O	Fukuyo (1981)
-	28,9 - 36,7	23,7 - 30,5	27,3 - 32,3	-	-	4' < 5''; lzda^	-	-	-	-	-	-	-	Mar Caribe	Besada et al. (1982)
Redonda	30 - 50	25 - 45	-	-	12	-	-	-	-	0,3 - 0,5	-	-	-	Mar Caribe	Faust (1992)
-	25 - 40	19,6 - 30	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	Pacífico SO	Rhodes y Thomas (1997)
-	30 - 40	35 - 40	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	Pacífico NO	Nguyen y Larsen (2004)
Redonda, comprimida AP	26 - 40	22 - 36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Atlántico NE; Mar Mediterráneo	Penna et al. (2005)*
Redondeada, comprimida AP	17,5 - 33,7	22,5 - 33,7	-	-	6	4' < 5''; lzda	-	Pentagonal	Igual	0,2 - 0,3	-	-	-	Mar Mediterráneo	Algizaki y Nikolaidis (2006)
Comprimida y esférica (ventralmente)	30 - 40	-	-	-	10 - 12	4' < 5''; lzda	-	-	-	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Dolapsakis et al. (2006)*
-	30 - 55	25 - 45	-	-	9 - 11	-	-	-	-	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Armi et al. (2010)
-	35 - 38	40 - 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Índico NO	Al-Yamani y Saburoba (2010)
Redonda en vista apical, comprimida AP	22 - 33	23 - 37	-	-	7 - 9	4' < 5''; lzda^	1,1 - 1,5	Pentagonal	3''' > 4'''^	-	n. v.	> 40^	-	Atlántico NE	Laza-Martínez et al. (2011)*
-	30 - 50	22 - 45	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	Atlántico NE	Ojeda (2013)
Esférica oblicuamente	25 - 35	25 - 35	-	-	5 - 7	4' < 5''; lzda	1	Pentagonal	3''' > 4'''^	0,15 - 0,3	~ 30^	~ 25^	-	Pacífico O	Ho y Nguyen (2014)
-	-	21 - 38	-	-	9 - 12	-	-	-	-	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Ismael (2014)
Redondeada, comprimida AP	23 - 36	23 - 38	-	-	6 - 9	4' < 5''; lzda	-	Pentagonal	Igual	0,23 - 0,5	~ 30^	~ 40^	-	Atlántico NE	David et al. (2014)*
-	22,1 - 34,5	25,5 - 33,6	-	-	5,7 - 8,8	4' < 5''; lzda^	1 - 2	-	Igual o 3''' > 4'''^	0,18 - 0,28	> 50	~ 50	0,6 - 0,9	Atlántico NO; Atlántico NE	Karafas et al. (2015)*
Redonda	24,3	30	-	-	6,5 - 8,7	4' < 5''; lzda^	0,83 - 1,56	-	Igual	-	> 50^	> 50^	-	Atlántico NO	Leaw et al. (2016)*
-	27,6 - 32,6	28,1 - 33,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Ben-Gharbia et al. (2016)*
-	23 - 32,2	25,6 - 33,3	-	-	6 - 9,3	4' < 5''; lzda	1,2 - 1,9	-	Igual	-	-	> 50^	0,5 - 0,9	Atlántico NO	Lewis et al. (2018)*
Redonda, con forma de lente y comprimida anteroposteriormente	24,6 - 39,7	26 - 40,9	-	-	5 - 9,2	4' < 5''; lzda	1 - 1,7	Pentagonal	Igual o 3''' > 4'''^	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Abdemadher et al. (2021)*
Globular a lenticular, ligera compresión anteroposterior	-	24 - 40	-	-	6 - 8	4' < 5''; lzda^	-	-	-	0,15 - 43	> 50^	~ 50^	-	Atlántico NE	Álvarez et al. (2022)*
Redonda, comprimida AP	30,2-39,5	28-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mar Mediterráneo	Ibghi et al. (2024)*
Esférica, comprimida AP	21,2 - 34,4	18,5 - 31,3	24,5 - 32,2	Lisa	6 - 9,2	4' < 5''; lzda	1,1 - 1,3	-	3''' > 4'''^	0,22 - 0,4	> 50	> 50	0,87 - 0,71	Atlántico NE	Este estudio*

Tabla IV. (Continuación).

Forma	Longitud AP (µm)	Anchura (µm)	Profundidad DV (µm)	Superficie tecal	Largo Po (µm)	Tamaño relativo 4' - 5'' y posición 4'	A/L 6''	Forma 3'	Tamaño relativo placa 3'' vs 4'''	Tamaño poro	N° poros en 4'	N° poros en 5''	Po/2'	Región	Referencia
C. malayensis															
Redonda	28 - 33	27 - 32	-	Lisa	5	4' < 5''; izda	1,2 - 1,5	Cuadrangular	3''' > 4'''	0,3	-	-	-	Pacífico O	Leaw et al. (2010)*
Casi esférica	25,4 - 36,8	24 - 35,4	20,3 - 34,3	Lisa	3,4 - 7,4	4' < 5''; izda	0,8 - 2,1	Pentagonal/ Hexagonal	Igual o 3''' > 4'''	-	~50 ^Δ	~35 ^Δ	-	Pacífico NO	Jeong et al. (2012)*
Esférica (vista DV), elipsoidal (vista lateral)	19,6 - 33,6	19,4 - 33	-	Lisa	4 - 7,4	4' < 5''; izda ^Δ	0,84 - 1,75	Pentagonal	3''' > 4'''	-	~45 ^Δ	~40 ^Δ	-	Pacífico NO	Tawong et al. (2015)*
Más o menos esférica	20 - 32	22 - 33	-	Lisa	-	4' < 5''; izda ^Δ	1,4	Pentagonal	3''' > 4'''	-	-	~50 ^Δ	-	Pacífico NO	Wakeman et al. (2015)*
Ligeramente comprimida	19,3 - 28,8	22,7 - 31,5	21,7 - 36,5	Lisa	5,3 - 6,8	4' < 5''; izda ^Δ	1,3 - 1,6	Pentagonal/ Hexagonal	3''' > 4'''	0,2 - 0,37	> 50	> 50	0,7 - 0,8	Atlántico NO; Mar Caribe	Karafas et al. (2015)*
Redonda	19 - 31	19 - 31	19 - 32	Lisa	4,7 - 9,3	4' < 5''; izda ^Δ	1,2 - 1,6	Cuadrangular	3''' > 4'''	0,27 - 0,35	> 50 ^Δ	> 50 ^Δ	0,62 - 0,8	Atlántico O; Mar Caribe	Leaw et al. (2016)*
Redondeada oblicuamente	22 - 33	19 - 33	-	Lisa	6 - 9	4' < 5''; izda ^Δ	-	Pentagonal	Igual	-	-	-	-	Atlántico O; Mar Caribe	Gómez et al. (2016)*
Esférica	26,7 - 38,8	25,6 - 37,5	-	Lisa	6	4' < 5''; izda ^Δ	-	Pentagonal	3''' > 4'''	-	> 50 ^Δ	> 50 ^Δ	-	Atlántico SO	Mendes et al. (2019)*
Redondeada oblicuamente	20 - 27,5	22,8 - 26,5	21,2 - 31,0	Lisa	3 - 7,1	4' < 5''; izda	1 - 2,2	Pentagonal	-	-	~50 ^Δ	> 50 ^Δ	-	Atlántico SO	Nascimento et al. (2019)*
Casi esférica	16,6 - 25,3	19,6 - 29,3	23,3 - 29,8	Lisa	5,3 - 7,4	4' < 5''; izda ^Δ	-	-	Igual o 3''' > 4'''	0,26 - 0,42	> 50 ^Δ	~30 ^Δ	-	Atlántico SO	Tibrićá et al. (2020)*
Esférica	20,9 - 34,3	19,6 - 29,3	17,2 - 30	Lisa	5,3 - 7,4	4' < 5''; izda	1 - 1,4	-	-	-	~35 ^Δ	> 50 ^Δ	-	Pacífico NO	Zhang et al. (2021)*
Esférica (vista DV), elipsoidal (vista lateral)	22 - 26	25 - 30,9	-	Lisa	4,0 - 7,3	4' < 5''; izda	1,2 - 1,5	Cuadrangular	3''' > 4'''	-	~40 ^Δ	~50 ^Δ	-	Mar Mediterráneo	Abdennadher et al. (2021)*
Redonda	23 - 44	21 - 39	20 - 39	Lisa	5 - 11	4' < 5''; izda ^Δ	1 - 2	Pentagonal	3''' > 4'''	0,28 - 0,34	-	-	-	Pacífico NE	Morquecho et al. (2022)*
Globular	22,5 - 30	18,5 - 24,6	16,2 - 25,9	Lisa	5 - 6,4	4' < 5''; izda ^Δ	-	-	0,16 - 0,33	-	-	-	-	Pacífico SO	Verma et al. (2023)*
	25,3 - 31,3	25,3 - 32,4	29,4 - 34,9	Lisa	5,8 - 7,7	4' < 5''; izda ^Δ	1,4 ± 0,1	Pentagonal	3''' > 4'''	0,35 ± 0,042	-	-	-	Pacífico SE	Uribe et al. (2023)*
Esférica, compresión AP	20,7 - 26,3	19,2 - 26,0	20,8 - 25,9	Lisa	5,6 - 6,3	4' < 5''; izda	1,1 - 1,3	-	3''' > 4'''	0,17 - 0,29	> 50	~30	0,62 - 0,68	Atlántico NE	Este estudio^Δ
C. palmyrensis															
Casi esférica, ligeramente comprimido	16,3 - 25,7	18,5 - 30,1	21,2 - 30,3	Lisa	4,5 - 6,7	4' < 5''; izda	0,9 - 1,6	Pentagonal/ Hexagonal	3''' > 4'''	0,21 - 0,40	19 - 34	21 - 36	0,9 - 1,6	Atlántico O; Pacífico C	Karafas et al. (2015)*
Casi esférica	16,9 - 26,1	17,4 - 27,3	19,1 - 28,4	Lisa ^Δ	5,5 - 7,5	-	-	-	-	0,23 - 0,42	~35 ^Δ	~20 ^Δ	-	Atlántico SO	Tibrićá et al. (2020)*
Casi redonda	23 - 31	21 - 31	20 - 26	Lisa	5 - 8	4' < 5''; izda ^Δ	1 - 2	Pentagonal	3''' > 4'''	0,25 - 0,39	-	~20 ^Δ	-	Pacífico NE	Morquecho et al. (2022)*
Subesférica	18,9 - 26,4	21,2 - 27,1	19,7 - 24,2	Lisa	4,9 - 6	4' < 5''; izda	1,1 - 1,3	-	-	0,17 - 0,32	~20	~20	0,58 - 0,68	Atlántico NE	Este estudio ^Δ
C. santacroce															
Redonda o casi redonda	19,1 - 34,9	20,4 - 31,3	21,7 - 32,9	Lisa	4,7 - 6,7	4' < 5''; izda	1,2 - 2,6	Cuadrangular /	3''' > 4'''	0,20 - 0,84	> 50	> 50	0,6 - 0,8	Mar Caribe	Karafas et al. (2015)*
-	22,6 ± 2,7	22,7 ± 2	23,9 ± 2,5	Lisa ^Δ	-	-	-	-	-	0,23 ± 0,06	-	-	-	Atlántico NO; Mar Caribe	Karafas y Tomas (2015)*
Casi esférica	18 - 30	23,2 - 29,7	24,0 - 30,7	Lisa ^Δ	5,1 - 6,7	4' < 5''; izda ^Δ	-	-	-	0,25 - 0,44	30 - 40 ^Δ	30 - 50 ^Δ	0,28 - 0,36	Atlántico SO	Tibrićá et al. (2020)*

Tabla IV. (Continuación).

Forma	Longitud AP (µm)	Anchura (µm)	Profundidad DV (µm)	Superficie tecal	Largo Po (µm)	Tamaño relativo 4' - 5'' y posición 4'	AIL 6''	Forma 3'	Tamaño relativo placa 3'' vs 4''	Tamaño poro	Nº poros en 4'	Nº poros en 5''	Pol2'	Región	Referencia
<i>C. canariensis</i>															
Casi esférica	27,2 - 38,4	25,6 - 40	-	Epi. lisa/ Hipo. rugosa	8	4' > 5''; centro	1,8	Pentagonal	-	0,17 - 0,41	~ 50 [^]	~ 35 [^]	-	Atlántico NE	Fraga et al. (2008)*
Subesférica	27,5 - 39,0	25,1 - 40,9	24,7 - 39,4	Epi. lisa/ Hipo. rugosa	5,0 - 8,6	4' > 5''; centro	1,6 - 2	-	-	0,17 - 0,41	~ 50	~ 30	-	Atlántico NE	Este estudio*
<i>C. tropicalis</i>															
Esférica	23 - 40	25 - 39	35 - 65	Lisa	7	4' > 5''; centro	3 - 4	Cuadrangular	Igual	0,43	-	-	-	Mar Caribe	Faust (1995)
Subesférica	35 - 47	30 - 45	-	Lisa	7,2 - 12	4' > 5''; centro	3 - 4	Pentagonal	-	-	> 100 [^]	-	-	Pacífico O	Mohammad-Noor et al. (2013)*
Casi esférica	33 - 42	33 - 40	35 - 42	Lisa	6,5 - 8	4' > 5''; centro	2 - 4	-	-	-	> 100 [^]	~ 100 [^]	-	Pacífico SO	Morigliano et al. (2013)*
Esférica	22 - 35	25 - 35	-	Lisa	7 - 9	4' > 5''; centro	4	Pentagonal	3''' > 4'''	0,3 - 0,4	~ 50 [^]	-	-	-	Ho y Nguyen (2014)
Redonda a forma de melocotón	30 - 53	29 - 50	30 - 53	Lisa	7,1 - 9,1	4' > 5''; centro	2,1 - 4,3	-	Igual	0,22 - 0,46	~ 50 [^]	~ 50 [^]	-	Mar Caribe	Leaw et al. (2016)*
Casi esféricas (vista ventral), esféricas (vista antapical)	23,0 - 31,3	26,5 - 31,3	26,3 - 34,8	Lisa	5,9 - 8,2	4' > 5''; centro	3,5 - 4,7	-	-	-	~ 60 [^]	~ 40 [^]	-	Atlántico SO	Nascimento et al. (2019)*
Esférica	32,5 - 46,3	28,8 - 43,8	-	Lisa	4,9	4' > 5''; centro	-	-	Igual	-	-	-	-	Atlántico SO	Mendes et al. (2019)*
Casi esférica	25,6 - 31,3	23,6 - 39,7	24,3 - 39,8	Lisa [^]	6,3 - 8,6	-	-	-	-	0,27 - 0,42	~ 70 [^]	-	-	Atlántico SO	Tibirica et al. (2020)*
Esférica	32,2 - 45,5	29,9 - 42,3	30,0 - 42,3	Lisa	6,6 - 9,8	4' > 5''; centro	1,8 - 2,8	-	-	-	~ 50 [^]	-	-	Pacífico NO	Zhang et al. (2021)*
Casi redonda	31 - 44	31 - 46	36 - 44	Lisa	7 - 12	4' > 5''; centro	2 - 4	Pentagonal	3''' > 4'''	0,24 - 0,32	n. v.	-	-	Pacífico NE	Morquecho et al. (2022)*
globular a subesférica	35,3 - 51,2	32,5 - 40,2	26,2 - 29,1	Lisa	5,7 - 7,3	4' = 5''	-	Pentagonal	-	0,19 - 0,38	-	-	-	Pacífico SO	Verma et al. (2023)*
Esférica	32,8 - 41,6	27,5 - 45,2	32,9 - 44,3	Lisa	6,1 - 9,8	4' > 5''; centro	2,8 - 4	-	-	0,25 - 0,58	~ 100	~ 50	-	Atlántico NE	Este estudio*
<i>C. areolata</i>															
Esférica	30 - 36,5	28 - 36,5	-	Areolada	9 - 10	4' > 5''; centro	2	Pentagonal	Igual	-	-	-	-	Índico SO	Ten-Hage et al. (2000)
Esférica	30 - 51	33 - 55	-	Areolada	10	4' > 5''; centro	1,5	-	-	-	-	-	-	Atlántico NE	Este estudio
<i>C. guanchica</i>															
Redonda	23,2 - 31,3	22,2 - 32	21,4 - 33,9	Lisa	7,2 - 8,3	4' > 5''; centro	1,4 - 2	Pentagonal	Igual	0,24 - 0,58	70 - 89	-	-	Atlántico NE	David et al. (2020)*

4.2. Diversidad y distribución de *Coolia* en las Islas Canarias

En conjunto, los análisis morfológicos y moleculares llevados a cabo en el presente estudio permitieron identificar un total de seis especies del género *Coolia* en la región de estudio, es decir, *C. areolata*, *C. canariensis*, *C. malayensis*, *C. monotis*, *C. palmyrensis* y *C. tropicalis*. Este resultado, junto con la reciente descripción de *C. guanchica* por David *et al.* (2020) en la isla de Tenerife, sitúa a todas las especies conocidas de este género en las Islas Canarias a excepción de *C. santacroce*. En vista de esta diversidad, las Islas Canarias emergen como la región del mundo que presenta la mayor riqueza de especies de *Coolia* hasta el momento, incrementando así la diversidad encontrada en estudios anteriores, en los cuales se había observado hasta un máximo de tres (Momigliano *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2017; Larsson *et al.*, 2019; Phua *et al.*, 2021) o cuatro especies (Tibiriçá *et al.*, 2020) coexistiendo en la misma región. Además, la diversidad encontrada en las Islas Canarias es particularmente elevada si se tiene en cuenta la pequeña superficie que ocupa este archipiélago en comparación con otras regiones investigadas como la Gran Barrera de Coral (Momigliano *et al.*, 2013) o la costa de Brasil (Tibiriçá *et al.*, 2020).

En este estudio se identificaron también tres de los cuatro miembros reconocidos hasta el momento dentro del “complejo *C. canariensis*”, es decir, *C. canariensis sensu stricto* y los filogrupos *C. cf. canariensis* I y II. Hasta ahora, la mayoría de estudios habían documentado la presencia de un único filogrupo en sus regiones de estudio, es decir, de *C. cf. canariensis* I (Fraga *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2012; David *et al.*, 2014; Leung *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021) o *C. cf. canariensis* II (Nascimento *et al.*, 2019) mientras que, únicamente Phua *et al.* (2021) documentaron la presencia de dos miembros de este complejo, es decir, *C. cf. canariensis* I y III, coexistiendo en la isla de Guam (Pacífico Occidental). Así, los resultados obtenidos en el presente estudio convierten a las Islas Canarias en la región del mundo en presentar también la mayor diversidad para este conjunto críptico.

Rhodes *et al.* (2000) sugirieron que la distribución global que presentaba *C. monotis* (= *Coolia* spp.) se debía a su capacidad para sobrevivir en un amplio rango de temperaturas. Estudios posteriores realizados en condiciones de laboratorio demostraron que la temperatura del agua de mar es un factor importante que influencia de forma diferente el crecimiento de las distintas especies que forman el género y, por tanto, su distribución (p. ej. Mohammad-Noor *et al.*, 2013; Larsson *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). En este sentido, la elevada diversidad encontrada en las Islas Canarias podría ser en gran medida consecuencia del gradiente térmico del agua de mar que existe entre los dos extremos del archipiélago, con aguas más cálidas en las islas occidentales y gradualmente más frías hacia la costa africana que, en determinadas épocas del año pueden alcanzar hasta 3 °C de diferencia (Navarro-Pérez y Barton, 2001). Este hecho parece favorecer la coexistencia de especies adaptadas a diferentes temperaturas como *C. monotis* y *C. malayensis*, para las que se consideraba que sus distintos requerimientos térmicos impedían su solapamiento geográfico (Gómez *et al.*, 2016), pero para las cuales este estudio supone la segunda ocasión en la que se documenta su coexistencia después de que Abdennadher *et al.* (2021) hiciera lo propio en el sur del Mar Mediterráneo (costa de Túnez). La idoneidad de las temperaturas de las aguas canarias también fue aludida por Rodríguez *et al.* (2017) en su estudio como un factor clave en el favorecimiento de la presencia de una considerable diversidad de especies del género *Gambierdiscus* en esta región que, tal y como se ha observado para *Coolia*, también podría explicarse por los distintos requerimientos térmicos que presentan algunas de sus especies (capítulo 3).

Además de la temperatura, otros parámetros ambientales podrían contribuir a la elevada diversidad observada en el archipiélago canario. A pesar de que la existencia de preferencias de las especies de *Coolia* por ciertos ambientes no está clara, algunas especies han sido asociadas con hábitats específicos. Por ejemplo, *C. canariensis* fue descrita por Fraga *et al.* (2008) a partir de muestras de macroalgas recogidas en charcos de marea, hábitats muy comunes en Tenerife y otras islas occidentales del archipiélago canario en los que las especies que los habitan están adaptadas a fuertes cambios en factores ambientales como la temperatura, la salinidad o la luz (Sansón *et al.*, 2001),

mientras que *C. areolata* fue descrita por Ten-Hage *et al.* (2010) en fondos arenosos de la Isla de Reunión (Océano Índico). En este sentido, la larga línea de costa que presentan las Islas Canarias (~ 1500 km) junto con la riqueza y diversidad de su morfología, permite la aparición y el desarrollo de numerosos hábitats y ecosistemas diferentes (Hernández *et al.*, 2013) que, en conjunto, parecen resultar adecuados para albergar un número elevado de especies de este género con diferentes requerimientos ecológicos.

El origen de la diversidad marina encontrada en las Islas Canarias podría ser consecuencia de los significativos cambios climáticos que han ocurrido durante el Plioceno tardío y el Cuaternario. De acuerdo con Meco *et al.* (2011) y Meco *et al.* (2020), a lo largo de estos períodos las Islas Canarias experimentaron fluctuaciones considerables en el clima, incluyendo variaciones en las temperaturas del mar, la salinidad y la disponibilidad de nutrientes. Estas fluctuaciones climáticas fueron evidenciadas por la presencia de distintos organismos fósiles en los depósitos de cada periodo. Así, en periodos interglaciares, las condiciones más cálidas favorecieron a especies termófilas como los corales del género *Siderastrea* y los gasterópodo del género *Persististrombus*. Por otro lado, los periodos glaciares trajeron consigo aguas más frías y ricas en nutrientes, evidenciado por la presencia de registros fósiles de foraminíferos y diatomeas adaptados a estas condiciones. De este modo, la variabilidad de las condiciones marinas a lo largo del tiempo puede haber facilitado la presencia y adaptación paulatina de una variedad de especies de *Coolia* con distintos requerimientos ecológicos.

Como ya se ha comentado anteriormente, las preferencias ecológicas que muestran las distintas especies influyen en su distribución (Larsson *et al.*, 2019). Dentro de la región de estudio, el resultado más notable fue la amplia distribución mostrada por *C. malayensis* en comparación con el resto de especies, que presentaron en general una distribución mucho más restringida. De acuerdo con esta observación, algunos autores han documentado la existencia de un patrón de distribución similar de las especies en sus regiones de estudio (Gómez *et al.*, 2016; Larsson *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.*, 2020), lo que sugiere que *C. malayensis* presenta requerimientos térmicos menos exigentes que el resto de especies. Sin

embargo, cabe señalar que la distribución observada en las Islas Canarias podría haber estado sesgada por un menor esfuerzo de muestreo en las islas más pequeñas y menos accesibles, es decir, El Hierro, La Palma, La Gomera, Fuerteventura, Lanzarote y La Graciosa, en comparación con Gran Canaria y Tenerife que son las islas capitalinas y, por tanto, las más accesibles y mejor dotadas de infraestructuras (laboratorios). También es necesario reconocer el hecho de que la distribución que se presenta en este estudio está basada en la viabilidad de los cultivos establecidos. En este sentido, los especímenes de algunas especies podrían haberse adaptado mejor que los de otras a las condiciones de cultivo empleadas en este estudio, lo que también podría haber supuesto una fuente de sesgo importante. Todo ello impide, por tanto, descartar la posibilidad de que algunas especies con distribuciones aparentemente más restringidas presenten en realidad una mayor distribución en esta región.

En conjunto, la diversidad y distribución encontrada para el género *Coolia* en las Islas Canarias tiene implicaciones importantes para el seguimiento y estudio de BHABs en la región, pues tres de las cuatro especies consideradas como potencialmente tóxicas, es decir, *C. malayensis* y *C. palmyrensis* y *C. tropicalis* fueron identificadas, presentando además dos de ellas (*C. malayensis* y *C. tropicalis*) las distribuciones más amplias entre todas las especies identificadas. A pesar de que aún no se ha documentado ningún caso de intoxicación humana relacionado con especies de este género, cabe señalar que algunos estudios sugieren que las toxinas sintetizadas por especies del *Coolia* y otros géneros BHAB como *Ostreopsis*, podrían estar implicadas en la complejidad y variabilidad de síntomas desarrollados por personas afectadas por la CP (p. ej. Tindall y Morton 1998), pese a lo cual dichas toxinas aún no han sido observadas en animales positivos en CTX (Tester y Kibler, 2018). Por ejemplo, Holmes *et al.* (1994) registraron altas concentraciones celulares de *C. tropicalis* (identificada en aquel momento como *C. monotis*) en una zona del este de Australia con alta incidencia de CP, lo que llevó a estos investigadores a sugerir en un primer momento la posible implicación de este género en el síndrome. Sin embargo, los estudios toxicológicos realizados un año después por Holmes *et al.* (1995) no pudieron demostrar la presencia de la toxina producida por *C. tropicalis* en los peces productores de CP. Recientemente, Tibiriçá *et al.* (2020) han demostrado

por primera vez que *C. tropicalis* es capaz de producir 44-metil gambierona (anteriormente conocida como maio toxina-3; MTX3) y un nuevo isómero de este compuesto, una toxina producida también por especies del género *Gambierdiscus* que se comporta de manera similar a la CTX (Murray *et al.*, 2019) y junto con la cual se sospecha que podría tener papel importante en la producción de la CP (Pisapia *et al.*, 2017), lo que supone una evidencia más de la posible implicación del género *Coolia* en la CP.

4.3. Distribución mundial de las especies de *Coolia* presentes en Canarias

Los resultados obtenidos en este estudio también han contribuido a expandir la distribución mundial hasta ahora conocida de las especies del género *Coolia*. La identificación de *C. monotis* implica la confirmación de su presencia en las Islas Canarias. Ojeda (2013) ya documentó la presencia de esta especie en la región, pero no aportó confirmación genética en sus identificaciones. Leaw *et al.* (2016) sugirieron que los estudios en los que no se habían empleado técnicas moleculares para confirmar la identidad de *C. monotis* podrían haber sobreestimado su distribución geográfica ya que, como se ha comentado anteriormente, la descripción original de esta especie abarcaba un complejo de especies crípticas. Desde la delimitación de *C. monotis sensu stricto* por Leaw *et al.* (2010), la distribución de esta especie quedó restringida a zonas templadas del Atlántico Norte y el Mar Mediterráneo (Fig. 13). Por tanto, la confirmación genética de su identidad en este estudio permite situar en las Islas Canarias su registro más meridional hasta la fecha. Sin embargo, a pesar de la acotada distribución que parece presentar esta especie, su distribución real podría ser mayor. Por ejemplo, Abdennadher *et al.* (2021) documentaron recientemente la presencia de *C. monotis* en la costa sur del Mar Mediterráneo, donde las temperaturas máximas en verano pueden situarse cercanas a los 30 °C. Esta parte del Mediterráneo está conectada desde 1869 con el Mar Rojo por el Canal de Suez, un estrecho canal artificial considerado la principal puerta de entrada de especies invasoras desde el Mar Rojo y el Océano Índico hacia el Mar Mediterráneo (migración lessepsiana) por medio, por ejemplo, de las aguas de lastre de los buques que lo atraviesan (Gómez *et al.*, 2005) o del *biofouling* que

estos llevan adherido a sus cascos. Aunque menos frecuente, la existencia de migraciones en sentido contrario (migración antillessepsiana) también ha sido documentada (p. ej. Golani, 1999). Por ello, no se puede descartar la posibilidad de que *C. monotis* esté presente también en el Mar Rojo o incluso en el Océano Índico donde las temperaturas son similares a las del sur del Mar Mediterráneo; más aún si se tiene en cuenta que la diversidad y distribución de este género en dicha área es aún desconocida, pues los pocos estudios relacionados con especies BHAB se han centrado en otros géneros como *Gambierdiscus* y *Ostreopsis* (Catania *et al.*, 2017), o no han realizado análisis moleculares para confirmar la identidad de *C. monotis* (Al-Yamani y Saburova, 2010). Por otro lado, tampoco se puede descartar que *C. monotis* se encuentre, tal y como se ha observado en el hemisferio norte, presente en aguas templadas del hemisferio sur donde también existe un desconocimiento total en relación a la diversidad y distribución del género *Coolia*, a excepción de los estudios realizados en costa sur de Australia y norte de Nueva Zelanda por Larsson *et al.* (2019).

Desde la delimitación taxonómica de las especies que forman el “complejo *C. monotis*”, *C. malayensis* ha resultado ser la especie más ampliamente distribuida (Fig. 13), lo que sugiere que un gran porcentaje de los registros de *C. monotis* realizados hasta la descripción de *C. malayensis* en el año 2010 correspondían en realidad a esta especie. Sin embargo, a pesar de su amplia distribución, esta especie no había sido aún observada en el Atlántico oriental y, por tanto, su identificación en este estudio supone su primer registro en esta parte del océano. En concreto, se sabe que *C. malayensis* se encuentra ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Gómez *et al.*, 2016), mientras que su presencia en zonas templadas ha sido apenas documentada (p. ej. Larsson *et al.*, 2019). Esto podría explicar porque esta especie no había sido aún observada en el Atlántico oriental, donde todos los estudios han sido llevados a cabo en la zona templada del hemisferio norte (Penna *et al.*, 2005; David *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2022) y ninguno en aguas tropicales o subtropicales de la costa africana, donde existe una alta probabilidad de que esta especie se encuentre ampliamente distribuida como ya se ha observado en la parte occidental equivalente de este océano.

C. palmyrensis y, especialmente *C. tropicalis*, han sido documentadas con frecuencia en zonas tropicales y subtropicales del Océano Pacífico y del Océano Atlántico, aunque en este último los registros han sido más escasos y restringidos a la zona occidental (Fig. 13; Karafas *et al.*, 2015; Leaw *et al.*, 2016; de Mendes *et al.*, 2019, Nascimento *et al.*, 2019; Tibiriçá *et al.*, 2020; Phua *et al.*, 2021; Morquecho *et al.*, 2022). Por tanto, la presencia de estas especies en las Islas Canarias supone también la expansión de su distribución conocida hacia la zona oriental de este océano. Como se ha comentado en el caso de *C. malayensis*, resulta muy probable que ambas especies se encuentren también ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de la costa atlántica africana.

Este estudio supone la segunda observación de *C. areolata* desde su descripción por Ten-Hage *et al.* (2000) en la isla de Reunión y en dos islas del Canal de Mozambique (Océano Índico NO) (Fig. 13). Al-Yamani y Saburova (2010) documentaron la presencia de esta especie en fondos arenosos de la costa de Kuwait. Sin embargo, estos autores se refirieron a ella como *C. cf. areolata*. En su estudio, Al-Yamani y Saburova identificaron las células encontradas de acuerdo a su tamaño y forma, así como al tamaño de su Po, pero no hicieron referencia a la distintiva ornamentación que caracteriza a esta especie, la cual tampoco es apreciable en las imágenes que aportaron en su estudio, por lo que la identidad de los especímenes encontrados quedó sin resolver. Resulta llamativo el hecho de que *C. areolata* no haya sido documentada en otras regiones del mundo desde su descripción. Una posible explicación para esto podría ser la falta de información genética que existe para esta especie, lo que podría haber causado que muchos estudios y programas de seguimiento en los que las identificaciones han sido basadas principalmente en la biología molecular hayan ignorado su presencia. Hasta el momento, la única información que se deriva de la distribución conocida de esta especie es que podría estar restringida a regiones subtropicales del planeta.

La presencia de *C. canariensis* en las Islas Canarias supone también la segunda cita de esta especie después de que Fraga *et al.* (2008) la describiera en esta misma región, por lo que en este caso su distribución permanece restringida a

las Islas Canarias, y más concretamente a la isla de Tenerife. Este es también el caso de *C. guanchica* (David *et al.*, 2020). De nuevo no existe una explicación aparente que permita explicar la distribución tan restringida que presentan estas dos especies. En el caso de *C. guanchica*, una posible explicación para esto podría ser que, dada su reciente descripción, esta especie haya sido ignorada y/o confundida durante años con otras especies como *C. monotis* en estudios en los especímenes fueron examinados únicamente mediante el empleo de microscopios ópticos.

Con respecto a los otros dos miembros del “complejo *C. canariensis*” identificados en este estudio, *C. cf. canariensis* (I) ya fue identificado por primera vez por Fraga *et al.* (2008) en la descripción original de *C. canariensis* en este archipiélago y hasta ahora ha sido el filogrupo más comúnmente documentado en todo el mundo, mientras que la identificación de *C. cf. canariensis* (II) supone la segunda cita de este filogrupo después de su descubrimiento en la isla de Trinidad (Brasil, Océano Atlántico) por Nascimento *et al.* (2019), y por tanto este permanece por el momento restringido al Océano Atlántico.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio junto con aquellos obtenidos en estudios anteriores parecen indicar que, en general, las especies que forman el género *Coolia* presentan áreas de distribución geográfica que se solapan, lo que sugiere una distribución continua y diversa de este género a través de zonas tropicales y subtropicales de todo el planeta, pero particularmente dentro de Océano Atlántico, donde ya se han documentado todas las especies descritas hasta la fecha (Fig. 13). Sin embargo, la distribución más restringida que presentan algunas de especies como *C. monotis* señala la existencia de requerimientos ecológicos diferentes o más específicos (p. ej. temperatura) dentro del género. En este sentido, y como ya se ha comentado anteriormente, las Islas Canarias han resultado ser un punto geográfico que reúne las condiciones necesarias para la coexistencia de especies con diferentes requerimientos ecológicos.

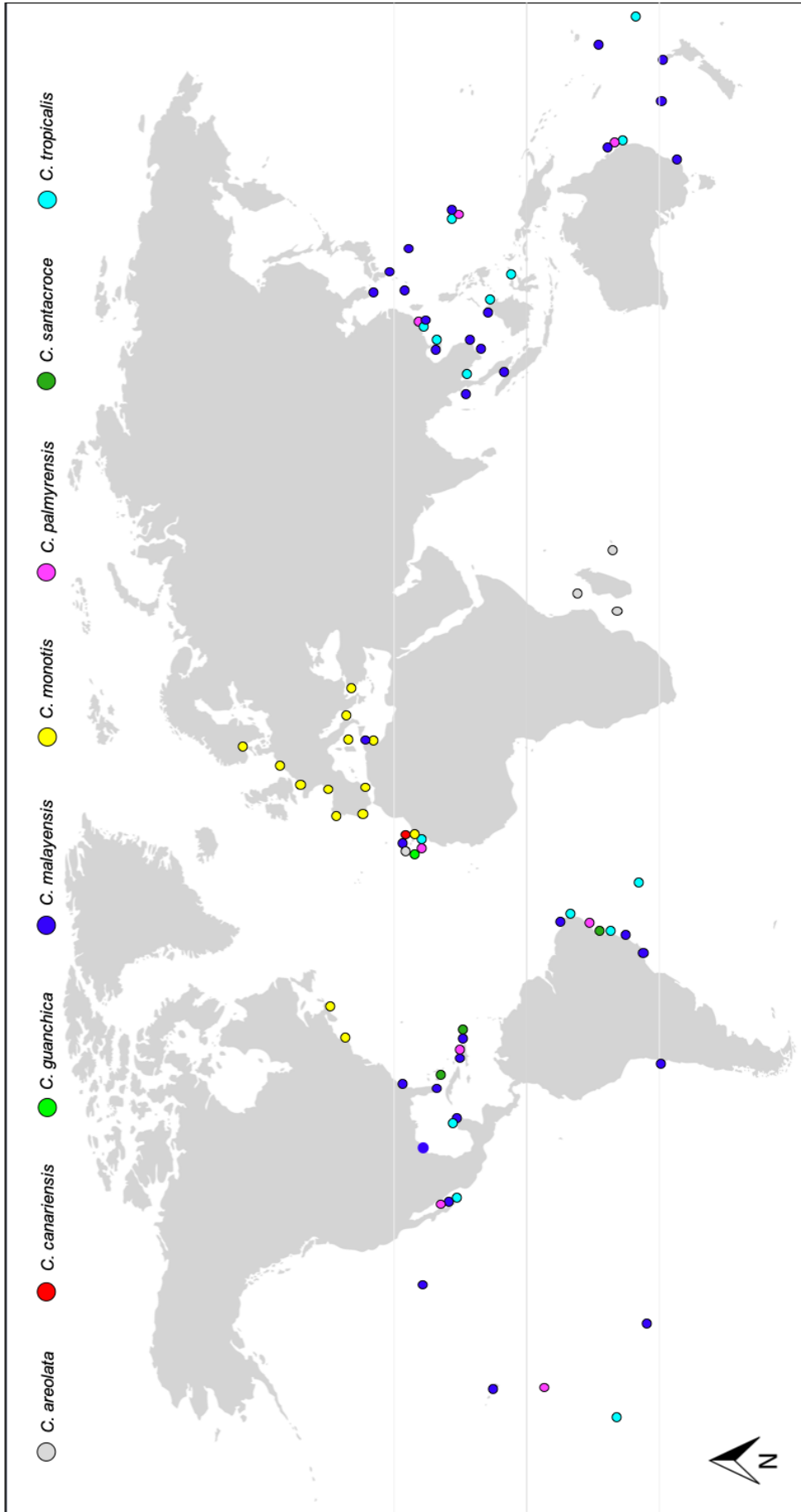


Figura 13. Presencia mundial del género *Cooiia* a partir de los resultados obtenidos en estudios en los que se combinaron técnicas microscópicas y moleculares a excepción de *C. areolata*, para la cual aún no existe información molecular. Referencias: Leaw *et al.* (2016), Gómez *et al.*, 2017, Nascimento *et al.* (2019), Mendes *et al.* (2019), Tiberiça *et al.* (2020), Zhang *et al.* (2021), David *et al.* (2020), Phua *et al.* (2021), Phua *et al.* (2021), Álvarez *et al.* (2021), Morquecho *et al.* (2022), Verma *et al.* (2023), este estudio.

Bibliografía

Abdennadher, M., Zouari, A. B., Medhioub, W., Penna, A., Hamza, A., 2021. Characterization of *Coolia* spp. (Gonyaucales, Dinophyceae) from Southern Tunisia: first record of *Coolia malayensis* in the Mediterranean Sea. *Algae*, 36(3), 175-193.

Al-Yamani, F., Saburova, M. A., 2010. *Illustrated Guide on the Flagellate*. Kuwait: Kuwait Institute for Scientific Research, 197.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful algae*, 5(6), 717-730.

Álvarez, E. A., Klemm, K., Hoppenrath, M., Cembella, A., John, U., Karlson, B., 2022. Temporal and spatial distribution of epibenthic dinoflagellates in the Kattegat-Skagerrak, NE Atlantic—Focus on *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*. *Harmful Algae*, 118, 102318.

Amorim, A., Veloso, V., Rodríguez, F., Fraga, S., 2013. Life cycle, morphology and phylogeny of species of *Fragilidium Balech* from west Iberia. In *Biological and geological perspectives of dinoflagellates* (pp. 215-224). The Micropaleontological Society London.

Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environmental Monitoring and Assessment*, 164(1), 423-433.

Carrillo-Afonso, J., 2014. *Lista de algas marinas de las islas Canarias*. Sociedad Española de Ficología (SEF). 64 pp

Ben-Gharbia, H., Yahia, O. K. D., Amzil, Z., Chomérat, N., Abadie, E., Masseret, E., Sibat, M., Triki, H. Z., Nouri, H., Laabir, M., 2016. Toxicity and growth assessments of three thermophilic benthic dinoflagellates (*Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) developing in the Southern Mediterranean basin. *Toxins*, 8(10), 297.

Besada, E. G., Loeblich, L. A., Loeblich III, A. R., 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science*, 32(3), 723-735.

Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., Moore S. K., Hoagland, P., Enevoldsen, H., 2016. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 61-91.

Besada, E.G., Loeblich, L.A., Loeblich III, A.R., 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. Bull. Mar. Sci. 32 (3), 723-735.

Bravo, I., Rodríguez, 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.

David, H., Laza-Martínez, A., Miguel, I., Orive, E., 2014. Broad distribution of *Coolia monotis* and restricted distribution of *Coolia* cf. *canariensis* (Dinophyceae) on the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. Phycologia, 53(4), 342-352.

David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., Orive, E., 2020. *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). European journal of phycology, 55(1), 76-88.

Dolapsakis, N. P., Kilpatrick, M. W., Economou-Amilli, A., Tafas, T., 2006. Morphology and rDNA phylogeny of a Mediterranean *Coolia monotis* (Dinophyceae) strain from Greece. Scientia Marina, 70(1), 67-76.

Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., Okolodkov, Y. B., 2019. A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America. Frontiers in Marine Science, 6, 148.

Faust, M. A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. Journal of phycology, 31(6), 996-1003.

Fernández-Palacios, J. M., Whittaker, R. J., 2008. The Canaries: an important biogeographical meeting place. Journal of Biogeography, 35(3), 379-387.

Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., & Zapata, M. (2008). *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. Journal of phycology, 44(4), 1060-1070.

Fraga, S., 2014. Caracterización taxonómica y ecología de especies crípticas o pseudocrípticas de dinoflagelados nocivos (Tesis doctoral, Universidade de Vigo).

Fukuyo, 1981. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. Journal of the Japanese Society of Fisheries Science" 47(8), 967-978.

Gómez, F., 2006. Endemic and Indo-Pacific plankton in the Mediterranean Sea: a study based on dinoflagellate records. *Journal of Biogeography*, 33(2), 261-270.

Gómez, F., Qiu, D., Otero-Morales, E., Lopes, R. M., Lin, S., 2016. Circumtropical distribution of the epiphytic dinoflagellate *Coolia malayensis* (Dinophyceae): Morphology and molecular phylogeny from Puerto Rico and Brazil. *Phycological Research*, 64(3), 194-199.

Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D., Enevoldsen, H. O., 2004. Manual on harmful marine microalgae. UNESCO.

Hernández, J. C., Clemente, S., Tuya, F., Pérez-Ruzafa, A., Sangil, C., Moro-Abad, L., Bacallado-Aránega, J. J., 2013. Echinoderms of the Canary Islands, Spain. In *Echinoderm research and diversity in Latin America* (pp. 471-510). Springer, Berlin, Heidelberg.

Ho, T. V., Nguyen, L. N., 2014. Morphology and distribution of the three epiphytic dinoflagellate species *Coolia monotis*, *C. tropicalis*, and *C. canariensis* (Ostreopsidaceae, Gonyaulacales, Dinophyceae) from Vietnamese coastal waters. *Ocean Science Journal*, 49(3), 211-221.

Holmes, M. J., Lewis, R. J., Jones, A., Hoy, A. W. W., 1995. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Nat. Toxins*, 3, 355–362.

Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates-unveiling their worldwide biodiversity. *Schweizerbart Sche Vlgshb.* 276 pp.

Ibghi, M., Rijal Leblad, B., L'Bachir El Kbiach, M., Aboualaalaa, H., Daoudi, M., Masseret, E., Le Floc'h, E., Hervé, F., Bilien, G., Chomerat, N., Amzil, Z., Laabir, M., 2024. Molecular Phylogeny, Morphology, Growth and Toxicity of Three Benthic Dinoflagellates *Ostreopsis* sp. 9, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* Developing in Strait of Gibraltar, Southwestern Mediterranean. *Toxins*, 16(1), 49.

Jeong, H. J., Yih, W., Kang, N. S., Lee, S. Y., Yoon, E. Y., Yoo, Y. D., Kim, H. S., Kim, J. H., 2012. First report of the epiphytic benthic dinoflagellates *Coolia canariensis* and *Coolia malayensis* in the waters off Jeju Island, Korea: morphology and rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(2), 114-133.

John, U., Litaker, R. W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M. L., Anderson, D. M., 2014. Formal revision of the *Alexandrium tamarensis* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist*, 165(6), 779-804.

Karafas, S., York, R., Tomas, C., 2015. Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 46, 18-33.

Kofoed, C. A., 1909. On *Peridinium steini* Jörgensen, with a note on the nomenclature of the skeleton of the Peridinidae. *Archiv für Protistenkunde*, 16: 25–47.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.

Lassus, P., Chaumérat, N., Hess, P., Nézan, E., 2016. Toxic and harmful microalgae of the World Ocean. International Society for the Study of Harmful Algae and the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation.

Larsson, M. E., Smith, K. F., Doblin, M. A., 2019. First description of the environmental niche of the epibenthic dinoflagellate species *Coolia palmyrensis*, *C. malayensis*, and *C. tropicalis* (Dinophyceae) from Eastern Australia. *Journal of phycology*, 55(3), 565-577.

Laza-Martinez, A., Orive, E., Miguel, I., 2011. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European journal of phycology*, 46(1), 45-65.

Leaw, C. P., Lim, P. T., Cheng, K. W., Ng, B. K., Usup, G., 2010. Morphology and molecular characterization of a new species of thecate benthic dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (dinophyceae). *Journal of phycology*, 46(1), 162-171.

Leaw, C. P., Tan, T. H., Lim, H. C., Teng, S. T., Yong, H. L., Smith, K. F., Rhodes, L., Wolf, M., Holland, W. C., Vandersea, M. W. Litaker, R. W., Tester, P., A., Gu, H., Usup, G., Lim, P. T., 2016. New scenario for speciation in the benthic dinoflagellate genus *Coolia* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 55, 137-149.

Lee, E. S., Hwang, J., Hyung, J. H., Park, J., 2021). Detection of the benthic dinoflagellates, *Ostreopsis* cf. *ovata* and *Amphidinium massartii* (Dinophyceae), using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(8), 885.

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Murray, J. S., Passfield, E. M., D'Archino, R., Nelson, W., Nishimura, T., Thompson, L., Trnski, T., 2023. Sub-tropical benthic/epiphytic dinoflagellates of Aotearoa New Zealand and Rangitāhua Kermadec Islands. *Harmful Algae*, 128, 102494.

Lewis, N. I., Wolny, J. L., Achenbach, J. C., Ellis, L., Pitula, J. S., Rafuse, C., Rosales, D. S., McCarron, P., 2018. Identification, growth and toxicity assessment of *Coolia Meunier* (Dinophyceae) from Nova Scotia, Canada. *Harmful algae*, 75, 45-56.

Li, X., Yan, M., Gu, J., Lam, V. T., Wai, T. C., Baker, D. M., Thompson, P. D., Yiu, S. K. F., Lam, P. K. S., Leung, P. T., 2020. The effect of temperature on physiology, toxicity and toxin content of the benthic dinoflagellate *Coolia malayensis* from a seasonal tropical region. *Water Research*, 185, 116264.

Lim, P. T., Leaw, C. P., Ogata, T., 2007. Morphological variation of two *Alexandrium* species responsible for paralytic shellfish poisoning in Southeast Asia. *Botanica Marina* 50, 14–21

Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J., Tester, P.A., 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. *Journal of phycology* 39 (4), 754–761.

Mann, D. G., Evans, K. M., 2008. The species concept and cryptic diversity. In *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae* (pp. 262-268). Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Meco, J., Muhs, D. R., Fontugne, M., Ramos, A. J., Lomoschitz, A., Patterson, D. (2011). Late Pliocene and quaternary Eurasian locust infestations in the Canary archipelago. *Lethaia*, 44(4), 440-454.

Meco, J., Lomoschitz, A., Koppers, A. A., Miggins, D. P., Huertas, M. J., Betancort, J. F., Soler-Onis, E. (2020). Late Miocene and Early Pliocene coastal deposits from the Canary Islands: New records and paleoclimatic significance. *Journal of African Earth Sciences*, 164, 103802.

Mendes, M. C. Q., Nunes, J. M. C., Fraga, S., Rodriguez, F., Franco, J. M., Riobo, P., Branco, S., Menezes, M. 2019. Morphology, molecular phylogeny and toxinology of *Coolia* and *Prorocentrum* strains isolated from the tropical South Western Atlantic Ocean. *Bot. Mar.* 62:125-140. <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0053>

Meunier, A., 1919. Microplancton de la mer Flamande. 3me partie. Les Périдиниens. *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique* 8(1): 1-111, 7 pls.

Mohammad-Noor, N., Moestrup, Ø., Lundholm, N., Fraga, S., Adam, A., Holmes, M. J., Saleh, E., 2013. Autecology and phylogeny of *Coolia tropicalis* and *Coolia malayensis* (Dinophyceae),

with emphasis on taxonomy of *C. tropicalis* based on light microscopy, scanning electron microscopy and LSU r DNA. *Journal of phycology*, 49(3), 536-545.

Morquecho, L., Gárate-Lizárraga, I., Gu, H., 2022. Morphological and molecular characterization of the genus *Coolia* (Dinophyceae) from Bahía de La Paz, southwest Gulf of California. *Algae*, 37(3), 185-204.

Moro-Abad, L., Martín, J. L., Garrido, M. J., Izquierdo, I., 2003. Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales). Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 248 pp.

Murray, J. S., Selwood, A. I., Harwood, D. T., Van Ginkel, R., Puddick, J.; Rhodes, L. L., Rise, F., Wilkins, A. L. 2019. 44-Methylgambierone, a new gambierone analogue isolated from *Gambierdiscus australes*. *Tetrahedron Lett.*, 60, 621–625.

Nakajima, I., Oshima, Y.; Yasumoto, T., 1981. Toxicity of Benthic Dinoflagellates in Okinawa. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 1029–1033.

Nascimento, S. M., da Silva, R. A., Oliveira, F., Fraga, S., Salgueiro, F., 2019. Morphology and molecular phylogeny of *Coolia tropicalis*, *Coolia malayensis* and a new lineage of the *Coolia canariensis* species complex (Dinophyceae) isolated from Brazil. *European journal of phycology*, 54(3), 484-496.

Nguyen, N. L., Larsen, J., 2004. Gonyaulacales. In Larsen, J. Nguyen, N. L. (Eds.) *Guide to the Identification of Potentially Toxic Microalgae in Vietnamese Waters*. *Opera Bot.* 140, Copenhagen, pp. 73–116.

Ojeda, A., 1998. *Dinoflagelados de Canarias: estudio taxonómico y ecológico* (Tesis doctoral).

Ojeda, A. 2013, Presencia del género *Karenia* y nuevos registros de dinoflagelados (Dinoflagellata) en aguas de las Islas Canarias, Atlántico Centro-Oriental. Informe técnico nº 15. Instituto Canario de Ciencias Marinas Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información. Gobierno de Canarias

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M. G., Andreoni, F., Riobó, P. & Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology* 41:212-25.

Phua, Y. H., Roy, M. C., Lemer, S., Husnik, F., Wakeman, K. C., 2021. Diversity and toxicity of Pacific strains of the benthic dinoflagellate *Coolia* (Dinophyceae), with a look at the *Coolia canariensis* species complex. *Harmful Algae*, 109, 102120.

Rhodes, L. L., Thomas, A. E., 1997. *Coolia monotis* (Dinophyceae): a toxic epiphytic microalgal species found in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 31: 139 – 141

Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34(2), 371-383.

Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R. I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae*, 67, 131 - 143.

Sansón, M., Reyes, J., Afonso-Carrillo, J., 2001. Flora marina. Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología y Conservación. Ed Turquesa, Santa Cruz de Tenerife, 193-198.

Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., Anderson, D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30, 999–1011.

Silva, E. S., Faust, M. A., 1995. Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia*, 34(5), 396-408.

Tamura K, Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.

Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2015. Characterization of *Gambierdiscus* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates from Thailand based on morphology and phylogeny. *Phycological Research*, 63(2), 125-133.

Taylor, F. J. R., Hoppenrath, M., Saldarriaga, J. F. 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodivers Conserv.*; 17: 407–418.

Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J. P., Couté, A., 2000. *Coolia areolata* sp. nov. (Dinophyceae), a new sand-dwelling dinoflagellate from the southwestern Indian Ocean. *Phycologia*, 39(5), 377 - 383.

Tibiricá, C. E. J. D. A., Sibat, M., Fernandes, L. F., Bilien, G., Chomérat, N., Hess, P., Mafra, L. L., 2020. Diversity and toxicity of the genus *Coolia meunier* in Brazil, and detection of 44-methyl gambierone in *Coolia tropicalis*. *Toxins (Basel)* 12, 1–24.

Uribe, E., Álvarez, G., Cárcamo, C., Díaz, P. A., Rengel, J., & Blanco, J. (2023). First report of epiphytic dinoflagellate *Coolia malayensis* (Dinophyceae) in the southeastern Pacific Ocean. *Journal of Phycology*, 59(4), 725-737.

Verma, A., Hoppenrath, M., Smith, K. F., Murray, J. S., Harwood, D. T., Hosking, J. M., Rongo, T., Rhodes, L. L., Murray, S. A. (2023). *Ostreopsis* Schmidt and *Coolia* Meunier (Dinophyceae, Gonyaulacales) from Cook Islands and Niue (South Pacific Ocean), including description of *Ostreopsis tairoto* sp. nov. *Scientific Reports*, 13(1), 3110.

Wakeman, K.C., Yamaguchi, A., Roy, M.C., Jenke-Kodama, H., 2015. Morphology, phylogeny and novel chemical compounds from *Coolia malayensis* (Dinophyceae) from Okinawa, Japan. *Harmful Algae*, 44, 8–19.

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. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 46(11), 1397-1404.

Zhang, H., Lü, S., Cen, J., Li, Y., Li, Q., Wu, Z., 2021. Morphology and molecular phylogeny of three species of *Coolia* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(3), 1020-1032.

Material suplementario

Tabla SI. Aislamientos de *Coolia* realizados en el Observatorio Canario de Algas Nocivas entre el 2016 y el 2020 en las Islas Canarias.

CÓDIGO	Localidad	Isla	Fecha muestreo	Sustrato
OCH-30	Orchilla	El Hierro	dic.- 16	macroalga
OCH-50	Valle Gran Rey	La Gomera	jun.- 17	artificial
OCH-64	Orchilla	El Hierro	ago.- 17	macroalga
OCH-79	Orchilla	El Hierro	ago.- 17	macroalga
OCH-89	Charco Azul	La Palma	ago.- 17	macroalga
OCH-93	El Salado	La Graciosa	sep.- 17	macroalga
OCH-94	El Salado	La Graciosa	sep.- 17	macroalga
OCH-108	Tacorón	El Hierro	nov.- 17	macroalga
OCH-109	Tacorón	El Hierro	nov.- 17	macroalga
OCH-110	Tacorón	El Hierro	nov.- 17	macroalga
OCH-149	Playa Chica	Gran Canaria	ago.- 18	macroalga
OCH-172	Caletón Blanco	Lanzarote	nov.- 18	artificial
OCH-178	Charco Manso	El Hierro	dic.- 18	macroalga
OCH-180	Charco Manso	El Hierro	dic.- 18	macroalga
OCH-195	Muelle de Taliarte	Gran Canaria	ene.- 19	<i>Halimeda</i>
OCH-199	Muelle de Taliarte	Gran Canaria	ene.- 19	<i>Halimeda</i>
OCH-209	Muelle de Taliarte	Gran Canaria	en.- 19	<i>Halimeda</i>
OCH-215	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-216	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-217	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-218	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-224	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-225	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-226	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-227	Playa Chica (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-228	Playa Chica (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-229	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-232	Playa Chica (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	<i>Dictyota</i>
OCH-233	Caletón Blanco	Lanzarote	feb-19	Artificial
OCH-234	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-241	Peña la vieja (Las Canteras)	Gran Canaria	feb-19	sedimento
OCH-242	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-243	Taliarte	Gran Canaria	feb-19	<i>Asparagopsis</i>
OCH-250	La Restinga	El Hierro	mar-19	<i>Jania</i>
OCH-252	Tacorón (13 m)	El Hierro	mar-19	mezcla macro
OCH-255	La Restinga	El Hierro	mar-19	<i>Jania</i>
OCH-260	Tacorón (13 m)	El Hierro	mar-19	mezcla macro
OCH-265	Tacorón (13 m)	El Hierro	mar-19	sedimento
OCH-266	La Restinga	El Hierro	mar-19	<i>Jania</i>
OCH-357	Los Gigantes (piscina)	Tenerife	jul.-19	macroalgas
OCH-366	Charco Verde	La Palma	jul.-19	Artificial
OCH-368	Punta Gorda	La Palma	jul.-19	macroalgas
OCH-371	Los Gigantes (piscina)	Tenerife	jul.-19	macroalgas
OCH-467	Majanicho	Fuerteventura	ago.-20	macroalgas
OCH-468	Majanicho	Fuerteventura	ago.-20	macroalgas
OCH-469	Majanicho	Fuerteventura	ago.-20	macroalgas
OCH-470	Majanicho	Fuerteventura	ago.-20	macroalgas
OCH-471	Caletón Blanco	Lanzarote	sept.-20	macroalgas
OCH-472	El Salado	La Graciosa	sept.-20	sedimento
OCH-479	Las conchas (El Cotillo)	Fuerteventura	sept.-20	macroalgas
OCH-486	El Salado	La Graciosa	sept.-20	sedimento

CAPÍTULO

5

DISCUSIÓN FINAL

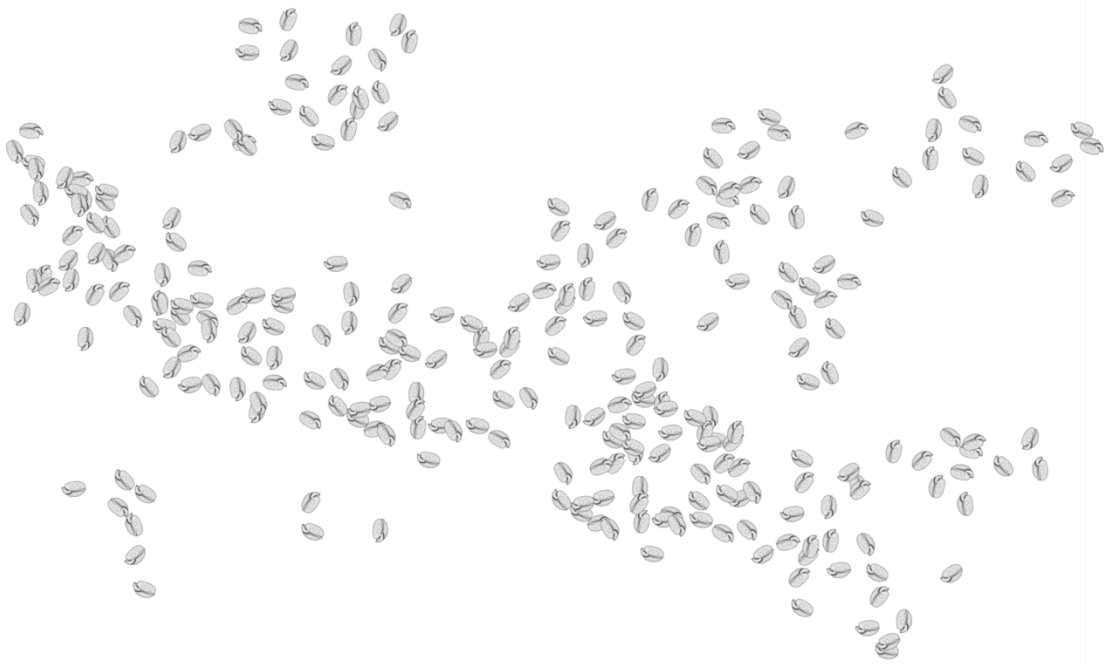


Ilustración realizada por Hulburt (1957) para la descripción de *Amphidinium carterae*.

Los estudios desarrollados dentro de la presente tesis doctoral contribuyen al avance de la investigación sobre dinoflagelados BHAB en las Islas Canarias, iniciada a partir del año 2004 como consecuencia de la detección de los primeros casos de ciguatera (CP) en la región. Uno de los objetivos principales que tiene toda la investigación relacionada con HABs es el desarrollo de estrategias de seguimiento (vigilancia) eficaces para una detección temprana de los organismos responsables y, en el caso de los HABs tóxicos, de las toxinas que estos producen. Estas estrategias son las que permiten tomar medidas de gestión oportunas de manera anticipada para evitar, o al menos reducir, los impactos negativos que pueden producir estos eventos sobre la salud pública, el medio ambiente y la economía (Anderson *et al.*, 2001). En el caso de los HABs tóxicos, el diseño de estrategias para el seguimiento combinado de organismo y toxina supone, idealmente, la manera más efectiva de prevenir posibles impactos. Sin embargo, la falta de estándares de toxinas o el elevado coste económico que implican la preparación de las muestras y el equipamiento técnico necesario para su análisis suponen en la actualidad obstáculos importantes para su detección rutinaria y a gran escala en los programas de seguimiento (Lehane y Lewis, 2000; Litaker *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2014). Por el contrario, el seguimiento de los organismos, basado principalmente en la identificación y la cuantificación de sus células, representa una estrategia más económica, sencilla y precoz de prevenir los impactos que causan estos eventos (Vassalli *et al.*, 2018; Tester *et al.*, 2022). En este sentido, el fin último de los estudios llevados a cabo dentro de la presente tesis doctoral ha sido el de investigar algunas de las cuestiones que aún permanecían sin resolver y que eran necesarias para posibilitar el desarrollo y establecimiento de estrategias de seguimiento de BHABs efectivas “basadas en células” (*cell-based monitoring strategies*) en las Islas Canarias.

Uno de los mayores impedimentos para el seguimiento de las poblaciones de dinoflagelados BHAB ha sido la falta de un método cuantitativo estándar para una comparación realista de sus concentraciones celulares entre diferentes escalas espacio-temporales (Berdalet *et al.*, 2017). La importancia de usar metodologías estandarizadas es especialmente evidente en regiones como las Islas Canarias, en las que el elevado número de hábitats y sustratos a los que

estos organismos pueden encontrarse asociados hacen complicada la elección de un único sustrato preferencial (p. ej. una especie de macroalga). A pesar de ello, los estudios realizados en esta región han estado basados, tal y como sucede en otras regiones del mundo, en la recolección de diferentes especies de macroalgas, tanto por la facilidad como por la inmediatez que conlleva esta estrategia. Para solucionar los inconvenientes que supone el uso de sustratos naturales, Tester *et al.* (2014) propusieron un método alternativo de muestreo basado en sustratos artificiales que permite normalizar las concentraciones celulares a una superficie de tamaño conocido. Un primer grupo de experimentos realizados para evaluar la aplicabilidad de estos sustratos en las Islas Canarias mostró resultados similares a los obtenidos por Tester *et al.* (2014) en el Mar Caribe y el Océano Índico y por Jauzein *et al.* (2016, 2018) en el Mar Mediterráneo: i) un tiempo de colonización de 24 h es suficiente para alcanzar un equilibrio entre las poblaciones de dinoflagelados presentes en el medio y aquellas que colonizan los sustratos artificiales y ii) un tamaño muestral ~ 7 permite alcanzar una variabilidad aceptable entre réplicas y, por tanto, estimaciones de abundancia celular precisas (capítulo 2). Por sí solos, estos resultados suponen una nueva evidencia de la eficacia del sustrato artificial como método estándar para la estimación de concentraciones celulares de dinoflagelados BHABs. Sin embargo, el inconveniente de tener que retornar al punto de muestreo tras 24 h para su recuperación supone, probablemente, el mayor freno para su incorporación como alternativa a las macroalgas en programas de seguimiento de todo el mundo. Una vez evaluada la eficacia de este método, el resultado más notable obtenido en la región macaronésica fue la observación de que, en muchos casos, los sustratos artificiales proporcionaban estimaciones de abundancia celular significativamente menos variables que las obtenidas a través de un número equivalente de macroalgas (capítulo 2). Estos resultados contrastaron con los obtenidos por Tester *et al.* (2014), quienes no encontraron diferencias significativas de variabilidad entre sustratos debido, probablemente, a la existencia de diferencias en relación al diseño del sustrato artificial empleado, a la estrategia seguida en el muestreo de las macroalgas o al análisis estadístico de los datos entre ambos estudios (capítulo 2). Sin duda, este hallazgo supone otra razón de peso que justifica volver al punto de muestreo tras 24 h en favor de la obtención de resultados que

no sólo resultan comparables entre lugares y tiempos, sino también más precisos.

La falta de un método estándar para el muestreo de dinoflagelados BHAB también ha supuesto una de las causas principales por las cuales su ecología ha permanecido en gran medida incierta o desconocida (Hoppenrath *et al.*, 2014). La información que se puede obtener de los estudios ecológicos resulta de gran relevancia en el diseño de estrategias eficaces para el seguimiento de estos organismos, pues permite conocer la dinámica de sus poblaciones: ¿dónde crecen?, ¿cuándo crecen? o ¿qué factores favorecen su crecimiento? En este sentido, otra de las ventajas que supone el uso de sustratos artificiales es la posibilidad de diseñar estudios estadísticamente sólidos y “a la carta”, es decir, independientes de los sustratos naturales disponibles y que pueden ser repetidos tantas veces como sea necesario (Tester *et al.*, 2014). En el tercer capítulo de esta tesis, los sustratos artificiales fueron empleados para investigar el papel de la profundidad en la distribución de las poblaciones de dinoflagelados bentónicos presentes en el sur de la isla de El Hierro durante un año, una cuestión que ha resultado complicada de evaluar en estudios anteriores por la distribución tan heterogénea que a menudo presentan las comunidades macroalgales en los gradientes verticales y que, en las Islas Canarias, tiene una relevancia especial por la presencia de zonas profundas muy cerca de la costa. El primer resultado derivado de este estudio fue la observación de que algunos géneros, es decir, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium*, presentan sus máximas abundancias celulares en zonas más profundas de las que se consideran de forma rutinaria en estudios ecológicos y programas de seguimiento (p. ej. Reguera *et al.*, 2011). Este resultado sugirió que estos lugares ofrecen una serie de condiciones ambientales que resultan más favorables para estos géneros, mientras que no resultan tan adecuados para el crecimiento de otros como *Ostreopsis* y *Coolia*. En concreto, se encontró que el movimiento del agua, un factor ambiental raramente considerado (Parsons *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2020), determina en gran medida la presencia de las máximas abundancias celulares de estos géneros en zonas alejadas de la superficie donde la influencia del oleaje y de las corrientes es menor, pudiendo incluso provocar su ausencia cerca de esta (capítulo 3). Dada la relevancia de

Gambierdiscus como consecuencia de su ya demostrada relación con la CP (Chinain *et al.*, 2021), y la existencia de diferencias en la toxicidad que presentan sus especies (Tester *et al.*, 2020), un segundo análisis estuvo enfocado en investigar la distribución vertical de las especies que integran este género en el área de estudio. El uso de sustratos artificiales facilitó este análisis pues, en comparación con las macroalgas, otra de las ventajas que ofrece este método es la obtención de muestras más limpias y más concentradas (capítulo 2), lo que resulta especialmente adecuado para la consecución de resultados estadísticamente fiables en lugares en los que los niveles de abundancia celular son relativamente bajos, como los que se observaron en el sur de la isla de El Hierro. El resultado más destacable fue la observación de que *G. excentricus*, la especie más tóxica de las que están presentes en el archipiélago (Pisapia *et al.*, 2017), fue la menos abundante y la que presentó la distribución más restringida, pues esta fue sólo detectada en los niveles más profundos y en determinadas épocas del año, probablemente como consecuencia de su afinidad por aguas más frías en comparación con el resto de especies que forman este género (capítulo 3; Tester *et al.*, 2020). La detección de *G. excentricus* en la isla de El Hierro, junto con la observación de las máximas abundancias celulares de *Gambierdiscus* en zonas más profundas de las comúnmente muestreadas, sugiere que los estudios llevados a cabo en las Islas Canarias durante estos años podrían haber estado subestimando la presencia, diversidad y concentración celular de este género y, por tanto, el riesgo por CP al considerar únicamente zonas de muestreo someras y periodos específicos del año.

Como consecuencia de su supuesta relación con los casos de CP ocurridos en la región, la mayor parte de la investigación llevada a cabo en las Islas Canarias ha estado centrada en la taxonomía, toxicidad y distribución del género *Gambierdiscus*. Sin embargo, los experimentos realizados en el segundo y tercer capítulo mostraron que otros géneros BHAB no solo son comunes en las comunidades microfítobentónicas donde crece *Gambierdiscus*, sino que además estos pueden alcanzar altas concentraciones celulares. En este sentido, la completa evaluación del riesgo asociado a estos fenómenos durante las labores de seguimiento requiere conocer y considerar todas las especies potencialmente tóxicas que están presentes en una región (Hallegraeff *et al.*, 2004). Por este

motivo, el cuarto capítulo de esta tesis estuvo enfocado a evaluar la diversidad y distribución de *Coolia* en las Islas Canarias, un género que incluye hasta cuatro especies productoras de toxinas que, además, podrían estar involucradas en el síndrome de la CP (Tibiricá *et al.*, 2020). Aunque la existencia de preferencias de las especies que forman este género por sustratos específicos no se conoce completamente, los resultados obtenidos en el segundo capítulo indicaron que las poblaciones de *Coolia* que colonizan las redes de fibra plástica pueden provenir de una variedad de sustratos y, por tanto, con el objetivo de incrementar las posibilidades de detectar todas las especies presentes en el área de estudio, la estrategia de muestreo involucró la recogida de diferentes especies de macroalgas, sedimento y sustratos artificiales. Estos sustratos fueron recogidos principalmente en zonas someras, donde los resultados obtenidos en el tercer capítulo indicaron que las poblaciones de *Coolia* presentan sus mayores concentraciones celulares. Sin embargo, la existencia de preferencias en la distribución vertical de las especies que forman este género tampoco se conoce todavía y, por tanto, la estrategia de muestreo también incluyó la recogida de sustratos en zonas más profundas, de nuevo con el objetivo de incrementar las posibilidades de detectar el mayor número posible de especies. Como resultado se identificaron siete de las ocho especies taxonómicamente aceptadas hasta la fecha, lo que convierte a las Islas Canarias en la región que presenta la mayor diversidad para este género en todo el mundo. Desde un punto de vista de gestión, esta diversidad supone la presencia de tres de las cuatro especies potencialmente tóxicas reconocidas dentro del género, siendo además dos de ellas, es decir, *C. malayensis* y *C. tropicalis*, las que aparentemente presentaron la distribución más amplia en el archipiélago. Otra observación importante fue la indispensabilidad de las técnicas moleculares para la discriminación de las especies del “complejo *C. monotis*” presentes en las Islas Canarias. Este hecho puso de manifiesto que las características morfológicas que previamente les habían sido asignadas como distintivas por Leaw *et al.* (2010) y Karafas *et al.* (2015) se solapan entre ellas, lo que dificulta su rápida identificación en programas de seguimiento y sugiere la necesidad de reconsiderar su estatus críptico. Además, las técnicas moleculares también permitieron identificar un tercer miembro del complejo *C. canariensis*, aumentando así la diversidad críptica aún por dirimir que presenta este género en la región.

Bibliografía

Anderson, D. M., Andersen, P., Bricelj, V. M., Cullen, J. J., Rensel, J. J., 2001. Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters (p. 268). Paris, France: Unesco.

Berdalet, E., Tester, P. A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., Zingone, A., 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography*, 30(1), 36-45.

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.

Chinain, M., Gatti, C. M. I., Darius, H. T., Quod, J. P., Tester, P. A., 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae*, 102, 101873.

Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D., 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO Monogr. Oceanogr. Methodol. 11. Paris: UNESCO. 792 pp.

Hoppenrath, M., Murray, S. A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates- unveiling their worldwide biodiversity. *Schweizerbart Sche Vlgsgb.* 276 pp.

Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 300–304.

Jauzein, C., Açaf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116–127.

Karafas, S., York, R., Tomas, C., 2015. Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 46, 18-33.

Leaw, C. P., Lim, P. T., Cheng, K. W., Ng, B. K., Usup, G, 2010. Morphology and molecular characterization of a new species of thecate benthic dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (Dinophyceae) 1. *Journal of phycology*, 46(1), 162-171.

Lehane, L., Lewis, R. J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 91–125.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., Chinain, M., Holmes, M.J., Tester, P.A., 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon* 56, 711–730.

Tester, P. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandersea, M. W., Leaw, C. P., Lim, P. T., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M. A., Litaker, R. W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8–25.

Tester, P. A., Litaker, R. W., Berdalet, E., 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful algae*, 91, 101655.

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.

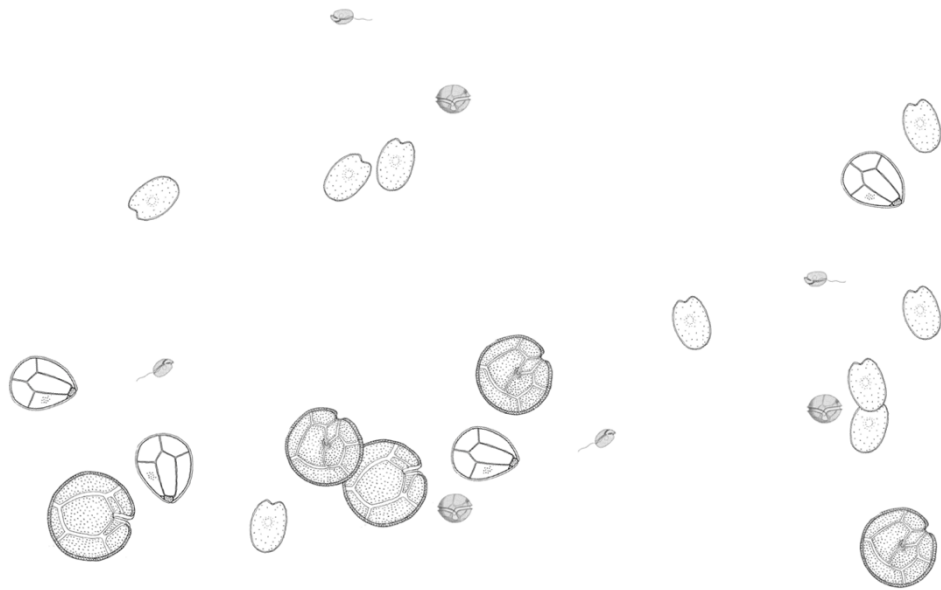
Pisapia, F., Holland, W. C., Hardison, D. R., Litaker, R. W., Fraga, S., Nishimura, T., Adachi, Nguyen-Ngoc, L., Séchet, V., Amzil, Z., Herrenknecht, C., M., Hess, P., 2017. Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae*, 63, 173-183.

Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S., 2011. Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI UNESCO y OIEA, pp. 59.

Tibiricá, C.E.J.A.; Sibat, M.; Fernandes, L.F.; Bilién, G.; Chomérat, N.; Hess, P.; Mafra, L.L., Jr., 2020. Diversity and Toxicity of the Genus *Coolia* Meunier in Brazil, and Detection of 44-methyl Gambierone in *Coolia tropicalis*. *Toxins*, 12, 327.

Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M.A., Souad, T.S., Açaç, L., Abboud-Abi, S.M., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 85, 1092–1100.

CONCLUSIONES



1. Los sustratos artificiales de 170 cm² alcanzan un equilibrio con las poblaciones presentes en los sustratos naturales cercanos tras 24 h y una variabilidad aceptable con una replicación de n=7.
2. Los sustratos artificiales permiten comparaciones más realistas entre diferentes escalas espacio-temporales. Por ello, representan el método de muestreo más adecuado hasta la fecha para el estudio y seguimiento de dinoflagelados BHAB en la región.
3. El “bajo” nivel de correspondencia entre sustratos artificiales y macroalgas en las abundancias celulares de *Ostreopsis* y *Coolia* sugiere que la colonización de los sustratos artificiales proviene de diversas fuentes y, por tanto, que estos proporcionan estimaciones de abundancia celular que integran gran parte de la variabilidad presente en los hábitats bentónicos donde se sitúan estos sustratos.
4. El nivel de correspondencia entre sustratos para *Ostreopsis* y *Coolia* hace que la transformación de las abundancias celulares expresadas como células g⁻¹ a células cm⁻² resulte arriesgada en programas de seguimiento y gestión.
5. La abundancia celular *Ostreopsis* y *Coolia* disminuye con la profundidad, mientras que la de *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* aumenta. En Canarias, estos patrones parecen ser consistentes para cada género en el tiempo. Sin embargo, estos deberán ser corroborados en diferentes lugares y tiempos mediante el empleo de enfoques de muestreo fiables y estandarizados.
6. El movimiento del agua y la luz son parámetros predictores de gran valor de los patrones verticales de dinoflagelados BHAB en la región de estudio; *Ostreopsis* y *Coolia* están adaptados a los altos niveles de luz propios de zonas someras, mientras que *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Amphidinium* están adaptados a los bajos niveles de movimiento de agua propios de zonas más profundas.
7. La ausencia constante de *G. excentricus* en el nivel más somero y en todos los niveles de profundidad evaluados durante uno de los periodos de muestreo

en la isla de el Hierro sugiere una afinidad estenoterma en comparación con el resto de especies. Este hallazgo pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios ecológicos que consideren especies y no sólo géneros.

8. La abundancia y distribución de las especies de *Gambierdiscus* en las Islas Canarias podría haber sido subestimada al considerar sólo períodos de muestreo y rangos de profundidad limitados. Por ello, resulta necesario reevaluar los protocolos de muestreo para mejorar la detección, cuantificación y evaluación de los riesgos asociados a este y otros géneros de dinoflagelados BHAB.

9. En las Islas Canarias, *Coolia* está formado por un total de siete de las ocho especies descritas hasta la fecha, es decir, *C. areolata*, *C. canariensis*, *C. guanchica*, *C. malayensis*, *C. monotis*, *C. palmyrensis* y *C. tropicalis*, lo que convierte a esta región en el lugar que presenta la mayor diversidad del mundo para este género.

10. Tres de las siete especies de *Coolia* presentes en las Islas Canarias están consideradas como potencialmente tóxicas, siendo una de ellas, es decir, *C. malayensis*, la especie más ampliamente distribuida en el archipiélago. Por ello, este género debe ser tenido en cuenta en los programas de seguimiento de la región.

11. *C. areolata* y *C. tropicalis* presentaron características morfológicas que permitieron su identificación inequívoca del resto de especies. Por el contrario, la morfología no permitió una diferenciación clara de las especies del “complejo *C. monotis*”. Por tanto, las especies de este complejo deben ser consideradas crípticas hasta la obtención de nuevas evidencias morfológicas. Hasta entonces, el empleo de la biología molecular supone la única manera fiable de diferenciarlas.

12. Las identificaciones realizadas en las Islas Canarias suponen el primer registro de *C. malayensis*, *C. palmyrensis* y *C. tropicalis* en la parte oriental del Océano Atlántico, el registro más meridional de *C. monotis* hasta la fecha y la segunda cita de *C. areolata* desde su descripción en el Océano Índico.

ANEXO

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DURANTE LA TESIS

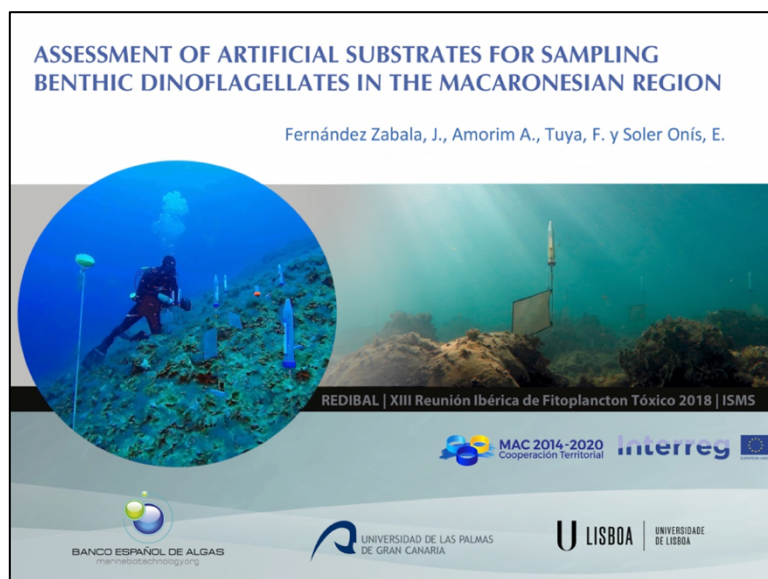
1. Comunicaciones en congresos

Como primer autor

Fernández-Zabala, J., Soler-Onís, E., Amorim, A., Tuya F., Ojeda-Rodriguez, A., 2017. Benthic dinoflagellates ecology: Testing the Artificial Substrate Method across environmental gradients. Presentación oral. 11th International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates (DINO11), Burdeos, Francia



Fernández-Zabala, J., Amorim A., Tuya, F., Soler-Onís, E., 2018. Evaluación del sustrato artificial para el muestreo de dinoflagelados bentónicos en la región macaronésica. Presentación oral. XIII Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas (REDIBAL), Vigo, España



Fernández-Zabala, J., Amorim, A., Tuya, F., Soler-Onís, E., 2018. Are macroalgae a reliable method for the quantification of BHAB? Presentación oral. 18th International Congress on Harmful Algae (ICHA), Nantes, Francia



Mención honorífica concedida por la *International Society for the Study of harmful Algae* (ISSHA) por la presentación oral de un estudiante en el 18th *International Congress on Harmful Algae*.

Fernández-Zabala, J., Herrera, R., Soler-Onís, E., 2019. Estudio de la dinámica HABs en Macaronesia: Metodología. Presentación oral. Congreso Proyecto MIMAR: Cambio global en la región macaronésica. Gran Canaria, España



Fernández-Zabala, J., Amorim, A., Tuya, F., Herrera, R., Soler-Onís, E. (2022). Playing hide and seek: Distribution with depth of potentially harmful epibenthic dinoflagellates of Southern El Hierro Island, Canary Islands (NE Atlantic). Presentación oral. 12th International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates (DINO12), Gran Canaria, España



Como coautor

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2017. New records of benthic dinoflagellates (Dinophyceae) from the Canary Islands: consequence of the global change? Presentación oral. 11th International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates (DINO11), Burdeos, Francia

Amorim, A.; Fernández-Zabala, J., Carbó-Mestre, P., Caeiro, M.F., Soler-Onís, E., 2017. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). Poster. 11th International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates (DINO11), Burdeos, Francia

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Amorim A., 2018. *Somelike it hot*: Diversidad del género *Ostreopsis* en la región macaronésica. Presentación oral. XIII Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas (REDIBAL), Vigo, España

Acosta, F., Herrera, R., Montero, D., Soler-Onís, E., Fernández-Zabala J., Cruz, R., Santana-Abreu, T., Vega B., Bravo, J., 2018. Monitoring of ciguatera toxin carrier fishes in El Hierro island after a toxic dinoflagellated bloom. Presentación oral. XIII Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas (REDIBAL), Vigo, España

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., 2018. First report of *Gambierdiscus* and *Ostreopsis* genera from São Vicente island, Cape Verde. Presentación oral. 18th International Congress on Harmful Algae (ICHA), Nantes, Francia

Soler-Onís, E., Gómez, M., Herrera, A., Fernández-Zabala, J., 2018. Are drifting microplastics entry vectors of alien species in the Canary Islands? Poster. International Conference: Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions (MICRO2018), Lanzarote, España

Pisapia, F., Marrero-Alemán, C., Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Acosta, F., Bravo, J., Portillo Hahnefeld, E., Assunção, P., 2019. Study of growth and toxin production of cultured *Gambierdiscus* spp. strains from Macaronesia. Presentación Oral. 7th European Phycological Congress, Zagreb, Croacia

Assunção, P., Pisapia, F., Gonzalez, M., Marrero-Alemán, C., Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Portillo Hahnefeld, E., 2019. Effect of salinity over two strains of *Gambierdiscus* spp.: searching for cyst-forming conditions. Poster. 7th European Phycological Congress, Zagreb, Croacia

Pisapia, F., Marrero-Alemán, C., Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Acosta, F., Bravo, J., Portillo Hahnefeld, E., Assunção, P., 2019. Cell growth and toxin production of *Gambierdiscus* spp. strains from the macaronesian region. Poster. Aquaculture Europe, Berlin, Alemania

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., 2019. Las islas Canarias como *hotspot* en diversidad de microalgas nocivas. Identificación y distribución de especies. Presentación oral. Congreso Proyecto MIMAR: Cambio global en la región macaronésica. Gran Canaria, España

Tester, P., Berdalet, E., Chinain, M., Dechraoui Bottein, M.Y., Fernández-Zabala, J. Garrido-Gamarro, E., Litaker, W., Soler-Onís, E., 2021. Early Warning Systems for *Gambierdiscus*, a Benthic HAB. Presentación oral. 19th International Congress on Harmful Algae (ICHA), La Paz, México

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., 2022. “Observatorio Canario de Algas Nocivas: novedades en el estudio y seguimiento de HABs en Canarias”. Presentación oral. XIV Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas (REDIBAL), Lisboa, Portugal

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., 2022. “Diversidad y distribución del género *Coolia* (Dinophyceae) en las Islas Canarias” XXIII Simposio Internacional de Botánica Criptogámica, Valencia, España

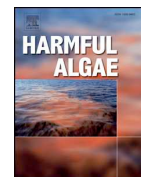
Diogène, J., Rambla-Alegre M., Campàs, M., Sánchez-Henao, A., Alcaraz, C., Benito, X., Andree, K., Prado, P., Gimeno-Monforte, S., Alkassar, M., Reverté, J., Rey, M., Costa J. L., Martín, F., González, M. A., Real, F., Soler-Onís, E., Padilla, D., Fernández-Zabala, J., Caballero, M. J., Déniz, S., Silva, F. A., Ramos, M. J., Darías, Y. J., Fernández, A. J., 2023. Modelling toxin producing microalgae and the emergence of ciguatoxins in fish in europe under climate change scenarios. 20th International Congress on Harmful Algae (ICHA), Hiroshima, Japón

2. Publicaciones en revistas

Como primer autor

Fernández-Zabala, J., Tuya, F., Amorim, A., Soler-Onís, E., 2019. Benthic dinoflagellates: Testing the reliability of the artificial substrate method in the Macaronesian region. *Harmful Algae* 87, 101634. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101634>

Fernández-Zabala, J., Amorim, A., Tuya, F., Herrera, R., Soler-Onís, E., 2022. Playing hide and seek: Distribution with depth of potentially harmful epibenthic dinoflagellates of Southern El Hierro Island, Canary Islands (NE Atlantic). *Harmful Algae*, 117, 102271. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102271>



Benthic dinoflagellates: Testing the reliability of the artificial substrate method in the Macaronesian region



Juan Fernández-Zabala^{a,*}, Fernando Tuya^b, Ana Amorim^{c,d}, Emilio Soler-Onís^a

^a Banco Español de Algas, FPCT de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Muelle de Taliarte s/n, 35215, Telde, Gran Canaria, Spain

^b IU-ECOQUA, Grupo en Biodiversidad y Conservación, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas, Canary Islands, Spain

^c Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, MARE-Marine and Environmental Sciences Centre, Campo Grande, 1749-016, Lisboa, Portugal

^d Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Departamento Biologia Vegetal, Campo Grande, 1749-016, Lisboa, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Artificial substrate
Sampling design
Monitoring
BHABs
Gambierdiscus
Ostreopsis

ABSTRACT

The suitability of the 'artificial substrate' method, i.e. standardized surfaces of fiberglass screens, for the quantification of four benthic harmful algal bloom (BHAB) dinoflagellates (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia*) was tested relative to estimates from natural macroalgal substrates. Sampling took place in a variety of intertidal and subtidal coastal habitats under different water motion conditions, at depths from 1 to 7 m, in two archipelagos of the Macaronesia region: The Canary Islands and Cape Verde. An immersion time of 24 h was sufficient to adequately estimate dinoflagellate abundances. Seven replicates were established as the ideal replication level, considering both reproducibility and sampling effort. In most cases, cell abundances of the four dinoflagellate genera showed lower variability on artificial substrates than on macroalgae, leading to more reliable estimates of abundances. The ratio of mean cell abundances on artificial substrates to mean cell abundances on macroalgae highly varied among sampling sites for each genus. This was especially true for *Ostreopsis* and *Coolia*. Thus, given the potentially harmful nature of benthic dinoflagellates, the transformation of abundances expressed as cells g⁻¹ of macroalgae to abundances expressed as cells cm⁻² is risky, and it should not be attempted in monitoring and management programs of harmful microalgae. In summary, results of this study support the use of artificial substrates in monitoring programs of BHAB dinoflagellates, while the risks of using macroalgae are stressed.

1. Introduction

Blooms of benthic harmful dinoflagellates (BHABs) represent important public health and environmental risks (Hallegraeff, 1993). In particular, species of the genera *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia* can produce potent toxins that affect marine organisms, the environment and human health (GEOHAB, 2012; Hoppenrath et al., 2013; Wakeman et al., 2015). In the last decade, BHABs have become a major concern because of their expansion to areas outside their known endemic distribution, attracting the interest of the scientific community and policy-makers (GEOHAB, 2012). One of the major constraints to the understanding of the dynamics of BHABs has been the lack of a standardized sampling method for a precise estimation of cell abundances, which are crucial to establish alarm concentration levels for potential BHAB events and their associated risks worldwide. The occurrence of BHABs in structurally complex environments, which usually are formed by different substrates such as algae, seagrass, sand, rocks or

corals, complicates the design of quantitative sampling strategies both for monitoring and research purposes (Yasumoto et al., 1980; GEOHAB, 2012; Yong et al., 2018). The most common collection method for BHAB species uses macroalgae, from which the epiphyte community is detached and BHAB cells enumerated. Results are then expressed as cells g⁻¹ of algal wet weight or dry weight (Reguera et al., 2011). Macroalgae have the advantage of being common in many marine habitats, where they can be easily collected. In general, researchers collect multiple species of macroalgae at the same sampling site (Lobel et al., 1988). However, the collection of different species has some important disadvantages. Macroalgae have different surfaces, morphologies and production of secondary metabolites that influence the BHAB preferences (Lobel et al., 1988; Parsons et al., 2011; Rains and Parsons, 2015). While these preferences are not well understood (Selina et al., 2014), in general, macroalgae with high surface to mass ratios are considered preferred hosts, as they have the capacity to support high densities of epiphytic dinoflagellates (Lobel et al., 1988; Bomber and

* Corresponding author.

E-mail address: juan11187@gmail.com (J. Fernández-Zabala).

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101634>

Received 25 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 18 June 2019
1568-9883/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Aikman, 1989; Reguera et al., 2011). The problem of using different species is that comparisons of BHAB abundances may not be realistic (Lobel et al., 1988; Richlen and Lobel, 2011). Some authors considered that the selection of a single macroalgae species is more appropriate to avoid errors (Lobel et al., 1988). Unfortunately, intensive sampling of the same species is not always possible due to the spatial and temporal (life cycles) variability in macroalgal distribution (Tuya and Haroun, 2006; Tester et al., 2014; Mehdipour et al., 2015). In turn, such local differences in macrophyte communities across space and times (seasons) affect BHAB abundances (Lobel et al., 1988; Tester et al., 2014).

Recently, new methods have been proposed to circumvent these problems, through the use of 'artificial substrates' (Faust, 2009; Tester et al., 2014; Jauzein et al., 2016; Mangialajo et al., 2017; Parsons et al., 2017). These methods are based on the assumption that benthic dinoflagellates are capable of colonizing new substrates after a period of time in a similar proportion relative to their abundances in the environment (Nakahara et al., 1996; Tester et al., 2014). One of the major advantages of these methods is the normalization of cell abundance to surface area of the artificial substrate, with the establishment of a standard unit of measurement (cells cm^{-2}). This strategy allows for reliable comparisons at different scales of spatial and temporal variation. Of the several artificial substrates that have been proposed, fiberglass screens of a known surface area have recently been tested with promising results for different BHAB genera in a range of marine habitats, including the Caribbean Sea, the Indo-Pacific Ocean (Tester et al., 2014) and the Mediterranean Sea (Jauzein et al., 2016, 2018). Aiming at the selection of a standard method for BHAB cell monitoring, these studies have addressed several questions, such as ideal incubation time, screen surface area and mesh size and the number of replicates; correlations between BHAB abundances in screen surfaces and natural substrates also have helped to unravel the reliability of these procedures (Tester et al., 2014; Jauzein et al., 2016, 2018). Results so far have suggested that BHAB abundances can be assessed adequately using fewer than nine replicated fiberglass screens, where they reach equilibrium with the surrounding environment after 24 h of incubation. These studies also indicated that cell abundances of dinoflagellates, on screens and the surrounding macrophytes, are well correlated, with no significant differences on the variability of cell concentration estimations between both methods.

Since 2004, several outbreaks of Ciguatera Fish Poisoning (CFP), a syndrome caused by toxins produced by dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus* (GEOHAB, 2012), have been reported from the North Atlantic archipelagos of Macaronesia: the Canary Islands (Pérez-Arellano et al., 2005), Madeira (Otero et al., 2010) and Cape Verde (local newspapers documenting symptoms in agreement with CFP after consumption of fish). In 2016, a bloom of *Gambierdiscus caribaeus* was documented from El Hierro Island, Canary Islands, suggesting that CFP in the region may result from locally sourced toxic fish and not from long distance fish migration (Soler-Onís et al., 2016). Until 2016, most work on *Gambierdiscus* in the Canaries has resulted mainly from opportunistic samples and short sampling expeditions (Rodríguez et al., 2017), from which cells have been isolated and cultured under laboratory conditions for further taxonomic and toxicological studies (Fraga et al., 2004; Fraga et al., 2011; Fraga and Rodríguez, 2014). In other archipelagos within this region, for instance Madeira and Cape Verde Islands, the presence of *Gambierdiscus* spp. has been also documented (Kaufmann and Böhm-Beck, 2013; Soler-Onís pers. comm.), but very little is known on species diversity and distribution.

Regarding the genus *Ostreopsis*, another potentially toxic benthic dinoflagellate present in this region that has been observed forming dense blooms at different locations (Soler-Onís and co-workers, work in progress), much less is known. There are only a few reports of its presence (Fraga et al., 2005; Penna et al., 2010; Kaufmann and Böhm-Beck, 2013), while the abundance, diversity and distribution still remain totally unknown. These events raise serious public health concerns and argue for efficient standardized monitoring programs.

Aiming for a precise quantification of these potentially harmful species in the Macaronesian region, the main objective of this study was to assess the applicability of the 'artificial sampling' method, developed by Tester et al., 2014. To achieve this, several experiments were designed in the Canary Islands and Cape Verde to (1) to determine the optimal number of replicates, (2) to determine the ideal incubation time of artificial substrates, (3) to compare the efficiency of both methods to make accurate cell estimations and (4) to investigate the relation between BHAB abundances on macroalgae and artificial substrates. The implications of this study are relevant in terms of both research and monitoring purposes within the study region and add supporting evidence for the artificial substrate method, as a standard method for sampling benthic harmful dinoflagellates worldwide.

2. Material and Methods

2.1. Study area

This study was conducted from March 2017 to August 2018 at two archipelagos of the Macaronesian region: The Canary Islands and Cape Verde. Samples were collected at 7 sites from The Canary Islands and two Sites from Cape Verde (Table 1; Fig. 1) by snorkeling and SCUBA diving. At all sites, Pendant[®] Temperature and HOBO Pendant[®] G HOBO data loggers (Onset[®]) were set up to describe patterns of seawater temperature ($^{\circ}\text{C}$) and water acceleration (m s^{-2}) as a proxy to water motion. Sampling sites encompassed a variety of intertidal and subtidal coastal habitats, including sandy bottoms, macroalgal beds or rocky bottoms (Table 1). Samples were collected between 0.5 to 7 m depth. Water temperature and water motion ranged between 18 to 26 $^{\circ}\text{C}$, and 4.62 to 41.51 m s^{-2} , respectively.

2.2. Artificial substrate development

To develop a BHABs sampling strategy in the Macaronesian region, an artificial substrate device was recreated (Fig. 2A), based on the prototype developed by Tester et al. (2014). In the model used in the present study, the screen (a rectangle of 10.2 cm \times 15.2 cm, area of 170 cm^2 ; mesh size of 1.6 mm) was directly attached to a fishing line using two mooring points by the use of a rigid plastic frame stuck to the screen (10.2 cm \times 15.2 cm; 0.4 cm wide). The screen was then suspended in the water column, at a distance of approximately 15 cm from the sea bottom; a 15 ml centrifuge plastic tube was used as a float (Fig. 2A). The individual fiberglass screens were then attached to a plastic bar of 210 cm long, using plastic flanges through the bar, separated from each other by a distance of 30 cm (Fig. 2B). In order to allow the device to move freely, fishing swivels were used to attach the monofilament fishing line to the float and to the plastic flange. The whole structure was fixed to the sea bottom using two stones tied to the extremes of the bar (Fig. 2B). The sampling structure was deployed randomly at each sampling site. At the end of the experiment, each fiberglass screen was collected with minimum manipulation and placed in plastic zip bags (1 L) with surrounding water. To position the screen correctly, the float was held with one hand to keep the device erect. Once the screen was introduced into the bag, the monofilament was cut using scissors and the bag closed.

2.3. Colonization time of artificial substrates

In order to estimate the time required for benthic dinoflagellates to colonize the artificial substrates, groups of fiberglass screens ($n = 3$) were deployed and subsequently retrieved at 3 different time intervals: 24, 48 and 72 h, at Melenara Bay (Site 5). Two-way ANOVA was used to test for significant differences in cell abundances between genera and time of exposure; pairwise tests (Holm-Sidak) resolved pairwise differences between time of exposure for each genus, as a result of a significant interaction between "Time" and "Genus". The homogeneity of

Table 1
Sampling sites, showing habitat description, depth range (m), mean water temperature (°C) and mean, maximum, minimum and standard deviation of water motion ($m s^{-2}$) during the experiment. (n.r. = Sites where water motion was not recorded). (Archipelago: Canary Islands (C.I.) and Cape Verde (C.V.)).

Site	Island, Archipelago	Coordinates	Habitat	Date	Experiment	Depth (m)	Water temp. (°C)	Water Motion ($m s^{-2}$)			
								\bar{X}	SD	Max	
1, Caletón Blanco	Lanzarote, C.I.	29° 13.1' N, 13° 26.3' W	Mixed macroalgal bed, rocks and sand	July 2018	Sample variability	1.5-2.5	23.96	10.72	0.3	7.73	13.12
2, Salinas del Carmen	Fuerteventura, C.I.	28° 21.9' N, 13° 52.1' W	Mixed macroalgal bed and rocks	March 2018	Sample variability	0.5- 1.5	20.31	10.97	0.372	8.81	13.08
3, Taliarte harbour	Gran Canaria, C.I.	27° 59.4' N, 15° 22.1' W	Sandy bottom	March 2017	Sampling effort	4-5	19.83				
4, Taliarte Bay	Gran Canaria, C.I.	27° 59.3' N, 15° 22.2' W	Mixed macroalgal bed and rocks	February 2017	Sampling effort	3-4	19.54				
				February 2018	Sample variability	3-4	18.82	10.63	0.16	8.86	12.54
				March 2018	Sample variability		20.32	10.90	0.3	8.60	13.12
5, Melanara Bay	Gran Canaria, C.I.	27° 59.3' N, 15° 22.3' W	Mixed macroalgal bed, rocks and sand	July 2018	Colonization time	6-7	19.90	10.85	0.195	10.19	11.5
6, Las Galletas	Tenerife, C.I.	28° 00.3' N, 16° 39.1' W	Mixed macroalgal bed, rocks and sand	April 2018	Sample variability	1-2	19.98	11	1.12	4.62	41.51
7, La Restinga harbour	El Hierro, C.I.	27° 38.3' N, 17° 58.7' W	Mixed macroalgal bed, rocks and sand	November 2017	Sample variability	3-4	23.13	10.85	0.128	10.49	11.17
				November 2017	Sample variability	3-4	20.91	10.95	0.122	10.79	11.17
8, Salamansa Bay	São Vicente, C.V.	16° 54.5' N, 24° 56.2' W	Mixed macroalgal and coral bed, rocks and sand	November 2017	Sample effort	3-4	24.95	n.r.			
				November 2017	Sample variability			n.r.			
9, Baía das Gatas	São Vicente, C.V.	16° 53.9' N, 24° 54.4' W	<i>Dictyota</i> and corals bed, rock and sand	November 2017	Sample variability	0.5-1.5	26.18				

variances was assessed through the Levene's test; in all cases, homogeneity of variances excluded the need to transform the raw data. These analyses were implemented using the R.3.4.3. statistical package.

2.4. Determination of artificial substrate replication

To determine the minimum number of replicates required to adequately estimate the abundances of benthic dinoflagellates, 12 fiberglass screens were attached to plastic tubes arranged in a square (150×150 cm). The squares were deployed at three different habitats: a sandy bottom at Taliarte Harbour (Site 3), a macroalgal-covered rocky habitat at Taliarte Bay (Site 4), and a mixed macroalgal and coral habitat at Salamansa Bay (Site 8). To work out the number of replicates, the (log-transformed) Standard Error (SE) of abundances versus the number of replicates were plotted for each genus (Kingsford and Battershill, 1998). The number of required replicates was determined when the SE of abundances stabilized when adding more replicates. Subsequently, the coefficients of variation (CVs), a measure of sample variation standardized by the sample mean, versus the number of replicates were plotted to ensure the stabilization of the variability obtained with the optimum number of replicates. Complementary to these analyses, a power analysis was carried out by means of the freeware Gpower (<http://www.gpower.hhu.de/>), using dinoflagellate abundance data from a random subset of four sites to obtain a range of 'effect sizes' (f), which varied from $f = 0.7$ to $f = 1.3$. For a standard alpha value of 0.05 and a statistical power of 0.95, we calculated the level of replication, using an F-test family of statistical tests.

2.5. Abundances, sample variability and relationship between methods

To compare abundances on macroalgae and fiberglass screens, an equal number of replicates of each substrate were collected at Caletón Blanco (site 1), Salinas del Carmen (site 2), Taliarte Bay (site 4), Melanara Bay (site 5), Las Galletas (site 6), La Restinga Harbour (site 7), Salamansa Bay (site 8), and Baía das Gatas (site 9). The macrophytes were selected based on previous knowledge on their diversity and occurrence in Macaronesia and known affinity for benthic dinoflagellates. Macrophytes included members of Rhodophyta: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, *Galaxaura rugosa* (Ellis & Solander) Lamouroux and *Jania rubens* (Linnaeus) Lamouroux, as well as Chlorophyta: *Caulerpa sertularioides* (Gmelin) Howe and *Halimeda tuna* (Ellis & Solander) Lamouroux) and Ochrophyta: *Cystoseira humilis* Schousboe ex Kützing, *Golpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès & Solier, *Dictyota* spp., *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau, *Lobophora variegata* (Lamouroux) Womersley ex Oliveira, *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Sargassum filipendula* Agardh and *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne). Around 25 g of the available species were collected using plastic containers (100 ml). Once the container was placed at a short distance from the sample, the macrophyte was carefully removed and placed inside the container with surrounding water. In all cases, each replicate consisted of a single species.

For each sampling method (macroalgae and artificial substrates) the coefficient of variation (CV) was calculated; a higher CV indicates greater level of dispersion around the mean. Because the CV is unitless, comparisons between non-comparable metrics, i.e. abundances on artificial substrates (cells 100 cm^{-2}) and macrophytes (cells g^{-1}), are possible. The R package cvequality test (Version 0.1.3; Marwick and Krishnamoorthy, 2018) tested for significant differences in the CV between both methods at each site. Log-transformed data was plotted for each sampled locality to better compare the variability on the abundances obtained using both methods.

To compare the abundances found for each genus using both methods at each sampling site, the ratio of mean cell abundances on artificial substrates to mean cell abundances on macroalgae was calculated. In addition, linear regression analyses were carried out from log-transformed pooled data from all the sampling sites to assess the

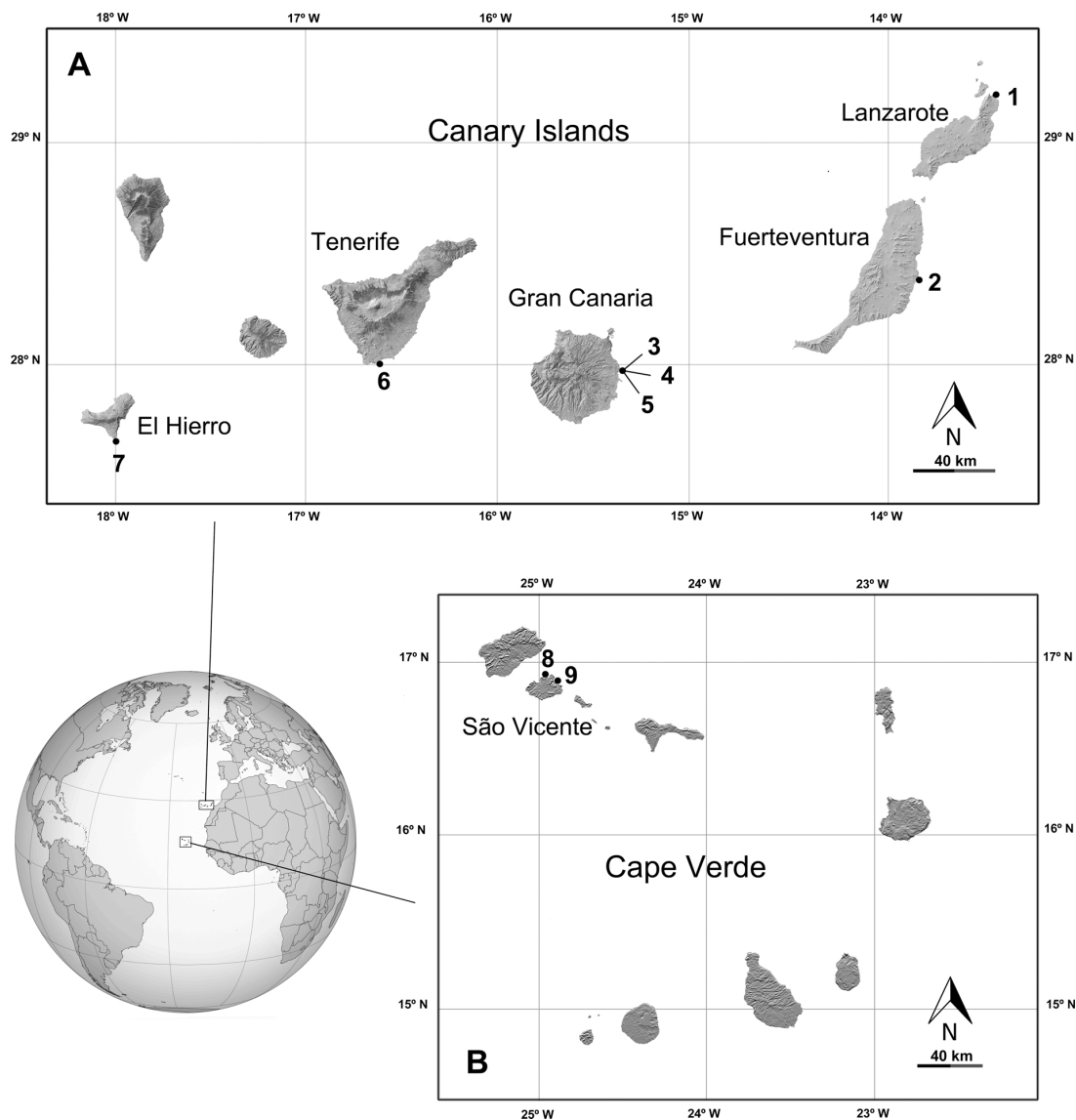


Fig. 1. Maps showing sampling locations in two archipelagos of the Macaronesian region: (A) Canary Islands and (B) Cape Verde.

relationships between mean abundances found on macroalgae and those found on artificial substrates of each genus.

2.6. Sample processing, dinoflagellate species identification and cell counting

Samples collected from either macroalgae or artificial substrates were immediately fixed with 4% formaldehyde in seawater. Dinoflagellates were detached from the substrates by vigorous shaking for 1 min. To separate macroalgae from the seawater containing dinoflagellate cells, samples were filtered using a 150 µm sieve. Macroalgae were dry blotted and immediately weighed to determine their fresh weight (FW). Samples containing detached dinoflagellates were concentrated onto a 20 µm sieve. The original empty containers were re-filled with about 50–100 ml of pre-filtered seawater and shaking and filtering procedures repeated. This procedure was especially intended to recover cells from the plastic bags that contained the screens, as

these bags present many folds that can retain dinoflagellates. All the material collected on the sieve was backwashed into a 100 ml plastic container, which was filled up to 100 ml with filtered seawater. Formaldehyde was added once again to a final concentration of 4% and samples were stored in darkness until the analyses.

Dinoflagellate species identifications, from both artificial and natural samples, were carried out from at least one sample of each method at each location. Preserved cells were examined under scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6380 LV) and/or under light microscopy/fluorescence microscopy (LEICA DM6000 B) equipped with a LEICA DFC495 camera. Cells were stained with fluorescent stain calcofluor for the examination of the plate tabulation.

For the quantification of benthic dinoflagellates, specimens were only identified at the genus level. Counting was carried out in Sedgewick-Rafter chambers (Edler and Elbrächter, 2010), using an inverted light microscope (LEICA DMI3000 B) at 10X, 20X and 40X magnifications. When samples were at low cell concentrations, 10 ml

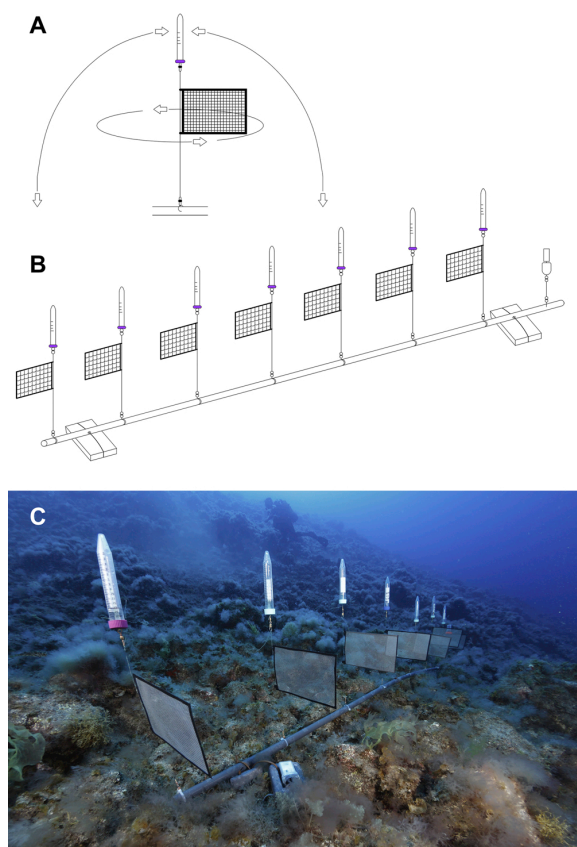


Fig. 2. (A) Modified artificial substrate, based on the Tester et al. (2014) original design. The arrows show all the movements to which the device can be subjected during time of exposure. (B) Artificial substrate units arranged on a 210 cm long plastic bar. Each unit was separated from the adjoining by a distance of 30 cm, which allowed moving freely without intervening in the movement of others. (C) Deployment of artificial substrates at 20 m depth in Los Salto, El Hierro, Canary Islands.

Utermöhl chambers (Edler and Elbrächter, 2010) were used. In some cases, more than one Sedgewick-Rafter chamber was necessary to count a sufficient number of cells. In any case, a maximum of 3 chambers or 400 cells were counted for each sample. For samples with higher cell numbers, counting was carried out on random transects of the Sedgewick-Rafter until reaching ca. 400 cells. Cell abundances were expressed either as cells g^{-1} wet weight of macroalgae or cells 100 cm^{-2} , for samples from macroalgae and artificial substrates, respectively.

3. Results

3.1. Colonization time

During the colonization experiment, the abundance of the different genera showed marked differences. *Ostreopsis* was always the dominant genus with cell abundances several orders of magnitude higher than the other genera (Fig. 3). The second most abundant genus was *Prorocentrum*, followed by *Coolia*. *Gambierdiscus* always showed the lowest cell densities. The abundances of benthic dinoflagellates significantly varied through time after deployment of artificial substrates ("Time" and "Genus x Time", $p < 0.001$, Table 3). *Ostreopsis* and *Gambierdiscus* showed maximum cell abundances at 24 h, while *Prorocentrum* and *Coolia* abundances were higher at 48 h. Still, pairwise tests indicated that abundances of the different genera did not significantly differ

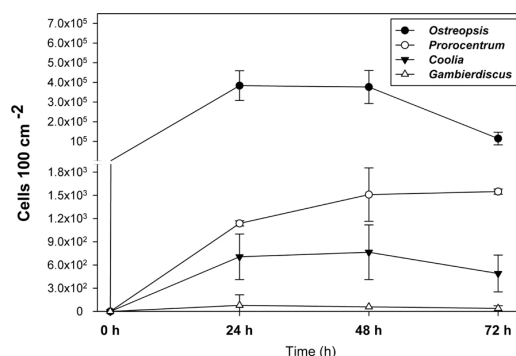


Fig. 3. Colonization of artificial substrates by *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia* after 24, 48 and 72 h at Melenara Bay (site 5, Gran Canaria, Canary Islands) in July 2018 ($n = 3$). Error bars are SE of means.

between 24 and 48 h. After 48 h, *Ostreopsis*, *Coolia* and *Gambierdiscus* decreased, while *Prorocentrum* abundances continued to increase slowly (Fig. 3). Significant differences between 48 and 72 h were only found for *Ostreopsis* abundances (Table 3).

3.2. Determination of required replication

Ostreopsis and *Prorocentrum* were present at all sites (Fig. 4), while *Coolia* was only present at one site (Fig. 4G). The number of required replicates to sample *Gambierdiscus* could not be assessed, as this genus was absent from all sites. In all the cases, *Ostreopsis* was the most abundant genus. For all genera, the number of replicated fiberglass screens (n) needed to adequately estimate the abundances of benthic dinoflagellates was less than 9 (Fig. 4). For *Ostreopsis*, the minimum level of replication varied between $n = 5$ (Fig. 4A) and $n = 7$ replicates (Fig. 4C and E). The variability of *Coolia* abundances stabilized at $n = 8$ replicates (Fig. 4G). A larger number of replicates, between 7 and 9, were needed to adequately sample *Prorocentrum* abundances (Fig. 4B, D and F). The analysis of the CVs also suggested the stabilization of the variability using the number of replicates previously indicated (see appendix, Fig. S1).

The power analysis showed that for an 'effect size' of $f = 1.3$, four replicated screens ($n = 4$) are enough to reach a statistical power of 0.95. For a $f = 1.0$, the level of replication would increase to $n = 6$, while for a $f = 0.7$, the level of replication would have to be increased to $n = 10$.

3.3. Abundances, sample variability and relationship between methods

At most sites, *Ostreopsis* was the dominant genus both on macrophytes and artificial substrates, while *Gambierdiscus* showed the lowest mean cell abundances (Table 2). The species identified within the genus *Ostreopsis* included: *O. fattorussoi* Accoroni, Romagnoli & Totti, *O. cf. ovata* Fukuyo and *O. siamensis* Schmidt in the Canary Islands and *O. lenticularis* Fukuyo and *O. cf. ovata* in Cape Verde. Among the five *Gambierdiscus* species already reported for these archipelagos, four were recorded in this study: *G. australes* Chinain & Faust, *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland & Tester, *G. carolinianus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland & Tester, *G. excentricus* Fraga in the Canary Islands and *G. excentricus* in Cape Verde. Among the 13 benthic *Prorocentrum* species identified in these archipelagos, *P. hoffmanianum* Faust, *P. lima* (Ehrenberg) Stein, *P. maculosum* Faust and *P. panamense* Grzebyk, Sako & Berland were identified in the Canary Islands and *P. hoffmanianum* and *P. lima* in Cape Verde. Finally, *Coolia* species identified in this study included *C. canariensis* Fraga, *C. malayensis* Leaw, Lim & Usup, *C. monotis* Meunier and *C. tropicalis* Faust in the Canary Islands and *C. monotis* in Cape Verde. The benthic

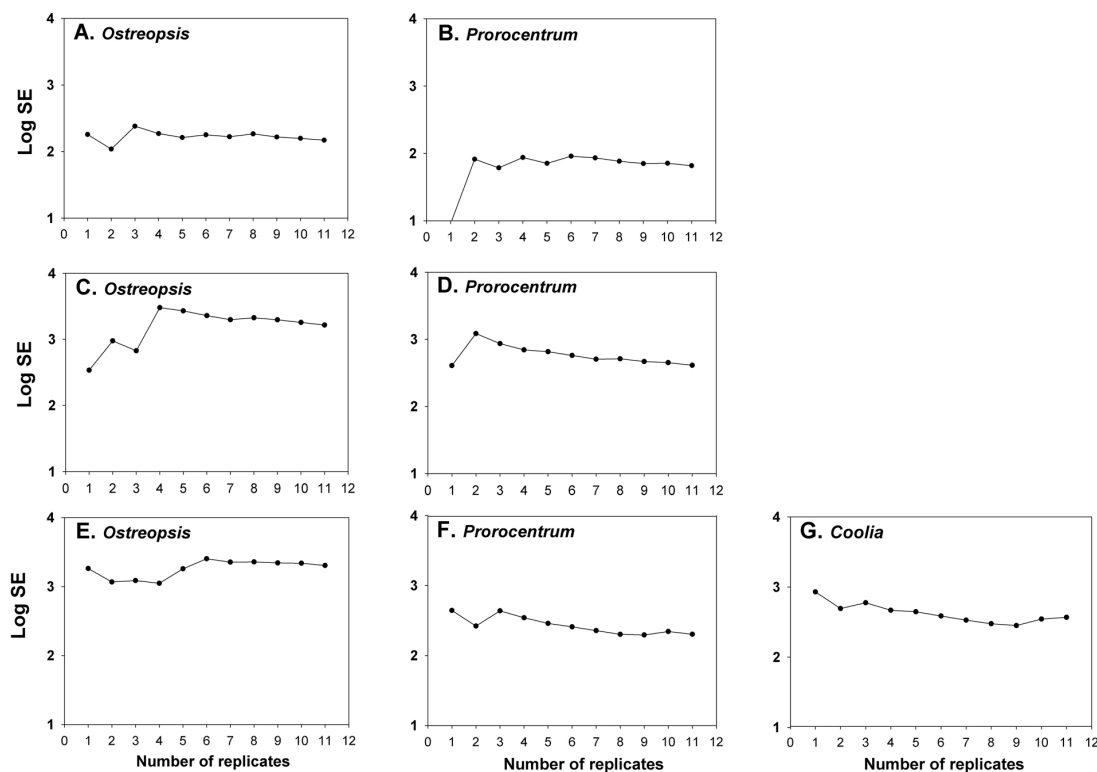


Fig. 4. Changes in Log- transformed SE with increasing replication at three habitats: (A–B) sandy bottom at Taliarte (site 3, Gran Canaria, Canary Islands); (C–D) mixed macroalgal bed at Taliarte Bay (site 4, Gran Canaria, Canary Islands) and (E–G) mixed macroalgal and coral bed at Salamansa Bay (site 8, São Vicente, Cape Verde Archipelago) for *Ostreopsis* (A,C,E), *Prorocentrum* (B, D, F) and *Coolia* (G).

dinoflagellates genera that were present on macroalgae were also detected on artificial substrates in all the experiments after 24 h (Table 2). In general, benthic dinoflagellate abundances found on macrophytes were highly variable compared with the abundances on artificial substrates. Among macroalgal replicates from the same site, minimum and maximum cell abundances differed, in most cases, by 1–2 orders of magnitude, and even 3, while the minimum and maximum cell abundances recorded on artificial substrates were, in general, of the same order of magnitude (Table 2; Fig. 5).

The use of artificial substrates provided more precise cell abundance estimates (i.e. lower CVs) (Fig. 4). In this way, when 7 replicates were used, CVs on artificial substrates ranged between 9–36 % (*Ostreopsis*), 18–128 % (*Gambierdiscus*), 18–74 % (*Prorocentrum*) and 22–87 % (*Coolia*). On the contrary, when macrophytes were used, CVs ranged between 33–214 % (*Ostreopsis*), 79–177 % (*Gambierdiscus*), 21–101 % (*Prorocentrum*) and 38–164 % (*Coolia*) (Table 2, Fig. 5).

The comparison of the CVs obtained for each genus, using the cvequality test, showed significant differences ($p < 0.05$) in CVs between methods in many cases. *Ostreopsis* showed significant differences in the CVs between macroalgal and artificial substrates in 5 out of the 8 sites; *Gambierdiscus* showed significant differences in 3 out of 7 sites; *Coolia* showed significant differences in 3 out of 9 sites, while *Prorocentrum* showed significant differences in 2 out of 10 sites (Table 2).

Mean cell abundances on artificial substrates to mean cell abundances on macroalgae ratios of each genus (\bar{X}_a/\bar{X}_m , Table 2) varied among different sampling sites. Ratio ranges were particularly wide for *Ostreopsis* (1 to 69) and *Coolia* (1 to 25). *Gambierdiscus* showed a slightly narrower ratio range (1 to 17). Finally, *Prorocentrum* ratios were more constant among sampling sites, as they ranged from 1 to 6. In relation to these observations, linear regressions analyses, using pooled data from

all the sampling sites, showed different relationships between cell abundances on artificial substrates and macroalgal substrates (Fig. 5). *Gambierdiscus* showed the strongest relationship between abundances on artificial substrates and macroalgae ($r^2 = 0.853$, $p = 0.003$) (Fig. 6A). *Prorocentrum* similarly presented a strong relationship ($r^2 = 0.807$, $p = 0.001$) (Fig. 6C). On the contrary, *Ostreopsis* presented a weaker relationship ($r^2 = 0.620$, $p = 0.020$) (Fig. 6B) and *Coolia* showed the weakest relationship ($r^2 = 0.440$, $p = 0.051$) (Fig. 6D).

4. Discussion

Collection of macrophytes has been a reference method for the quantification of dinoflagellate abundances, in terms of both research and monitoring (GEOHAB, 2012). However, this method has important limitations to provide reliable cell abundance estimations, e.g. physical and chemical differences among macroalgae affecting substrate preferences by dinoflagellates (Lobel et al., 1988; Bomber and Aikman, 1989; Morton and Faust, 1997; Villareal and Morton, 2002; Cruz-Rivera and Villareal, 2006; Rains and Parsons, 2015; Catania, 2018) and variability in macrophyte communities across spatial and temporal (seasonal) scales (Lobel et al., 1988; Tester et al., 2014). In brief, a lack of standardized substrate has led to inconsistent cell abundance results (Richlen and Lobel, 2011). Thus, in order to test the validity of an alternative method, i.e. the artificial substrate method, to estimate densities of harmful and potentially harmful dinoflagellates, a series of experiments was designed in the Macaronesian region.

4.1. Artificial substrates development

The artificial substrate method used in this study was based on the strategy proposed by Tester et al. (2014). However, several

Table 2

Mean, maximum, minimum, standard deviation and variation coefficient (% CV) in the abundances of *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia* found on macroalgae (cells g⁻¹) and screens (cells 100 cm⁻²). The ratio of artificial substrates to macroalgae abundances \bar{X}_s/\bar{X}_m and the results of the D'AD test for each genus, at each sampling site, are also included (right column). Numbers in brackets indicate sites where experiments were conducted in two different periods: (1) first sampling and (2) second sampling.

Site	Screen (cells 100 cm ⁻²)						Macroalgae (cells g ⁻¹)						\bar{X}_s/\bar{X}_m	CV Equality Test	
	\bar{X}_s	SD	Min	Max	CV(%)	n	\bar{X}_m	SD	Min	Max	CV(%)	n			
Gambierdiscus															
1	252	44	176	294	18	7	46	64	0	177	139	7	5	D'AD = 6.69	p = 0.009
2	59	102	0	176	173	3	13	12	0	21	86	3	4.5	-	-
4 (2)	51	41	0	118	81	7	3	6	0	14	177	7	17	D'AD = 0.77	p = 0.37
5	67	86	0	235	128	7	20	16	7	53	79	7	3	-	-
6	59	0	59	59	0	3	102	51	54	155	49	3	1	D'AD = 7.12	p = 0.007
7 (1)	42,192	9711	28,166	59,706	23	7	17,961	19,523	1539	47,687	109	7	2	D'AD = 5.44	p = 0.019
7 (2)	445	258	235	1000	58	7	413	504	68	1496	122	7	1	D'AD = 1.16	p = 0.28
Ostreopsis															
1	434,216	60,263	384,118	556,471	14	7	6300	9255	450	25,059	147	7	69	D'AD = 7.29	p = 0.006
4 (1)	1088	397	558	1076	36	7	132	199	0	569	150	7	8	D'AD = 3.25	p = 0.07
4 (2)	19,218	1698	17,353	21,824	9	7	380	127	165	554	33	7	51	D'AD = 7.47	p = 0.006
5	434,313	81,925	298,823	549,412	19	7	14,772	8183	2935	23,167	55	7	29	D'AD = 5.39	p = 0.020
7 (1)	235	68	176	353	29	7	215	122	45	387	57	7	1	D'AD = 2.13	p = 0.14
7 (2)	40,175	4208	34,118	46,353	10	7	50,413	36,130	6011	122,818	72	7	1	D'AD = 9.96	p = 0.002
8	27,765	3571	21182	31,882	13	7	4810	10,277	22	29,922	214	7	6	D'AD = 4.72	p = 0.029
9	247,759	70,409	152,941	351,176	28	7	153,082	55,320	84,507	220,079	36	7	2	D'AD = 0.28	p = 0.59
Prorocentrum															
1	1980	591	1000	2647	30	7	312	179	88	532	57	7	6	D'AD = 1.70	p = 0.19
2	823	256	647	1118	31	3	226	149	70	367	65	3	4	D'AD = 0.70	p = 0.40
4 (1)	157	116	59	412	74	7	116	106	0	314	91	7	1	D'AD = 0.12	p = 0.73
4 (2)	344	211	176	765	61	7	121	99	45	328	82	7	3	D'AD = 0.24	p = 0.62
5	1176	297	765	1706	25	7	562	117	424	793	21	7	2	-	-
6	98	68	59	176	69	3	53	2	51	54	4	3	2	-	-
7 (1)	971	608	412	2176	63	7	359	362	45	1144	101	7	3	D'AD = 0.69	p = 0.4
7 (2)	1782	393	1235	2176	22	7	670	515	91	1247	77	7	3	D'AD = 4.95	p = 0.026
8	2681	494	1647	3235	18	7	461	435	41	1381	94	7	6	D'AD = 6.24	p = 0.012
9	1518	557	947	2382	37	7	889	541	319	1616	61	7	2	D'AD = 0.99	p = 0.65
Coolia															
1	2735	624	1882	3412	23	7	110	179	9	502	164	7	25	D'AD = 4.84	p = 0.027
4 (1)	8329	2828	4412	11059	34	7	3126	1262	1860	5513	40	7	3	D'AD = 0.15	p = 0.69
4 (2)	2647	593	1882	3529	22	7	1446	1727	447	5255	119	7	2	D'AD = 5.60	p = 0.017
5	676	183	412	100	27	7	273	104	113	389	38	7	2	D'AD = 0.89	p = 0.34
6	50,653	8408	56,209	40,980	17	3	2803	973	1812	3756	35	3	18	D'AD = 0.88	p = 0.35
7 (1)	402	350	59	882	87	7	171	143	38	444	84	7	2	-	-
7 (2)	487	121	294	647	25	7	555	368	2015	1214	66	7	1	D'AD = 3.51	p = 0.061
8	5126	1133	2824	6765	22	7	357	351	7	922	98	7	14	D'AD = 5.20	p = 0.022
9	289	133	125	471	46	7	312	167	96	534	54	7	1	D'AD = 0.09	p = 0.75

modifications were introduced to improve its operation during exposure and retrieval. An external plastic frame was added to the fiberglass screen, which allowed anchoring the structure to the supporting vertical line through two lateral points (Fig. 2A). This layout minimizes the risk of friction with other nearby structures, including the vertical line of the device, during exposure. It also significantly reduces *in situ* manipulation during retrieval, i.e. the substrate is introduced in the collecting plastic bag with no direct contact with human hands. Similarly, Jauzein et al. (2016) also modified the original design from Tester et al. (2014) using two anchorage points to lessen friction during exposure. However, the retrieval process needs substrate manipulation, as the substrate needs to be cut on one side before being put

into a container, which may cause detachment of cells.

In this study, the mooring of artificial substrates to the seabed was also modified. The mooring system was designed such that several replicate fiberglass screens could be deployed simultaneously on the bottom, while keeping replicates apart from each other (Fig. 2B). This allowed reducing the time necessary to both deploy and retrieve the replicated artificial substrates, particularly under adverse conditions (strong currents, waves, etc.). Jauzein et al. (2016) also included several replicated artificial substrates in their study, but these were attached to the same frame, making difficult the retrieval of one replicate without affecting adjacent replicates.

Table 3

Two-way ANOVA testing for significant differences in dinoflagellates abundances through colonization times. Pairwise tests denote significant differences between times for each genus.

Source of Variation	DF	MS	F	P	Holm - Sidak test
Genus	3	190272573977.957	165.32	< 0.001	<i>Gambierdiscus</i> 24 h = 48 h = 72 h
Time	2	17636053152.634	15.323	< 0.001	<i>Ostreopsis</i> 24 h = 48 h = 72 h
Time x Genus	6	17628860021.786	15.317	< 0.001	<i>Prorocentrum</i> 24 h = 48 h = 72 h
Residual	24	1150937524.029			<i>Coolia</i> 24 h = 48 h = 72 h
Total	35	21128156827.045			

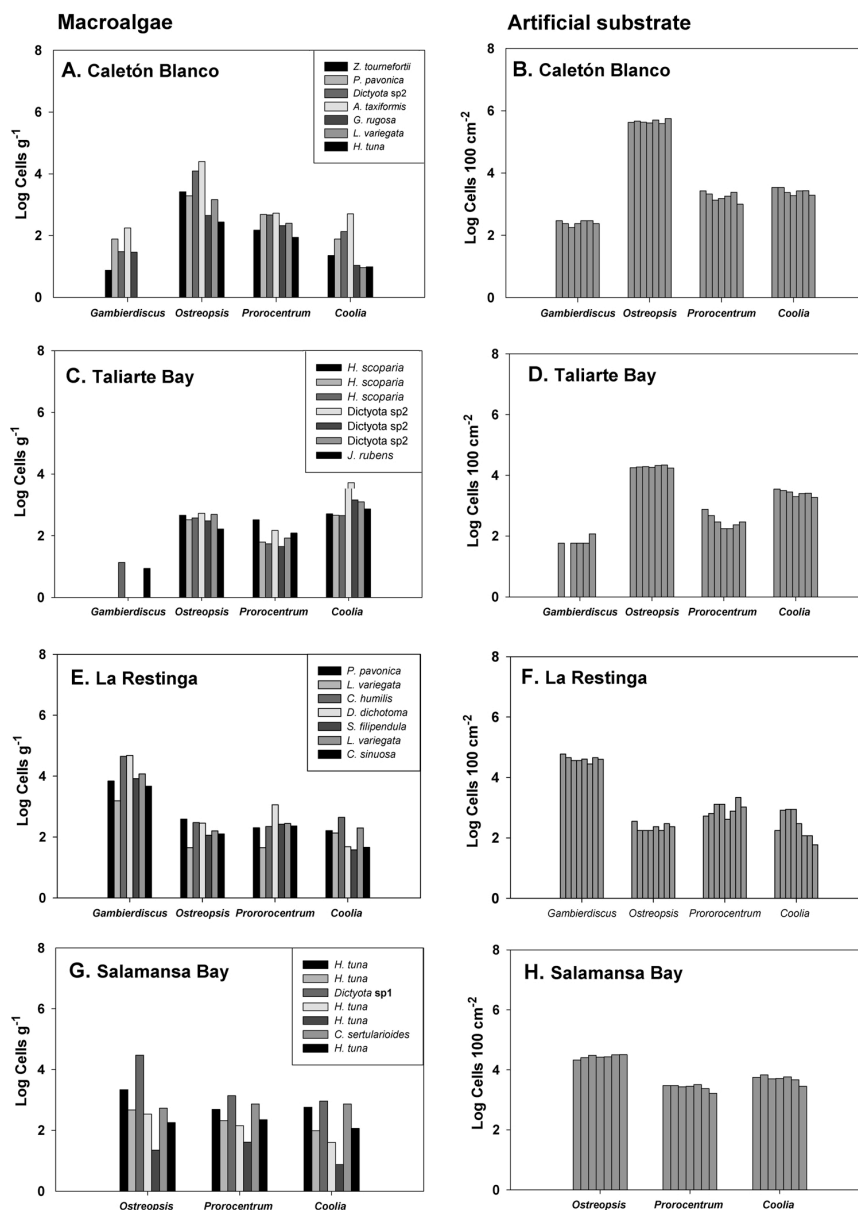


Fig. 5. Log-transformed abundances of *Gambierdiscus* (A–B, C–D, E–F), *Ostreopsis* (A–B, C–D, E–F, G–H), *Prorocentrum* (A–B, C–D, E–F, G–H) and *Coolia* (A–B, C–D, E–F, G–H) on macroalgae (cells g⁻¹) (A, C, E and G) and artificial substrates (cells 100 cm⁻²) (B, D, E and F) at (A–B) Caletón Blanco (site 1), Lanzarote, Canary Islands; (C–D) Taliarte Bay (site 4), Gran Canaria, Canary Islands; (E–F) La Restinga Harbour (site 7), El Hierro, Canary Islands and (G–H) Salamansa Bay (site 8), São Vicente, Cape Verde (n = 7).

4.2. Colonization time and required replication

Deployment time of artificial substrates must be enough to allow colonization by dinoflagellates, so cell concentrations are representative of what is found on natural habitats (Kibler et al., 2008; Fraga et al., 2012). Short deployment times can underestimate cell abundances, whereas large deployment times can unnecessarily increase sampling time. Our results demonstrated that there is no difference in cell abundances between 24 and 48 h for *Ostreopsis*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Coolia* (Table 3). Tester et al. (2014) also demonstrated that cell abundances of *Ostreopsis*, *Gambierdiscus* and *Prorocentrum* did not differ between 24 and 48 h at a Caribbean site, and

Jauzein et al. (2016) did not find differences for *Ostreopsis* cf. *ovata* from the Mediterranean. After 48 h, cell abundances of *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Coolia* remained stable, while concentrations of *Ostreopsis* significantly decreased from 48 to 72 h, so abundances of this genus can be underestimated if colonization times are over 48 h. In summary, as for other regions, 24 h seems to be the ideal deployment time for artificial substrates in the Macaronesian region.

The larger the number of replicates, the lower the variation around the mean, which increases the confidence of inferences (Lobel et al., 1988). For *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia*, our results indicated that a number of replicates between 5 and 9 provides accurate estimations of cell concentrations. Thus, the use of 7 replicates seems a

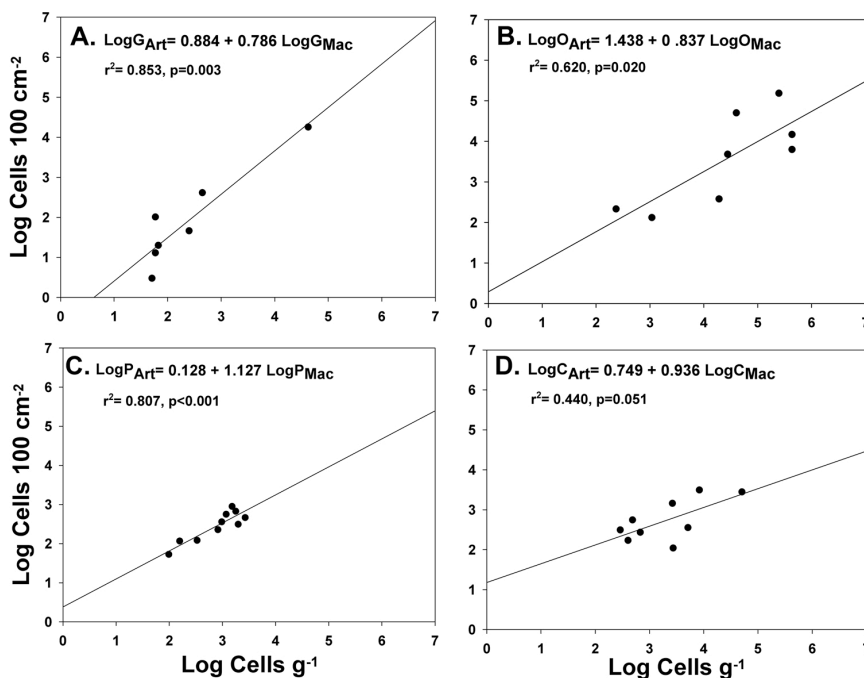


Fig. 6. Relationships between abundances of (A) *Gambierdiscus*, (B) *Ostreopsis*, (C) *Prorocentrum* and (D) *Coolia* on macroalgal (Mac) and artificial substrates (Art) using pooled log-transformed data. Adjusted linear regressions are denoted; the quality of linear adjustments is indicated by means of the r²; p-values tested whether relationships were significant.

good compromise between accuracy and sampling effort in the Macaronesian region.

4.3. Abundances, sample variability and relationship between methods

In all the experiments, the dinoflagellate genera found in natural substrates were the same that colonized the artificial substrates. The artificial substrates, however, had the advantage of providing higher cellular abundances (Table 2), supplying cleaner samples, and so decreasing the subsequent counting effort. This is also an advantage when isolating cells, or using molecular methods such as qPCR. Probably, more epiphytic cells from natural substrates could be detached carrying out a second washing step. However, because this work aimed at assessing differences between replicates and methods, this potential error was always consistent among replicates and should not suppose a relevant source of variability. The most important finding of this study was that estimates of cell abundances of *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Coolia*, in most cases, were less variable (i.e. lower CVs) from artificial substrates than those from macroalgae. In many cases these differences in variability were significant (Table 2), demonstrating that estimations of cell abundances from artificial substrates are more accurate and reliable than those derived from macroalgal hosts. Thus, in this study, variation in cell abundances among replicates, here typified by the CVs, was the "indicator" to consider that both methods were different regarding their precision to obtain accurate estimations of dinoflagellate abundances. These results contrast with those obtained by Tester et al. (2014) for *Ostreopsis*, *Gambierdiscus* and *Prorocentrum*, who did not find differences in variation between methods. The discrepancy may result from the fact that this study sampled more than one macroalgal species at each site, which definitively supposes a source of variability. However, sampling the most frequent and abundant macroalgae species is a commonly strategy in many studies, where the selection of a single species becomes difficult (e.g. Mangialajo et al., 2011; Cohu et Lemée, 2012). On the other hand, this strategy is the best way to evaluate the natural benthic dinoflagellate assemblages, given that different macroalgal species support different benthic dinoflagellates (Lobel et al., 1988; Parsons et al.,

2012; Rains and Parsons, 2015; Yong et al., 2018) and that a single species of macroalgae may not support all benthic HAB dinoflagellates. As a result, selection of a preferred macroalgal species is rather compromised. Furthermore, this discrepancy may also result from the fact that Tester et al. (2014) pooled all samples coming from different sites, while our analysis addressed potential differences from site to site.

The level of correspondence between cell abundances in artificial and natural (macroalgal) substrates varied with the dinoflagellate genus. *Gambierdiscus* and *Prorocentrum* displayed strong linear relationships, while *Ostreopsis* and *Coolia* showed a weaker relation. Tester et al. (2014) found a similar relationship for *Gambierdiscus* (r² = 0.974, p < 0.001) and *Ostreopsis* (r² = 0.709, p < 0.001), but a weaker relationship for *Prorocentrum* (r² = 0.660, p < 0.001). The reason for the observed differences in this study is most likely related to substrate preferences of each genus and colonization strategies. For those genera mostly living on macroalgae as epiphytes, e.g. *Gambierdiscus* (Parsons et al., 2012), colonization of artificial substrates would be from adjacent macroalgae, so a strong relationship between abundances in both natural and artificial substrates is expected. Other genera, however, can inhabit a range of substrates, e.g. rock surfaces or sand. Such is the case of *Ostreopsis* (Parsons et al., 2012; Totti et al., 2010), which is known to live in the water column (tychoplanktonic) (Vila et al., 2001; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Mangialajo et al., 2011). As a result, colonization of artificial substrates may originate from populations occurring in different substrates, leading to a weaker connection between abundances on macroalgae and artificial substrates. As a consequence of the common presence of *Ostreopsis* and *Coolia* cells in the water column, artificial substrates were only deployed during calm to moderate sea conditions to allow the natural colonization by these tychoplanktonic genera. These genera are easily resuspended in the water column during high water motion conditions, being unnaturally recruited by artificial substrates (authors personal observations), which can lead to erroneous estimates of cellular abundances. Differences on how cells arrive to the artificial substrates may also be important. Certain species of *Ostreopsis*, for example, can reach new substrates as "clumps" (Mangialajo et al., 2011), leading to large differences between adjoining substrates. Moreover, the production of

allelopathic compounds by certain macroalgae, in order to deter epiphytes, may result in a genus-specific effect on dinoflagellate cell abundances (Accoroni et al., 2015; Rains and Parsons, 2015) relative to artificial substrates, where cell concentrations would not be selectively affected as a consequence of its inert nature.

In this study, the strong relationships ($r^2 > 0.8$) between abundances found on both substrates for *Gambierdiscus* and *Prorocentrum* allow the use of linear regressions to convert abundances obtained in macroalgae from previous studies into abundances expressed as cells 100 cm^{-2} or vice versa, thus allowing the comparison of results until a uniform methodology is adopted. On the contrary, the weaker relationships between abundances found on both substrates for *Ostreopsis* and *Coolia* prevent the use of linear regressions for this purpose. From a management perspective, however, linear regression models should be used carefully, since important differences of \bar{X}_s/\bar{X}_m ratios were observed among sampling sites, e.g. for *Gambierdiscus* the ratio varied from 1:1 to 1:17 (Table 2). This is particularly important to consider given that some species within these genera are highly toxic and responsible for serious human syndromes, such as Ciguatera Fish Poisoning. In this way, the next step would be to establish cell concentration levels, for alert and risk quantification, directly from the use of artificial substrates. This will contribute to timely and correct management decisions, contributing to guarantee public safety.

5. Conclusions

This study has demonstrated the usefulness of artificial substrates for the study of benthic dinoflagellates in Macaronesia. The artificial substrates are rapidly colonized by benthic dinoflagellates, reaching an equilibrium with the natural habitats after 24 h, using an optimal replication of $n = 7$. The use of standardized sampling units provides more accurate cell abundances than sampling macroalgae specimens, making possible the comparison of results obtained at different spatio-temporal scales and thus allowing for a better risk assessment of potentially toxic BHABs events. The demand for a second field trip to retrieve the screens is largely overcome by the increase in accuracy and the possibility of implementing a standard method for BHABs. In summary, artificial substrates are an ideal strategy and reference method in Macaronesia to study and monitor abundances of BHABs.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This work was funded by MIMAR Project (MAC/4.6d/066) under the Interreg MAC 2014-2020 Programme. We thank Dr. Rogelio Herrera for underwater images (Fig. 2C). Dr. Ana Amorim acknowledges support from FCT through strategic project UID/AMB/50017/2013 and a Sabbatical Grant SFRH/BSAB/127851/2016. We also thank comments from anonymous reviewers, which improved the quality of this manuscript.[CG]

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101634>.

References

- Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierrri, S., Perrone, C., Totti, C., 2015. Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and macroalgae. *Harmful Algae* 49, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.007>.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5,

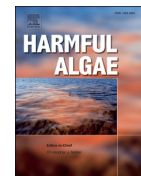
- 717–730. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.005>.
- Berdalet, E., Bravo, I., Evans, J., Fraga, S., Kibler, S., Kudela, R.M., Larsen, J., Litaker, W., Penna, A., Tester, P., Vila, M., 2012. GEOHAB Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark, pp. 64.
- Bomber, J.W., Aikman, K.E., 1989. The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanogr.* 6, 291–311. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749533>.
- Catania, D., 2018. The Influence of Macroalgae on the Proliferation and Regulation of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* Blooms. HAL Id : tel-01682210. Université Côte d'Azur - École Doctorale de Sciences Fondamentales et Appliquées Unité.
- Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epiphytic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 53, 373–380.
- Cruz-Rivera, E., Villareal, T.A., 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae* 5, 497–525. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.09.003>.
- Edler, L., Elbrächter, M., 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microsc. Mol. Methods Quant. Phytoplankt. Anal.* 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.02.009>.
- Faust, M.A., 2009. Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef mangrove ecosystem, Belize. *Atoll Res. Bull.* 1–32. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.569.1>.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excetricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.06.013>.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., Marañón, E., 2012. Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms. *Cryptogam. Algal.* 33, 171–179. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.171>.
- 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. *Ann. Anat.* 165, 839–853. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.09.003>.
- Hallegraeff, G., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol. Rev. Phylogica* 32, 79–99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-2-79.1>.
- Hoppenrath, M., Chomérat, N., Horiguchi, T., Schweikert, M., Nagahama, Y., Murray, S., 2013. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae)-a proposal and review. *Harmful Algae* 27, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.03.006>.
- Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis cf. ovata* using artificial substrates: optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.047>.
- Jauzein, C., Acaf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., abdo-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.089>.
- Kaufmann, M., Böhm-Beck, M., 2013. *Gambierdiscus* and related benthic dinoflagellates from Madeira archipelago (NE Atlantic). *Harmful Algae News* 47, 18–19.
- Lobel, P.S., Anderson, D.M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of ciguatera dinoflagellate populations: sample variability and algal substrate selection. *Biol. Bull.* 175 (1), 94.
- Kingsford, M., Battershill, C., 1998. *Studying Temperate Marine Environments: A Handbook for Ecologists*. Canterbury University Press, Christchurch, New Zealand.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-miralles, F., Masó, M., Reñé, A., María, A., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicol.* 57, 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.11.019>.
- Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemée, R., 2017. Benthic dinoflagellate integrator (BEDI): a new method for the quantification of benthic harmful algal blooms. *Harmful Algae* 64, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.03.002>.
- Mehdipour, N., Gerami, M.H., Nemati, H., Rahnama, R., Hamzehpour, A., 2015. Spatial and temporal variation of macroalgae along the southern coasts of the Caspian sea relating to environmental parameters. *J. Persian Gulf* 6, 65–73.
- Morton, S.L., Faust, M.A., 1997. Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bull. Mar. Sci.* 61, 899–906.
- Nakahara, H., Sakami, T., Chinain, M., Ishida, Y., 1996. The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 44, 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00385.x>.
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N.N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hiram, M., Ishihara, Y., Molgó, J., Botana, L.M., 2010. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Archipelago (Europe). *Anal. Chem.* 82, 6032–6039. <https://doi.org/10.1021/ac100516q>.
- Parsons, M.L., Settemier, C.J., Ballauer, J.M., 2011. An examination of the epiphytic nature of *Gambierdiscus toxicus*, a dinoflagellate involved in ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae* 10, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.011>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.017>.
- Parsons, M.L., Brandt, A.L., Ellsworth, A., Leynse, A.K., Rains, L.K., Anderson, D.M., 2017. Assessing the use of artificial substrates to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys. *Harmful Algae* 68, 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.07.007>.

- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobó, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* schmidt. *J. Biogeogr.* 37, 830–841. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02265.x>.
- Pérez-Arellano, J.L., Luzardo, O.P., Brito, A.P., Hernández-Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R.W., Boada, L.D., 2005. Ciguatera fish poisoning. *Canary Islands. Emerg. Infect. Dis.* 11, 11–12. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050393>.
- Rains, L.K., Parsons, M.L., 2015. *Gambierdiscus* species exhibit different epiphytic behaviors toward a variety of macroalgal hosts. *Harmful Algae* 49, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.005>.
- Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S., 2011. Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI UNESCO y OIEA, pp. 59.
- Richlen, M.L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston atoll, Pacific ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 51–66. <https://doi.org/10.3354/meps08854>.
- Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R.I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae* 67, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.06.009>.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.11.005>.
- Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algae News* 14–16.
- Tester, P.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Usup, G., Vandersea, M.W., Leaw, C.P., Teen, L.P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M.A., Litaker, R.W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.009>.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006>.
- Tuya, F., Haroun, R.J., 2006. Spatial patterns and response to wave exposure of shallow water algal assemblages across the Canary Archipelago: a multi-scaled approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* <https://doi.org/10.2307/24870029>.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 51–60.
- Wakeman, K.C., Yamaguchi, A., Roy, M.C., Jenke-Kodama, H., 2015. Morphology, phylogeny and novel chemical compounds from *Coolia malayensis* (Dinophyceae) from Okinawa, Japan. *Harmful Algae* 44, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.02.009>.
- Yasumoto, T., Adachi, R., Bagnis, R., Fujimoto, K., Fukuyo, Y., Inoue, A., Ochi, T., Oshima, Y., 1980. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 1397–1404. <https://doi.org/10.2331/suisan.46.1397>.
- Yong, H.L., Mustapa, N.I., Lee, L.K., Lim, Z.F., Tan, T.H., Usup, G., Gu, H., Litaker, R.W., Tester, P.A., Lim, P.T., Leaw, C.P., 2018. Habitat complexity affects benthic harmful dinoflagellate assemblages in the fringing reef of Rawa Island, Malaysia. *Harmful Algae* 78, 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.07.009>.



Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hal

Original Article

Playing hide and seek: Distribution with depth of potentially harmful epibenthic dinoflagellates of Southern El Hierro Island, Canary Islands (NE Atlantic)

Juan Fernández-Zabala^{a,b,*}, Ana Amorim^c, Fernando Tuya^d, Rogelio Herrera^e, Emilio Soler-Onís^{a,b}

^a Observatorio Canario de HABs, FCPCT-ULPGC, Parque Científico Tecnológico Marino de Taliarte, 35214 Taliarte, Las Palmas, Canary Islands, Spain

^b Grupo de Ecofisiología Marina (EOMAR), IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira, 35017, Las Palmas, Canary Islands, Spain

^c MARE-Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal

^d Grupo en Biodiversidad y Conservación (BIOCON), IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas, Canary Islands, Spain

^e Servicio de Biodiversidad, Viceconsejería de Medio Ambiente, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente, 35003, Las Palmas, Canary Islands, Spain

ARTICLE INFO

Edited by Editor: Holly Bowers

Keywords:

Vertical distribution
BHAB assemblage
Gambierdiscus
Canary Islands
Artificial substrate

ABSTRACT

The study of epibenthic assemblages of harmful dinoflagellates (BHABs) is commonly conducted in shallow infralittoral zones (0 – 5 m) and are seldom investigated at deeper waters. In this study, the distribution with depth of five BHAB genera (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* and *Amphidinium*) was investigated in the south of El Hierro island (Canary Islands, Spain). Sampling involved the use of a standardized artificial substrate deployed at three depth levels (5, 10 and 20 m) that were visited at three different times throughout one year. The influence of three depth-correlated abiotic parameters, i.e. light, water motion and water temperature, on the vertical and seasonal distribution of the BHAB assemblage was also assessed. Two vertical distribution patterns were observed consistently through time: cell abundances of *Ostreopsis* and *Coolia* decreased from 5 to 20 m while those of *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* showed the reverse pattern, although significant differences were only observed between 5 and 10 - 20 m depth. In April, two members of the latter group, *Gambierdiscus* and *Amphidinium*, were even absent at 5 m depth. The recorded environmental parameters explained a high percentage of the observed distribution. In particular, model selection statistical approaches indicated that water motion was the most significant parameter. An analysis of *Gambierdiscus* at species level revealed the co-occurrence of four species in the study area: *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus* and *G. excentricus*. The species *G. excentricus*, reported here for the first time in El Hierro, showed a more restricted vertical and seasonal distribution than the other species, which may explain not being detected in previous studies in the area. The results obtained in this study highlight the importance of considering a wider depth range and different seasons of the year when investigating the ecology of BHABs and assessing their risk and impacts on human health and the environment. Only then, efficient monitoring programs will be implemented in the Canary Islands and globally in areas affected by these events.

1. Introduction

In the last decades, studies on toxic benthic dinoflagellates (Benthic Harmful Algal Blooms – BHABs) have experienced a notable increase. This has been mainly prompted by the apparent expansion in the distributional range of these organisms from tropical to more temperate

areas and the associated toxic incidents caused by their toxins, that affect human health and the environment (Berdalet et al., 2017; Hallegraeff et al., 2021; Chinain et al., 2021). Unlike their planktonic counterparts, which live freely in the water column, BHABs occur in structurally complex benthic environments, characterized by the presence of diverse substrates to which they are associated (GEOHAB, 2012).

* Corresponding author at: Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Muelle de Taliarte s/n, 35214 Telde, Canarias, Spain.
E-mail address: jfernandez@ulpgc.fpcet.es (J. Fernández-Zabala).

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102271>

Received 16 March 2022; Received in revised form 1 June 2022; Accepted 8 June 2022

Available online 22 June 2022

1568-9883/© 2022 Published by Elsevier B.V.

Therefore, BHABs are commonly sampled by underwater manual collection of their most common hosting substrates, namely particular species of macrophytes (Lobel et al., 1988). Habitats located in shallow infralittoral zones (0 - 5 m) have the advantage of facilitating sampling tasks, since in general different macrophyte species are available, and their selection and collection is simple without the necessity of special equipment. Consequently, most of what is known on the ecology and monitoring of BHABs is based on studies that have been carried out in shallow zones and thus, the relevance of deeper ones has been overlooked. However, depth affects a range of different biotic and abiotic environmental parameters, namely light, water temperature, water motion, nutrients concentration, salinity or macroalgae distribution, which are known to influence the cell abundance and distribution of BHAB dinoflagellates (Parsons et al., 2012; Tester et al., 2020). Typically, in the same area, shallow zones are characterized by high variability and exposure to the action of certain physical stressors, e.g. water motion, while deeper zones usually present calmer, more stable conditions (e.g. Tuya et al., 2007). Due to the existence of species-specific habitat requirements, some species could find more appropriate growth conditions in deeper zones, which would act as climatic refuge areas (Tester et al., 2020). In the last few years, ecological studies in deeper zones (>5 m) have experienced a gradual increase, although they are still scarce. Some of them have investigated the presence of BHABs at depth (e.g. Villareal et al., 2007; Tester et al., 2013), while others have investigated the existence of vertical distribution patterns (e.g. Cohu and Lemée, 2012; Boisnoir et al., 2018). Understanding these patterns may undoubtedly have a great impact on monitoring programs, as it would improve the detection and cell abundance estimation of potentially toxic species. However, the limited number of studies carried out so far, together with some contradictory results obtained between them, has prevented reaching a consensus on the vertical distribution of BHAB (Tester et al., 2020).

Recently, a considerable number of studies on the diversity and

distribution of BHABs have been carried out in the Canary Islands (Fraga et al. 2008, 2011; Fraga and Rodríguez, 2014; Soler-Onís et al., 2016; Rodríguez et al., 2017, 2018; Fernández-Zabala et al., 2019; Bravo et al., 2019, 2020; David et al., 2020; Tudó et al., 2020). Most efforts have been made on the genus *Gambierdiscus* Adachi & Fukuyo due to its already evidenced implication in the ciguatera poisoning (CP) outbreaks documented in the region since 2004 (Pérez-Arellano et al., 2005; Boada et al., 2010; Núñez et al., 2012). The studies have been systematically based on shallow coastal areas and, therefore, the knowledge on the biodiversity, cell abundance and distribution of this genus in the archipelago has been limited exclusively to these zones. However, in the Canary Islands, it is possible to find deep zones close to the coast, especially in the geologically younger islands, in which the insular platform is generally narrow (Tenerife, La Palma and El Hierro). Although less accessible for study than shallow zones, deep zones potentially include suitable habitats for BHAB dinoflagellates, such as *Gambierdiscus* spp., and, for this reason, these should not be disregarded when assessing BHAB diversity and public health risk in the region.

Therefore, in the present study, the vertical distribution and temporal dynamics of BHABs in relation to important depth-correlated physical parameters were investigated in the south of El Hierro, the youngest (ca. 0.9 Ma), most isolated island of the Canary Islands. The conclusions derived from this study contribute to improve the detection and cell estimation of BHAB dinoflagellates for a better assessment of associated risks in the region, while helping to clarify ecological patterns of these organisms across vertical (depth) gradients on a global scale.

2. Material and Methods

2.1. Study site and sampling design

This study was conducted in the southwestern part of El Hierro Island, the westernmost, warmest island of the Canary Islands (Fig. 1A and

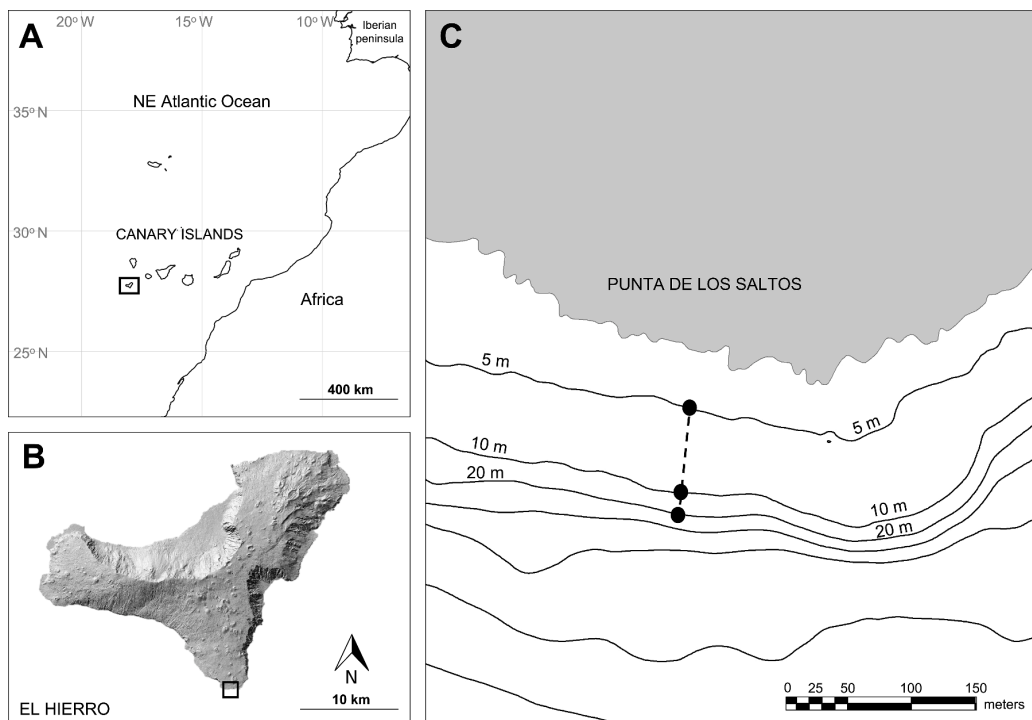


Fig. 1. Location of the study site including: (A) the position of the Canary Islands in the Northeast Mid-Atlantic Ocean, (B) the location of the sampling area “Punta de los Saltos” in the south of El Hierro island and (C) the vertical transect (---) at which three depth levels (•; 5, 10 and 20 m) were established.

B). Sampling took place at Punta de Los Saltos (27°38'15"N, 17°59'18"W), a site located approximately 100 m from the coast within the marine reserve area of "Punta de La Restinga - Mar de Las Calmas" (Fig. 1C). The area is characterized by oligotrophic temperate-warm waters that range between ca. 19 °C in March - April and 26 °C in September - October. The geographical location of this area protects it from the dominant NE trade winds and currents present in the archipelago during most of the year except in winter, when Atlantic squalls approach the islands producing NW swells (Braun et Molina, 1988). The area is also characterized by scarce rains due to the low influence of trade winds on the south of the island in contrast with the northern side, where these have a greater influence and produce horizontal rains. This makes runoff infrequent in southern coastal waters and therefore fresh water influence in the study site was negligible. The bottom is mostly basaltic steep ledges down to about 20 - 25 m depth, from which large black sand flats occur with dispersed rocky outcrops.

Rocky areas are covered by a continuous, diverse and well preserved macroalgae assemblage. The shallow infralittoral section (0 - 10 m) is dominated by *Lobophora schneideri* Vieira (Dictyotales, Dictyotaceae). This species presents an average coverage of ca. 70%, which can sometimes exceed 90%. Other species associated with *L. schneideri* are *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss, *Dictyota* spp., *Canistrocarpus cervicornis* (Kützting) De Paula & De Clerck, *Ellisolandia elongata* (Ellis & Solander) Hind & Saunders, *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan and *Pseudochlorodesmis furcellata* (Zanardini) Børgesen. These species are often patchy (Fig. 2A and B). In the deepest section (10 - 20 m), the algal assemblage is dominated by *L. schneideri*, *Lophocladia trichoclados* Schmitz and *Dasya baillouviana* (S.G. Gmelin) Montagne. This assemblage is common in areas with low wave exposure. Other common species in this section are *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Dictyota* spp., *C. cervicornis*, *Sebdenia canariensis* Soler-Onís, Haroun, Viera-Rodríguez & Prud'homme ex Gabriel & Fredericq or *Sebdenia dichotoma* Berthold (Fig. 2C). The algal assemblage in this area remains stable in terms of abundance and diversity throughout the year (Betancor et al., 2014). The almost homogeneous macroalgal assemblage was one of the criteria used in site selection to reduce the possible confounding effect of different macroalgal species on the tested hypothesis.

Sampling occurred in April, August, and November 2017. These months were selected to include contrasting seasons in the study area. Underwater, the same experimental procedure was always followed. Three depth levels, at 5, 10 and 20 m, were established following a vertical transect (ca. 100 m in length, Fig. 1C) that was visited repeatedly. At each depth level, 8 replicated plastic-framed fiberglass screens (7 for quantitative study and 1 for biodiversity assessment) were employed for sampling BHAB dinoflagellates. Briefly, screens were attached to a plastic bar that was placed parallel to the coast at each specific depth. After 24 h, screens were collected carefully and placed individually in plastic zip bags with surrounding water (see Fernández-Zabala et al., 2019 for further details). At the same time, a sample of macroalgae near the artificial substrates was collected at each sampling as a reference for evaluation of the successful colonization of fiberglass screens by BHAB genera. Samples obtained for the quantitative study were immediately fixed with 4% formaldehyde in seawater, while the 8th replicate obtained for biodiversity assessment was kept live.

In all the cases, HOBO Pendant® Temperature/Light and G data loggers were set up next to the artificial substrates to record, respectively, seawater temperature (°C) and light (lux) every 15 minutes, and water motion ($m s^{-2}$) every minute during 24 h. Temperature/light data loggers were attached to the sea bottom while G data loggers were placed on the top of fishing floats of 50 g weight that were suspended in the water column and attached to the plastic bar by means of a rotatory fishing line (see Fig. 2B from Fernández-Zabala et al., 2019).

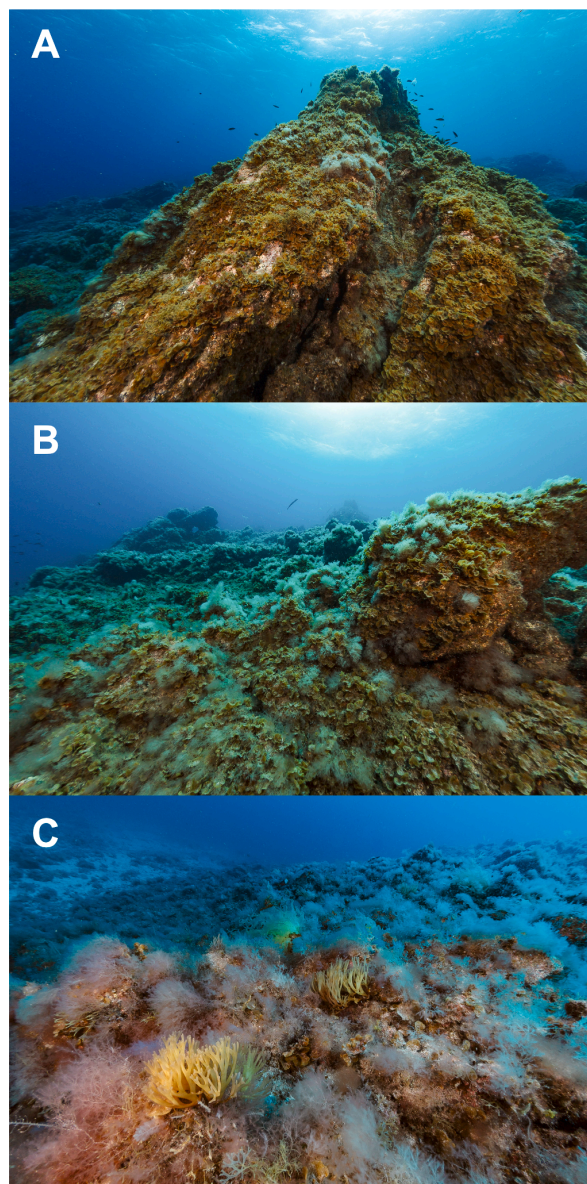


Fig. 2. Macroalgal assemblage at (A) 5 m, (B) 10 m and (C) 20 m depth at the study site.

2.2. Sample processing, dinoflagellate species identification and cell counting

Back to the laboratory, live samples were immediately processed for the establishment of dinoflagellate clonal cultures. Although specimens from all genera were isolated, only data regarding *Gambierdiscus* species will be discussed in the present work. Briefly, cells were isolated under a LEICA DMI3000 B (LEICA, Germany) inverted light microscope, transferred individually into a well of 24-well culture plate filled with f/10 culture medium (coastal filtered seawater-based) and incubated at 24 °C, 10 - 40 $\mu mol photons m^{-2} s^{-1}$ and 8:16 h day/night photoperiod. To avoid any teratological forms, as soon as a sufficient number of cells was reached, cells were harvested for morphological examination.

Cultured cells were examined under a JEOL JSM-6380 LV (JEOL, Japan) scanning electron microscope (SEM). To that end, cells were

preserved with formaldehyde (4%), collected on isopore polycarbonate membrane filters (diameter: 13 mm, pore size: 5 µm, Millipore, Ireland) by gentle filtration, rinsed in distilled water and dehydrated with increasing ethanol concentrations (10, 30, 197 60, 80 and 100%) for 10 min each. The filters were then mounted on a stub (Sigma-Aldrich, Germany), dried overnight at 50 °C and coated with gold-palladium using a Sputtering Polarion E5000 (Polaron PLC, UK).

For further investigations of *Gambierdiscus* species diversity, molecular analyses were also conducted from clonal cultures. Cells were harvested by centrifugation (13000 rpm) using a MiniSpin® centrifuge (Eppendorf, USA). Genomic DNA was extracted using a NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's instructions. The D1 - D3 regions (LSU rDNA) were then amplified in a BioRad® T100 thermocycler (BioRad, France) using a PCR Mastermix (Takara Bio, Shiga, Japan) and the primers D1R - LSUB (Scholin et al., 1994; Litaker et al., 2003) for a final reaction volume of 25 µl. The PCR protocol consisted in 40 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 1 min; and a final elongation step of 72 °C for 10 s. The PCR products were purified with a QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Germany). Purified products were sent for sequencing (Macrogen, Madrid, Spain). The final sequences were edited using MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

Samples collected for quantitative study were processed as described in Fernández-Zabala et al. (2019). Cell counting was carried out at the genus level under the inverted light microscope at 20X magnification using Sedgewick-Rafter chambers (Edler and Elbrächter, 2010). In most cases, more than one Sedgewick-Rafter chamber was necessary to count a sufficient number of cells per replicate. For each replicate, at least 400 cells (1-2 chambers) of the dominant genus (always *Ostreopsis*) and ca. 100 cells of the remaining genera, in up to 3 chambers, were counted. When cells were at very low concentrations, 10 ml Utermöhl chambers were used (Edler and Elbrächter, 2010). Final cell abundances were expressed as cells 100 cm⁻² of fiberglass screen.

Once total BHAB dinoflagellate cell abundances were quantified, the sets of 7 replicates were used to estimate the relative cell abundances of *Gambierdiscus* species at each depth and sampling time. To that end, each replicate was settled and a random aliquot of the concentrated material was placed on a slide. The first 2 - 3 cells of *Gambierdiscus* in each aliquot were isolated under the inverted light microscope. This process was carried out at least once from each replicate until 20 cells were reached for each depth. This number was conditioned by the low *Gambierdiscus* cell abundances present in the samples. Cells were then stained using calcofluor-white and studied under a LEICA DM6000 B light microscope (LEICA, Germany) equipped with epifluorescence. *Gambierdiscus* species were identified mainly based on the differences between plate suture ratios defined by Bravo et al. (2019): i) R1 or ratio between the 2/1' and 2/3' (indicator of plate 2 morphology), ii) R2 or ratio between 2/4' and 2/3' (indicator of Po eccentricity) and the measures of the cell depth (dorso-ventral diameter) and width (transverse diameter). In addition, other morphological features as the cell surface pattern were employed. The plate numbers used in this study followed the modified Kofoidian tabulation system proposed by Besada et al., 1982. The relative abundance of each species in the 20 cells sub-sample was used to estimate the abundance of each species, in terms of cells 100 cm⁻², for each depth and sampling time.

For biodiversity assessment of BHAB genera other than *Gambierdiscus*, the remaining field material was prepared for SEM following the procedures described above.

2.3. Data Analysis

2.3.1. Variation of BHAB dinoflagellate abundance and distribution with depth through sampling times

Differences in the abundances of dinoflagellates throughout depth and time were analysed using GLMMs (Generalized Linear Mixed Models) with depth (3 levels: 5, 10 and 20 m) as a fixed factor, and times

(3 levels) as a random factor. A negative binomial distribution of errors, with an 'identity' link function, was selected to reach the assumptions of linearity and normality of errors, which were checked by a visual inspection of residuals and Q-Q plots. All GLMMs were performed using the 'lm4' library (Kuznetsova et al., 2017), which were implemented in the R statistical software (R Core Team, 2016).

2.3.2. Effect of depth-related environmental parameters on BHAB dinoflagellates

To visualize multivariate similarities in dinoflagellate assemblage structure across the range of environmental conditions, a Redundancy Analysis (RDA), implemented through the 'vegan' R package (Oksanen et al. 2019), was carried out as a constrained ordination technique on log (x + 1) transformed data. A bi-plot was then constructed, and further customized via the 'ggord' R package (Beck, 2017), displaying each BHAB dinoflagellate genus and depth-related parameters (light, water temperature and water motion), as vectors of varying length and direction. The significance of these multivariate configurations was tested by the 'anova.cca' function, which also assessed the significance of each axis (component) to explain a significant amount of variation of the multivariate dataset. Collinearity among physical parameters was detected using VIFs (Variable Inflation Factors). VIFs were always < 5, indicating low collinearity among predictor variables for the RDA configuration in the bidimensional space.

To determine which of the three depth-related environmental parameters explained most of the variation in the abundance and distribution of each dinoflagellate genera, a model selection strategy was adopted through the 'MuMin' R library (Bartoń, 2019). Briefly, this package performs a multimodel averaging by incorporating model selection uncertainty. All candidate models were firstly ranked by the Akaike Information Criterion (AIC) corrected for small samples (AICc). Then, the relative importance of each predictor was calculated, as the sum of Akaike weights over all possible models. In all cases, low collinearity among predictors (VIF < 5) was corroborated. All fitted models were linear (i.e. 'Gaussian' error distribution with an 'identity' link function). Visual inspection of model assumptions, via residuals and quantile-quantile (QQ) plots (Harrison et al., 2018), was performed on selected models to validate the lack of departures from linearity.

3. Results

3.1. BHAB genera diversity, abundance and vertical distribution patterns across sampling times

Fifteen species within 5 genera belonging to 3 different orders were identified: *Coolia* Meunier, *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* Schindt (Gonyaulacales), *Prorocentrum* Ehrenberg (Prorocentrales) and *Amphidinium* Claperède & Lachmann (Amphidinales) (Table 1). At all depths and times studied, the same BHAB dinoflagellate genera were present on

Table 1
List of BHAB species identified in this study.

<i>Ostreopsis</i>	<i>O. fattorussoi</i> Accoroni, Romagnoli & Totti, <i>O. cf. ovata</i> Fukuyo, <i>O. siamensis</i> Schmidt
<i>Coolia</i>	<i>C. malayensis</i> Leaw, Lim & Usup <i>C. tropicalis</i> Faust <i>Coolia</i> sp.
<i>Gambierdiscus</i>	<i>G. australes</i> Chinain & Faust <i>G. belizeanus</i> Faust <i>G. caribaeus</i> Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland & Tester <i>G. excentricus</i> Fraga
<i>Prorocentrum</i>	<i>P. hoffmanianum</i> Faust <i>P. lima</i> (Ehrenberg) Stein <i>P. panamense</i> Grzebyk, Sako & Berland <i>P. rhathymum</i> Loeblich III, Sherley & Schmidt
<i>Amphidinium</i>	<i>A. carterae</i> Hulburt

both macroalgae and fiberglass screens indicating that, after 24 h, the colonization process of the artificial substrates by BHAB dinoflagellate genera reflected donor assemblages on adjacent natural substrates.

In most cases, dinoflagellate cell abundance estimates showed coefficients of variation (CV) <50%, which reflects the low sample variability obtained from the use of 7 fiberglass screen replicates (Table S1). Only in those cases where mean cell abundances were low (<90 cells 100 cm⁻²) or cells were absent from one of the replicates, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* showed CVs >50% (Table S1).

The five genera were present at all depths and sampling times except in April at 5 m depth, when neither *Gambierdiscus* nor *Amphidinium* cells were detected. According to the cell concentrations, *Ostreopsis* was the dominant genus at all depths and sampling times, with cell abundances ranging between 1480 ± 332 and 62,069 ± 7300 cells 100 cm⁻². In most cases, these values were 1 – 3 orders of magnitude higher than those recorded for the other genera (Table S1). In all cases, *Ostreopsis*

mean cell abundance decreased with depth (Fig. 3; Table S1), as it was significantly higher at 5 m than at 10 m and at this depth than at 20 m (p < 0.01 in both cases, Table 2). This pattern was consistent over sampling times, although mean cell abundances registered in April were higher than those registered in August and November (Fig. 3). In most cases, *Coolia* was the second most abundant genus of this study at 5 and 10 m depth with cell abundances ranging between 395 ± 151 and 879 ± 286 cells 100 cm⁻². However, at 20 m depth *Prorocentrum* was the second most abundant genus in all the cases with cell abundances that ranged between 307 ± 111 and 1304 ± 217 cells 100 cm⁻², while *Coolia* cell abundances ranged between 255 ± 109 and 549 ± 128 cells 100 cm⁻² (Table S1). Similarly to the pattern observed for *Ostreopsis*, *Coolia* mean cell abundance decreased with depth (Fig. 3), as it was significantly higher at 5 m than at 10 m and at 10 m than at 20 m (p = 0.025 and p < 0.01 respectively, Table 2). However, differently from *Ostreopsis*, mean cell abundances of *Coolia* were higher in August and November

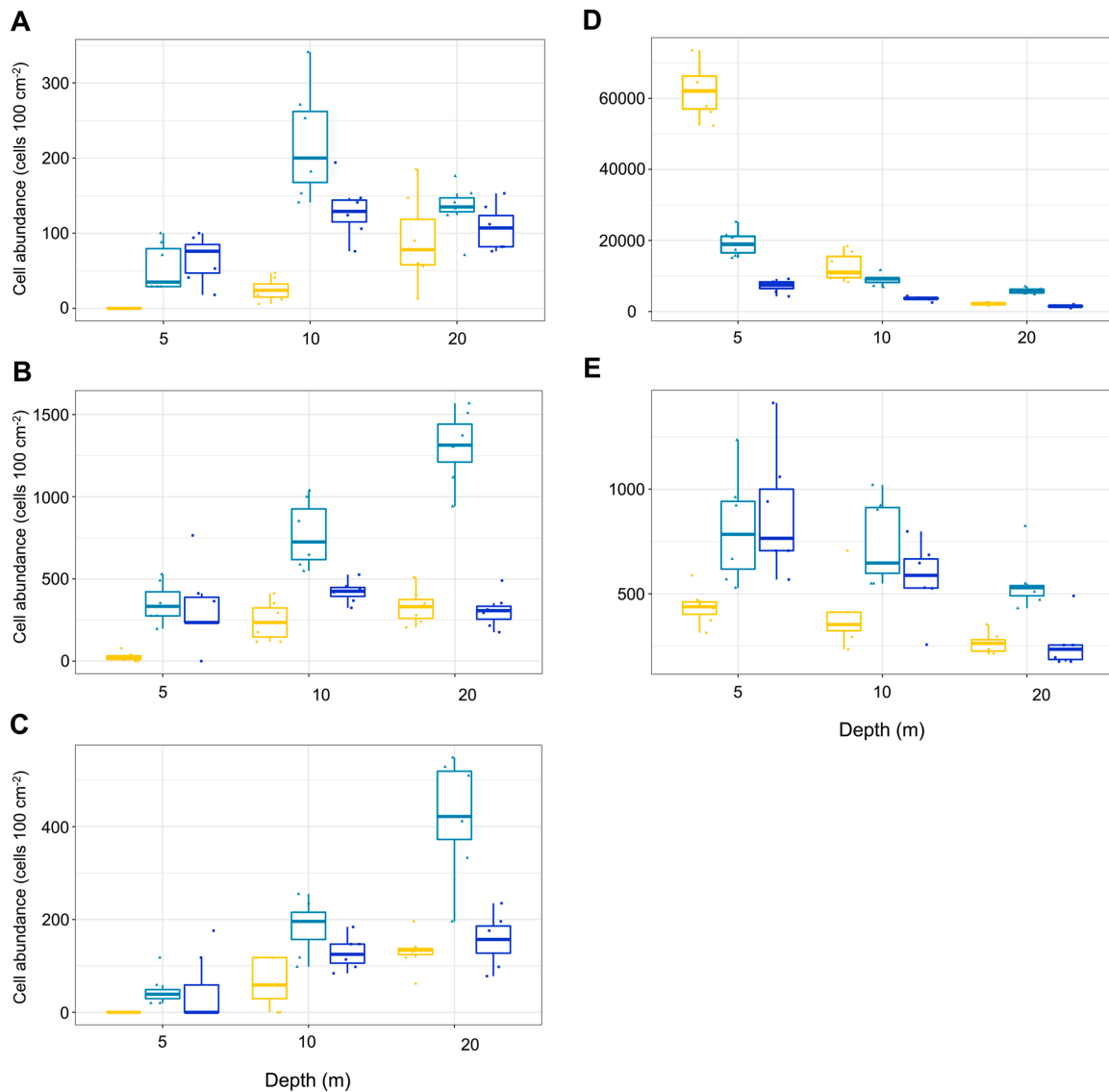


Fig. 3. Box plots of the cell abundances (cells 100 cm⁻²) of the BHAB genera found at 3 depth levels (5, 10 and 20 m) through times: April (yellow/circles), August (green/triangles) and November (blue/squares). Left column plots correspond to those genera which cell abundances increased with depth: (A) *Gambierdiscus*; (B) *Prorocentrum* and (C) *Amphidinium*. Right column plots correspond to those genera which cell abundances decreased with depth: (D) *Ostreopsis* and (E) *Coolia*.

Table 2
Results of GLMs testing for differences in the abundance of BHAB dinoflagellate genera among the three depth levels (5, 10 and 20 m). Significant P-values (P<0.05) are highlighted in bold. For each pair of comparisons reference levels are '10 m' and '5 m' respectively.

Coefficients	<i>Ostreopsis</i>			<i>Coolia</i>			<i>Gambierdiscus</i>			<i>Prorocentrum</i>			<i>Amphidinium</i>		
	Estimate	Z	P	Estimate	Z	P	Estimate	Z	P	Estimate	Z	P	Estimate	Z	P
Intercept	8.91	25.205	<0.01	6.31	37.76	<0.01	4.52	9.52	<0.01	6.07	15.57	<0.01	4.77	10.75	<0.01
20 m	-0.907	-6.76	<0.01	-0.48	-5.029	<0.01	0.35	1.31	0.18	0.24	1.039	0.29	0.603	1.55	0.12
5 m	1.103	8.22	<0.01	0.21	2.23	0.025	-1.307	-5.02	<0.01	-0.905	-3.73	<0.01	-1.73	-4.103	<0.01
Intercept	10.01	28.27	<0.01	6.53	39.04	<0.01	3.21	6.67	<0.01	5.16	13.13	<0.01	3.04	6.55	<0.01
10 m	-1.103	-8.22	<0.01	-0.21	-2.23	0.025	1.307	5.02	<0.01	0.905	3.73	<0.01	1.73	4.103	<0.01
20 m	-2.01	-14.303	<0.01	-0.705	-7.21	<0.01	1.66	5.56	<0.01	1.14	4.62	<0.01	2.33	5.45	<0.01

than in April (Fig. 3).

Gambierdiscus, *Prorocentrum* and *Amphidinium* typically showed lower cell abundances than the other genera, ranging between 0 and 220 ± 72, 26 ± 27 and 1304 ± 217 and 0 and 422 ± 125 cells 100 cm⁻² respectively (Table S1). In contrast with the pattern observed for *Ostreopsis* and *Coolia*, these three genera were found to increase their mean cell abundance with depth (Fig. 3). Mean cell abundances of *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* significantly increased from 5 to 10 and 20 m (p<0.01 in all cases, Table 2). However, no significant differences were found between 10 and 20 m (Table 2). In general, mean cell abundance of these genera were, as observed for *Coolia*, higher in August and November than in April (Fig. 3).

3.2. Influence of environmental parameters on the abundance and distribution of BHAB genera

Light, water motion and water temperature showed a clear depth-related pattern, decreasing as depth increased (Table S2). Water temperature recorded in the study site ranged between 19.5 and 24.9 °C. The maximum water temperature difference recorded in 24 h between 5 and 20 m depth was registered in April (1.8 °C), followed by November (1 °C) and August (0.8 °C). Water temperature average was higher in August (ca. 24 °C), followed by November (ca. 23.3 °C) and April (ca. 20.4 °C). Maximum light was recorded at 5 m depth in August (39,955 lux). At all sampling times, light was attenuated ca. 70% between 5 and 20 m depth.

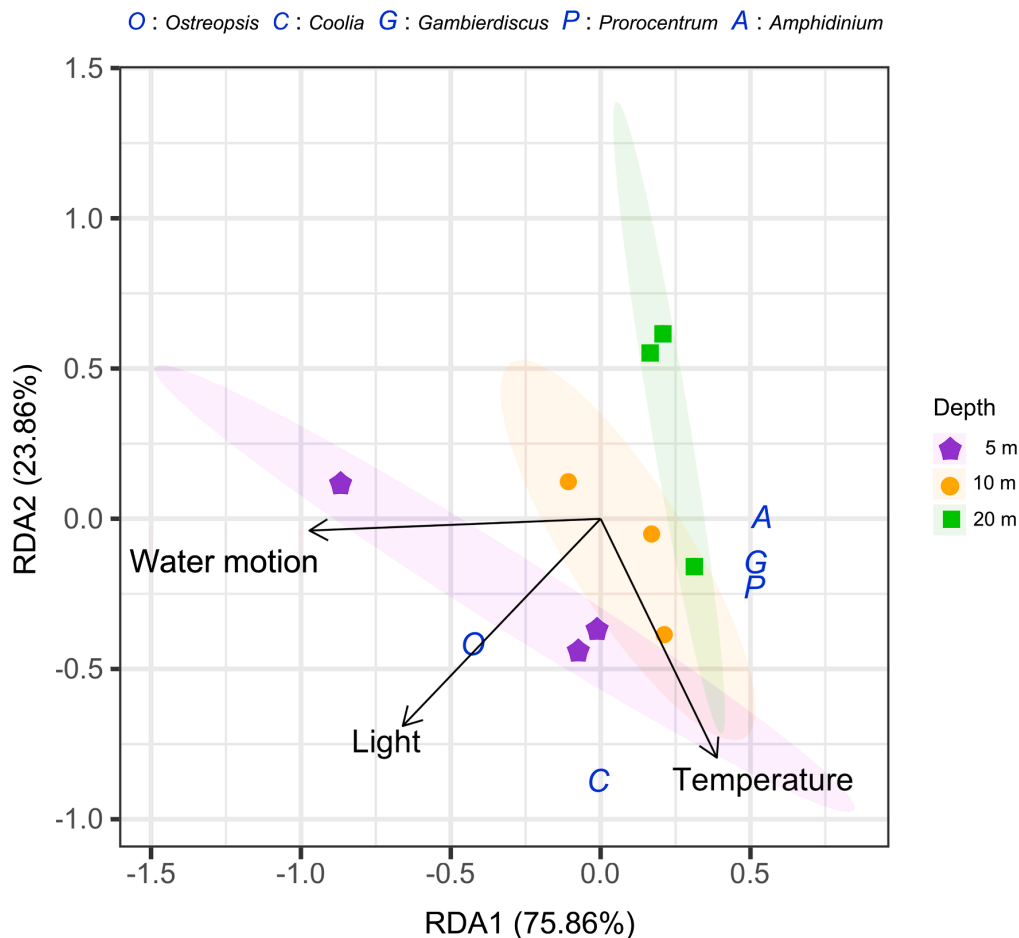


Fig. 4. Redundancy Analysis (RDA) ordination plot denoting relationships between BHAB dinoflagellate genera (*Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*) and environmental parameters (water temperature, water motion and light). Ellipsoids show confidence limits (95%) areas encompassing BHAB assemblages at each depth (5, 10 and 20 m).

Maximum water motion was registered at 5 m depth in April (18.1 m s⁻²). The highest water motion variation between 5 and 20 m depth during 24 h (visualized through the standard deviation (SD) of this parameter) was registered in April (from 0.8 to 0.1 m s⁻²). In contrast, this variation was lower in August and November (from 0.3 to 0.1 m s⁻²) (Table S2).

Environmental parameters explained 84% (adjusted R² = 0.84 from the RDA) in the variance of the abundance and distribution of the BHAB dinoflagellates assemblage. Water motion was the parameter that most contributed to explain the observed variation, followed by light and water temperature (Fig. 4). Considering the different genera, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* were mostly influenced by water motion (Fig. 4; p<0.01 in all the cases, Table 3; Table S3) followed by water temperature (Fig. 4; p<0.05, p=0.01 and p<0.05 respectively, Table 3; Table S3). *Coolia* was mainly influenced by water temperature (Fig. 4; p=0.01, Table 3; Table S3) and light (Fig. 4; p=0.04, Table 3; Table S3). Finally, the distribution of *Ostreopsis* was mostly influenced by light (Fig. 4; p<0.01, Table 3; Table S3) followed by water motion (Fig. 4; p=0.07, Table 3; Table S3). The way environmental parameters influenced the BHAB genera was different. Water motion was negatively correlated with *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, and *Amphidinium* and positively (but p=0.07) correlated with *Ostreopsis*. Light was positively correlated with *Ostreopsis* and *Coolia*. Finally, temperature was positively correlated with *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* (Fig. 4; Table 3).

3.3. Abundance and vertical distribution of *Gambierdiscus* species through sampling times

During the quantitative analysis of *Gambierdiscus* species, a total of 180 cells were identified to species level. In this analysis, three species were identified: *Gambierdiscus australes* Chinain & Faust, *Gambierdiscus caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland & Tester and *Gambierdiscus excentricus* (Fig. 5). In general, relative cell abundances of *Gambierdiscus* species remained similar between depths and sampling times (Fig. 6). Whenever *Gambierdiscus* was detected (not detected at 5 m in April), *G. caribaeus* was the most abundant species, accounting for 60 – 85% of total *Gambierdiscus* cell abundance, which corresponded to 20 – 154 cells 100 cm⁻². *G. australes* was usually the second most abundant species, accounting for 10 – 35%, which corresponded to 2 – 55 cells 100 cm⁻². Finally, *G. excentricus* was the least abundant species, reaching a maximum of 15% of the total abundance, which

corresponded to 0 – 20 cells 100 cm⁻² (Fig. 6).

In April, cell abundances of *G. caribaeus* and *G. australes* increased from 10 to 20 m. In August and November, their cell abundances increased from 5 to 10 m, but decreased from 10 to 20 m (Fig. 6). In contrast to these species, *G. excentricus* showed a more restricted distribution, being always absent at 5 m depth, and absent in November at all depths. In April and August, the cell abundance of this species increased with depth from 10 to 20 m (Fig. 6).

In addition to the three species already mentioned, the qualitative analysis of samples revealed the presence of *Gambierdiscus belizeanus* Faust in the study area (Fig. 5; Table 1).

4. Discussion

4.1. Vertical distribution patterns of BHAB genera and influence of environmental parameters in El Hierro

This study investigated the presence and distribution with depth of BHAB dinoflagellates in the south of El Hierro Island at three different times (April, August, November). Five genera were recorded from 5 to 20 m depth, but the structure of the assemblage changed with depth and sampling time. Results indicated that BHAB genera followed two vertical distribution patterns throughout the studied depth range that were temporally consistent: *Ostreopsis* and *Coolia* always presented the highest cell abundances at the surface and consistently decreased with depth, while *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* always presented the highest cell abundances below 5 m. The consistent record of maximum cell abundances of some BHAB genera at 10 – 20 m demonstrated that, in the south of El Hierro Island, depth zones may offer a set of environmental conditions that result more favorable for particular genera, while hindering others.

4.1.1. Water motion

The results of this study indicated that water motion was the parameter that mostly contributed to explain the BHAB assemblage structure and distribution. This parameter has been commonly disregarded in many field and laboratory studies, in which water temperature has been considered the main, sometimes unique, factor influencing the BHAB dynamics. However, already in early studies on the ecology of benthic dinoflagellates, the hydrodynamic characteristics of the studied systems was considered a key environmental parameter shaping benthic dinoflagellate assemblages (Tindall and Morton, 1998). Water motion may affect BHAB dinoflagellates at different levels. Dinoflagellates are known to be very sensitive to water turbulence at the cellular level possibly related to several mechanisms such as mechanical damage, swimming interference and influence on nutrient availability and cell physiology, among others (Estrada and Berdalet, 1998). At the population and community level, water turbulence caused by waves and currents also influence cell abundances of epibenthic dinoflagellates as these are only loosely attached to their substrates, being readily removed by waves and currents and dispersed into the water column (Tindall and Morton, 1998, Accoroni and Totti, 2016).

In this study, water motion showed a negative significant effect on *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, which explained their maximum cell abundances away from the sea surface, at 10 or 20 m, where water motion values rapidly decreased. The negative influence of water motion on *Gambierdiscus* and *Amphidinium* was most probably responsible for the absence of these two genera at 5 m in April, when maximum water motion values were recorded. Richlen and Lobel (2011) also found that water motion influenced negatively cell abundances of these genera, and reported a similar a distribution pattern with depth at the Johnston Atoll in the Pacific Ocean. Various studies have assessed the effect of water motion on the abundance and distribution of *Gambierdiscus*, while the number of studies on *Prorocentrum* and *Amphidinium* are comparatively much more limited. In agreement to this study, the large majority of the studies document higher cell abundances of

Table 3
Relative importance of environmental parameters influencing BHAB dinoflagellate genera abundance and distribution throughout depths and sampling times from multimodel averaging of GLMs (full method: sum of Akaike Weights over all possible models). Significant variables are highlighted in bold.

Genus	Parameter	Estimate	Adjusted SE	z statistic	p-value
<i>Ostreopsis</i>	Light	0.00004	0.00001	2.97	<0.01
	Water motion	1.4	0.08	1.76	0.07
	Temperature	- 0.02	0.01	0.19	0.85
<i>Coolia</i>	Light	0.000009	0.000005	2.003	0.04
	Water motion	- 0.01	0.47	0.02	0.1
	Temperature	0.09	0.03	2.48	0.01
<i>Gambierdiscus</i>	Light	0.0000003	0.00002	0.02	0.98
	Water motion	- 3.02	0.06	5.38	<0.01
	Temperature	0.13	0.06	2.02	<0.05
<i>Prorocentrum</i>	Light	0.000002	0.00001	0.22	0.82
	Water motion	-1.868	0.3	6.29	<0.01
	Temperature	0.1075	0.03	3.02	0.01
<i>Amphidinium</i>	Light	0.0000003	0.00002	0.1	0.99
	Water motion	- 3.02	0.56	5.39	<0.01
	Temperature	0.13	0.06	2.02	<0.05

Maximum water motion was registered at 5 m depth in April (18.1 m s⁻²). The highest water motion variation between 5 and 20 m depth during 24 h (visualized through the standard deviation (SD) of this parameter) was registered in April (from 0.8 to 0.1 m s⁻²). In contrast, this variation was lower in August and November (from 0.3 to 0.1 m s⁻²) (Table S2).

Environmental parameters explained 84% (adjusted R² = 0.84 from the RDA) in the variance of the abundance and distribution of the BHAB dinoflagellates assemblage. Water motion was the parameter that most contributed to explain the observed variation, followed by light and water temperature (Fig. 4). Considering the different genera, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* were mostly influenced by water motion (Fig. 4; p<0.01 in all the cases, Table 3; Table S3) followed by water temperature (Fig. 4; p<0.05, p=0.01 and p<0.05 respectively, Table 3; Table S3). *Coolia* was mainly influenced by water temperature (Fig. 4; p=0.01, Table 3; Table S3) and light (Fig. 4; p=0.04, Table 3; Table S3). Finally, the distribution of *Ostreopsis* was mostly influenced by light (Fig. 4; p<0.01, Table 3; Table S3) followed by water motion (Fig. 4; p=0.07, Table 3; Table S3). The way environmental parameters influenced the BHAB genera was different. Water motion was negatively correlated with *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, and *Amphidinium* and positively (but p=0.07) correlated with *Ostreopsis*. Light was positively correlated with *Ostreopsis* and *Coolia*. Finally, temperature was positively correlated with *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* (Fig. 4; Table 3).

3.3. Abundance and vertical distribution of *Gambierdiscus* species through sampling times

During the quantitative analysis of *Gambierdiscus* species, a total of 180 cells were identified to species level. In this analysis, three species were identified: *Gambierdiscus australes* Chinnain & Faust, *Gambierdiscus caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland & Tester and *Gambierdiscus excentricus* (Fig. 5). In general, relative cell abundances of *Gambierdiscus* species remained similar between depths and sampling times (Fig. 6). Whenever *Gambierdiscus* was detected (not detected at 5 m in April), *G. caribaeus* was the most abundant species, accounting for 60 – 85% of total *Gambierdiscus* cell abundance, which corresponded to 20 – 154 cells 100 cm⁻². *G. australes* was usually the second most abundant species, accounting for 10 – 35%, which corresponded to 2 – 55 cells 100 cm⁻². Finally, *G. excentricus* was the least abundant species, reaching a maximum of 15% of the total abundance, which

corresponded to 0 – 20 cells 100 cm⁻² (Fig. 6).

In April, cell abundances of *G. caribaeus* and *G. australes* increased from 10 to 20 m. In August and November, their cell abundances increased from 5 to 10 m, but decreased from 10 to 20 m (Fig. 6). In contrast to these species, *G. excentricus* showed a more restricted distribution, being always absent at 5 m depth, and absent in November at all depths. In April and August, the cell abundance of this species increased with depth from 10 to 20 m (Fig. 6).

In addition to the three species already mentioned, the qualitative analysis of samples revealed the presence of *Gambierdiscus belizeanus* Faust in the study area (Fig. 5; Table 1).

4. Discussion

4.1. Vertical distribution patterns of BHAB genera and influence of environmental parameters in El Hierro

This study investigated the presence and distribution with depth of BHAB dinoflagellates in the south of El Hierro Island at three different times (April, August, November). Five genera were recorded from 5 to 20 m depth, but the structure of the assemblage changed with depth and sampling time. Results indicated that BHAB genera followed two vertical distribution patterns throughout the studied depth range that were temporally consistent: *Ostreopsis* and *Coolia* always presented the highest cell abundances at the surface and consistently decreased with depth, while *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* always presented the highest cell abundances below 5 m. The consistent record of maximum cell abundances of some BHAB genera at 10 – 20 m demonstrated that, in the south of El Hierro Island, depth zones may offer a set of environmental conditions that result more favorable for particular genera, while hindering others.

4.1.1. Water motion

The results of this study indicated that water motion was the parameter that mostly contributed to explain the BHAB assemblage structure and distribution. This parameter has been commonly disregarded in many field and laboratory studies, in which water temperature has been considered the main, sometimes unique, factor influencing the BHAB dynamics. However, already in early studies on the ecology of benthic dinoflagellates, the hydrodynamic characteristics of the studied systems was considered a key environmental parameter shaping benthic dinoflagellate assemblages (Tindall and Morton, 1998). Water motion may affect BHAB dinoflagellates at different levels. Dinoflagellates are known to be very sensitive to water turbulence at the cellular level possibly related to several mechanisms such as mechanical damage, swimming interference and influence on nutrient availability and cell physiology, among others (Estrada and Berdalet, 1998). At the population and community level, water turbulence caused by waves and currents also influence cell abundances of epibenthic dinoflagellates as these are only loosely attached to their substrates, being readily removed by waves and currents and dispersed into the water column (Tindall and Morton, 1998, Accoroni and Totti, 2016).

In this study, water motion showed a negative significant effect on *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, which explained their maximum cell abundances away from the sea surface, at 10 or 20 m, where water motion values rapidly decreased. The negative influence of water motion on *Gambierdiscus* and *Amphidinium* was most probably responsible for the absence of these two genera at 5 m in April, when maximum water motion values were recorded. Richlen and Lobel (2011) also found that water motion influenced negatively cell abundances of these genera, and reported a similar a distribution pattern with depth at the Johnston Atoll in the Pacific Ocean. Various studies have assessed the effect of water motion on the abundance and distribution of *Gambierdiscus*, while the number of studies on *Prorocentrum* and *Amphidinium* are comparatively much more limited. In agreement to this study, the large majority of the studies document higher cell abundances of

Table 3
Relative importance of environmental parameters influencing BHAB dinoflagellate genera abundance and distribution throughout depths and sampling times from multimodel averaging of GLMs (full method: sum of Akaike Weights over all possible models). Significant variables are highlighted in bold.

Genus	Parameter	Estimate	Adjusted SE	z statistic	p-value
<i>Ostreopsis</i>	Light	0.00004	0.00001	2.97	<0.01
	Water motion	1.4	0.08	1.76	0.07
	Temperature	- 0.02	0.01	0.19	0.85
<i>Coolia</i>	Light	0.000009	0.000005	2.003	0.04
	Water motion	- 0.01	0.47	0.02	0.1
	Temperature	0.09	0.03	2.48	0.01
<i>Gambierdiscus</i>	Light	0.0000003	0.00002	0.02	0.98
	Water motion	- 3.02	0.06	5.38	<0.01
	Temperature	0.13	0.06	2.02	<0.05
<i>Prorocentrum</i>	Light	0.000002	0.00001	0.22	0.82
	Water motion	-1.868	0.3	6.29	<0.01
	Temperature	0.1075	0.03	3.02	0.01
<i>Amphidinium</i>	Light	0.0000003	0.00002	0.1	0.99
	Water motion	- 3.02	0.56	5.39	<0.01
	Temperature	0.13	0.06	2.02	<0.05

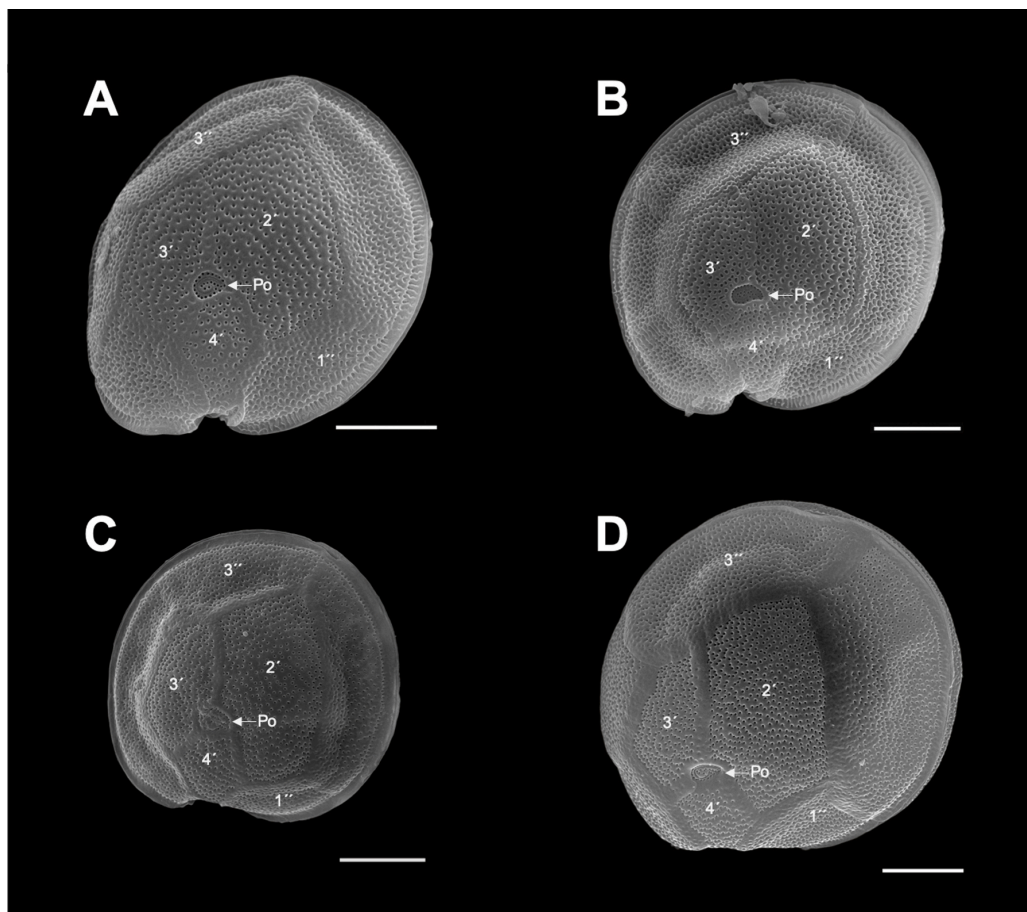


Fig. 5. Scanning electron micrograph images of the epithecas from *Gambierdiscus* species found at the study site: (A) *G. australes*, (B) *G. belizeanus* (C) *G. caribaeus* (D) *G. excentricus*. Scale bar: 20 μm .

Gambierdiscus from sheltered environments, which would correspond to the deeper zones sampled at the present study, than from exposed ones (reviewed in Parsons et al., 2012 and Tester et al., 2020).

In contrast with *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, water motion, at the recorded levels, was found to have a positive influence on the growth of *Ostreopsis*. Such positive influence was not only evident on the vertical gradient, with maximum cell abundances at the shallowest level, but also between sampling times: *Ostreopsis* cell abundances were 3 to 6 times higher at 5 m depth in April, when maximum water motion values were recorded, than in later sampling times. Water motion is one of the environmental factors frequently evoked when discussing dynamics of *Ostreopsis* blooms, but a consensus has not yet been reached. However, many studies have observed that moderate hydrodynamic conditions seem to positively affect *Ostreopsis* growth (Vila et al., 2001, Totti et al., 2010, Selina et al., 2014, Santos et al., 2019), while strong hydrodynamics, often recorded at shallow depths, may prevent growth (Santos et al., 2019) or remove cells from substrates (Mabrouk et al., 2011).

Regarding the influence of water motion on the distribution of *Coolia*, the already referred vertical pattern, characterized by higher cell densities at the surface and marked decline with depth, and the results of the RDA, suggest it is less sensitive to water motion than *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*. However, compared with *Ostreopsis*, *Coolia* appeared to be favoured by lower water motion levels, as evidenced by the higher cell abundances at 5 m depth in August and

November when water motion values significantly decreased. In agreement with the results of this study, Vila et al. (2001) observed in the Mediterranean that *Ostreopsis* and *Coolia* tolerated certain turbulent conditions (“shaken”, “slightly shaken”), but *Ostreopsis* had a higher tolerance.

The measure of water motion to assess its influence on the abundance and distribution of BHAB has been carried out in different ways. Some studies have assessed it visually, establishing categories such as calm, moderate or strong (Vila et al., 2001, Totti et al., 2010). However, the use of subjective measures makes its relation with BHAB imprecise. The use of quantitative methods is more appropriate to establish precise relations. Some studies employed indirect quantitative methods such as “clod-cards” or the wave height (Richlen and Lobel, 2011, Santos et al., 2019) while, in this study, the water motion was directly recorded (m s^{-2}) by means of digital devices (accelerometers). The use of different approaches to estimate the water motion precludes a realistic comparison of results between studies. Therefore, until the incorporation of precise, standard quantitative estimates of water motion in ecological studies, the influence of this parameter on BHAB dynamics will remain uncertain. In any case, results obtained at the present study support previous observations indicating different water motion tolerance levels for the studied BHAB genera: *Ostreopsis* (less susceptible) < *Coolia* < *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* (more susceptible). These distinct levels of susceptibility to water motion seem to be a key ecological trait influencing the vertical distribution of BHAB genera.

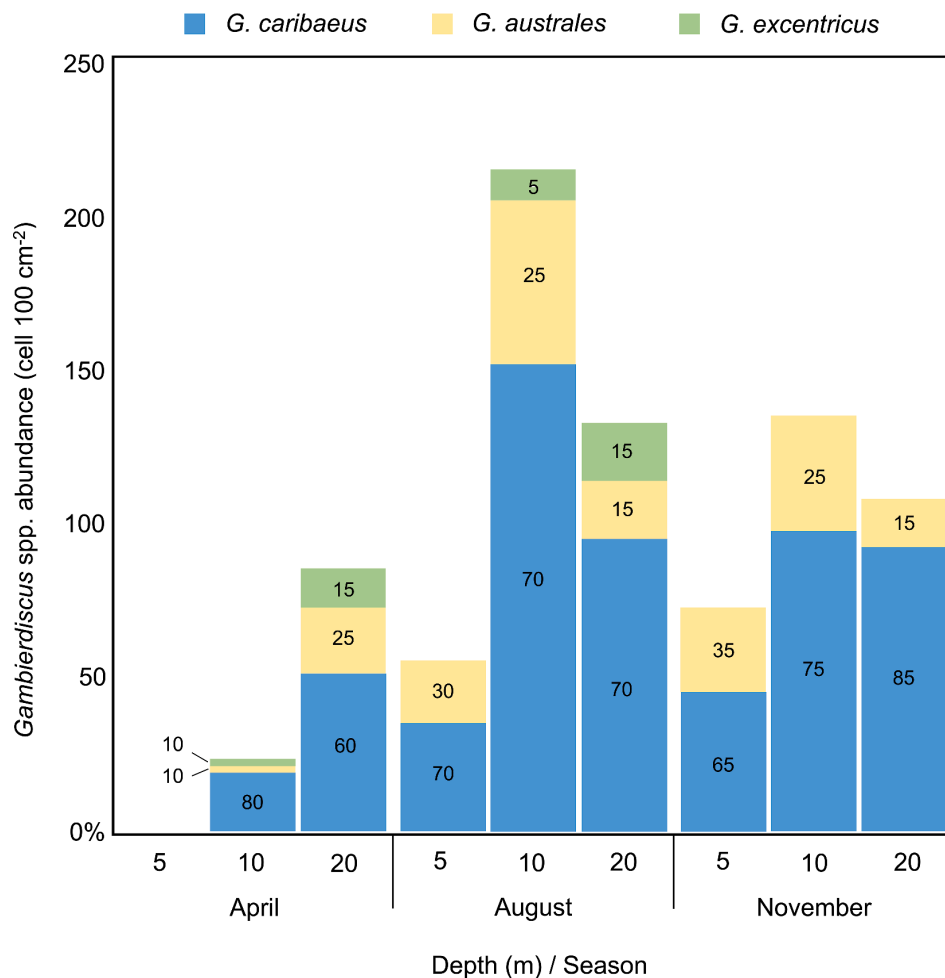


Fig. 6. Total and relative cell abundance of *Gambierdiscus* species throughout depths and sampling times. Relative abundance values (%) are denoted inside bars.

4.1.2. Light

Light was the second parameter that most influenced the BHAB assemblage distribution. As observed for water motion, variations in light occurred mostly between depth levels and, therefore, its influence was more evident on the vertical distribution of BHAB assemblage. However, daylength cannot be discarded as an important light limiting factor of growth between sampling times, particularly for *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, which showed significant reduction in cell abundances in November at 10 and 20 m, when daylength is significantly shorter.

In the vertical gradient, light showed a significant positive influence on the growth of *Ostreopsis* and *Coolia*. This was especially true for *Ostreopsis*, for which light was the most determining parameter. In agreement with this result, most previous studies have found maximum *Ostreopsis* cell abundances at shallow, well-illuminated zones (e.g. Totti et al., 2010 or Richlen and Lobel, 2011), which have led them to suggest a dependence, or a higher tolerance, to high light compared to other genera (Accoroni and Totti, 2016). However, the presence of populations of *Ostreopsis* at 20 m depth with significant cell densities indicates that, even at that depth, the lower light limit was not reached, suggesting their realized light niche is quite wide. Laboratory studies that have investigated the role of light influencing the growth of this genus are limited (reviewed in Tester et al., 2020) but, in agreement with the results of this study, these studies indicate that *Ostreopsis* is

capable of growing at a wide range of light intensities (Monti and Cecchin, 2012).

Likewise, *Coolia* cell abundances were always found to be higher at the shallower level, suggesting similar light requirements to *Ostreopsis*. Both genera are frequently present in the water column (Mangialagio et al., 2011, Jauzein et al., 2018, Santos et al., 2019) and seem less dependent on a substrate than other epibenthic dinoflagellates (tychoplanktonic). The higher tolerance for being exposed to high light intensities could be an adaptative advantage for the tychoplanktonic ecological strategy that characterizes these two genera.

However, under the same light intensities, *Ostreopsis* cell abundances were always higher than those of *Coolia*, as it was also observed in other field studies (Cohu and Lemée, 2012, Fernández-Zabala et al., 2019, Bravo et al., 2020). The reason behind the consistent dominance of the BHAB assemblage by *Ostreopsis* at the surface may reflect a better adaptation of the genus to the surface light conditions. In accordance with this observation, results obtained by Heil et al. (1993) suggested that high light intensities could induce *Ostreopsis* cells to aggregate producing mucus layers to protect themselves, which could represent a competitive strategy against other epibenthic dinoflagellates in shallow areas.

Light did not influence the distribution with depth of the other studied genera significantly but, in any case, the consistent increase in cell abundances below 5 m, with maxima occurring at 10 m depth

(*Gambierdiscus*) and at 20 m (*Prorocentrum* and *Amphidinium*) suggests that these genera are well adapted to low-light conditions and contrast with the high-light adapted genera *Ostreopsis* and *Coolia*. However, *Gambierdiscus* seems to have a different behaviour than *Prorocentrum* and *Amphidinium*. The fact that *Gambierdiscus* had its highest recorded densities at 10 m depth in the warmest sampling time (August), suggests its optimum light window is found close to the light environment found at that depth, and values above or below it, are already towards the upper and lower light tolerance limit, respectively. On the other hand, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, had their highest recorded cell abundances in the warmest sampling time at 20 m depth, suggesting the optimum light window could extend below the light environment recorded at that depth.

Our results indicate that the studied genera have different ecological light preferences that were partly responsible of their vertical distribution. Thus, the five genera may be ordered according to decaying light tolerance: *Ostreopsis* < *Coolia* < *Gambierdiscus* < *Prorocentrum* and *Amphidinium*.

4.1.3. Water temperature

Temperature was the parameter that less influenced the abundance and distribution of the BHAB assemblage. This contrasts with other studies, in which water temperature has been traditionally considered a major influence on the growth of BHAB dinoflagellates. Even so, this study showed that water temperature had a positive significant influence on the growth of *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium*, but it was much more related with time dependent gradients (sampling times) than to vertical gradients. This was evidenced by the consistent record of higher cell abundances at all depths in August the warmest month, and lower cell abundances in April, the coolest month. The distribution with depth observed for *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* cannot be assigned to the influence of water temperature, as the cell abundances of these genera were, in most cases, higher at 10 - 20 m depth where slightly lower temperatures were registered. In the case of *Coolia*, water temperature might in addition have contributed, at least partly, to the observed vertical distribution, as cell abundances always decreased with depth concurrently with recorded subtle water temperature drops.

According to the results of this study, water temperature did not influence the cell abundance and distribution observed for *Ostreopsis*. This fact might have masked the overall influence of this parameter over the BHAB assemblage, as *Ostreopsis* was always the most abundant genus throughout depth and time. However, it is important to highlight that the growth of *Ostreopsis* seemed to be favoured, as observed from its temporal pattern, by a low-water temperature: maximum cell densities were recorded in April, when the lowest mean water temperature of this study was recorded. This contrasts with what has been generally described from more temperate areas, such as the Mediterranean, where proliferations of *Ostreopsis* frequently coincide with relatively higher water temperatures. However, there are also studies conducted in that region which have observed that the highest abundances of this genus are not necessarily associated with the highest water temperatures (Accoroni and Totti, 2016). In this sense, Accoroni et al. (2014) suggested that, although a relatively high temperature threshold is needed for the onset of *Ostreopsis* proliferation (probably in relation to cyst germination), high cell abundance maintenance may occur at lower temperatures. In accordance with these observations, results from laboratory experiments by Scalco et al. (2012) with different strains of *O. cf. ovata* from the Mediterranean, suggested that photosaturation at high temperature and irradiance conditions could be also responsible for the occurrence of blooms outside the warmest period of the year. Results obtained in the present study, and observations in other areas of the archipelago (Fernández-Zabala et al., 2019), document high cell abundances of *Ostreopsis* during most part of the year, with maximum cell abundances not necessarily associated with the highest water temperatures.

Results obtained in the present study indicate that within the warm-temperate regime of El Hierro, the studied BHAB genera show different temperature affinities: *Ostreopsis* (low-water temperature affinity) < *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* (high-water temperature affinity).

4.2. Abundance and vertical distribution of *Gambierdiscus* species through sampling times

In the Canary Islands, the first outbreaks of ciguatera poisoning (CP), a food-borne disease caused by the neurotoxins produced by species of the genus *Gambierdiscus* (Chinain et al., 2021), were registered at the beginning of this century and nowadays represent the major algae-related risk for human health in the region (Pérez-Arellano et al., 2005; Boada et al., 2010; Núñez et al., 2012). Given its implications for human health in the Canary Islands, the genus *Gambierdiscus* was also investigated at species level in the south of El Hierro Island to clarify its ecological patterns across vertical and temporal gradients.

Four out of the six species of *Gambierdiscus* described in the archipelago were identified in the study area, i.e. *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus* and *G. excentricus*. *G. excentricus* and *G. belizeanus* were easily discriminated among the four species based on the eccentricity Po (R2) and the heavily areolate cell surface pattern respectively, which are unique features of these species. In the case of *G. australes* and *G. caribaeus*, plate suture ratios (R1 and R2) were informative enough to discriminate between them. In addition, molecular analysis carried out from the cultures of these species facilitated their later morphological identification.

From these species, *G. belizeanus* was never detected during the quantitative analysis. Therefore, its contribution to the vertical distribution pattern observed for the genus seems negligible.

The distribution of *Gambierdiscus* in the south of El Hierro was characterized by a marked dominance of *G. caribaeus* at all depths and across sampling times (60 – 85% of the total cell abundance) and, therefore, the vertical distribution pattern already described for the genus was mainly reflecting the vertical pattern of this species. This result, together with a high-density bloom of this species reported by Soler-Onís et al. (2016) at a nearby sampling point, suggests that the environmental conditions present in the south of El Hierro favour the dominance of *G. caribaeus* over the rest of *Gambierdiscus* species. The distribution with depth of *G. australes*, the second most abundant species (10 – 35% of the total cell abundance), was similar to *G. caribaeus* in all the sampling times, indicating very similar ecological requirements (Fig. 6). Both species showed a vertical and seasonal distribution suggesting high-water temperature affinity, low-light adaptation and low tolerance to water motion, as previously observed at the genus level. The highest densities of these species were recorded at 10 m depth in the warmer months (August and November), at temperatures within their optimal range as suggested by laboratory experiments (Ramilo et al., 2021), while their lowest densities were recorded at 10 m in the coldest month (April). This distribution also suggests that, when their thermal requirements are fulfilled, they seem to prefer the intermediate light intensities found at 10 m depth. This observation is in accordance with experimental results for *G. caribaeus* from Xu et al. (2016), which showed that, at the temperature yielding its maximum growth rates, this species grew better at the higher irradiance level tested.

G. excentricus was the least abundant species (0 – 15% of the total cell abundance) and showed the most restricted distribution in this study; it was only present at 10 and 20 m in April and August. According to its latitudinal distribution range, *G. excentricus* has been regarded as a cool-water adapted species when compared with other species of this genus (Tester et al., 2020). In agreement with this observation, laboratory experiments by Ramilo et al. (2021) on the temperature influence on the growth of *Gambierdiscus* species from the Canary Islands have shown that *G. excentricus* presents a lower optimal thermal range than *G. caribaeus* and *G. australes* and, therefore, yields its maximum growth

rate (0.08 divisions day⁻¹) at temperatures 2.5 – 3.5 °C less than the other two species (25 °C). These experiments have also demonstrated that the growth rate of *G. excentricus* is the lowest of the three species (0.08 vs 0.18 divisions day⁻¹) at the temperatures yielding their maximum growth rates. These results may explain why *G. excentricus* showed, in all the cases, the lowest cell abundances.

The environmental data recorded in this study did not allow us to explain why *G. excentricus* was not detected in November. However, the most plausible explanation is that the environmental conditions between August and November could have become unfavorable for this species. In this sense, daily maximum sea surface temperatures (SSTs) between August and November (>25 °C, Fig. 7), could have exceeded the upper thermal tolerance limit of *G. excentricus*. This could suggest that the upper thermal tolerance limit of this species in the field is lower than that recorded in laboratory-controlled conditions (29 °C, Ramilo et al., 2021). Very little is still known on the overwintering strategies of *Gambierdiscus* species. A possible explanation for the disappearance of *G. excentricus* might be related to the formation of resting stages under unfavourable environmental conditions (Anderson et al., 2003). However, these stages have so far not been reported from field samples. For the moment, there is only evidence from laboratory observations made in cultures of *G. balechii* (Fraga et al., 2016). In any case, our observations indicate that *Gambierdiscus* species have a different phenology, but further studies are required to better understand the temporal variability of *G. excentricus* in field.

As discussed in section 4.1, water temperature had a positive influence on *Gambierdiscus* at the genus level, and therefore its distribution with depth could not be directly assigned to this parameter. However, due to its cooler-water affinity, the influence of water temperature in the distribution with depth of *G. excentricus* cannot be discarded, as it might have given place to more suitable growth conditions for this species below 5 m depth. Although water temperature differences recorded between depth levels at the present study were slight, these could be enough to favour its growth. Results by Kibler et al. (2012) under experimental conditions, where small differences of only 1 °C of water temperature greatly affected growth potentials of *Gambierdiscus* species, support this hypothesis. The vertical distribution of *G. excentricus* was, in addition, most probably influenced by the already discussed low tolerance of *Gambierdiscus* to high light intensities, which could be even lower for *G. excentricus* than for the other two species, leading to its

disappearance at 5 m in August. Unfortunately, the influence of light on this species has not yet been assessed experimentally.

Prior to this study, *G. excentricus* had been identified in all the islands of the Canary Islands except from El Hierro (Rodríguez et al., 2017; Bravo et al., 2019, 2020; Tudó et al., 2020). Tudó et al. (2020) suggested that the waters of El Hierro, which are the warmest in the archipelago, could be unsuitable for the growth of this species due to its cool-water affinity compared to other *Gambierdiscus* species. However, in those studies sampling was carried out in relatively shallow coastal sites between September and November, when our study has shown a lower probability of finding *G. excentricus*.

Based on our observations, the spatial distribution of *Gambierdiscus* proposed for the Canary Islands could be biased by the time of sampling and the restricted depth ranges considered. Most studies conducted in the region have suggested that the species of this genus are distributed in relation to the SST gradient that exists between warm western and cold eastern islands (Rodríguez et al., 2017; Bravo et al., 2019, 2020; Tudó et al., 2020; Ramilo et al., 2021). Tudó et al. (2020) already noticed the difficulty of explaining the distribution of the genus based exclusively on SSTs, and recognized that the information on the distribution of *Gambierdiscus* spp. could still be incomplete or environmental factors other than the temperature gradient could be influencing it.

While more studies are undeniably needed to fully understand the diversity, abundance and distribution of this genus in the archipelago, the results obtained in the present study showed that the set of different environmental conditions created by depth gradients at a local scale should be considered together with larger-scale processes to avoid “playing hide and seek” with the species of this genus. Results from the present study showed that this is especially relevant in two situations: i) in highly exposed sites and when sampling during high-water motion periods, which can prevent the presence of *Gambierdiscus* spp. at shallow zones (e.g. 0 - 5 m) and ii) in the warm-water western islands such as El Hierro, where cooler-water adapted species, i.e. *G. excentricus*, show restricted distributions. This last consideration is particularly important in the present climate change scenario. As water temperature increases, these species are expected to seek thermal refuge in deeper zones during warmest periods of the year (Tester et al., 2020). If true, in coming years certain species such as *G. excentricus* may disappear from the upper infralittoral zones (0 - 20 m) in El Hierro and start disappearing from shallow zones in other islands, following the west (warm) to east (cold)

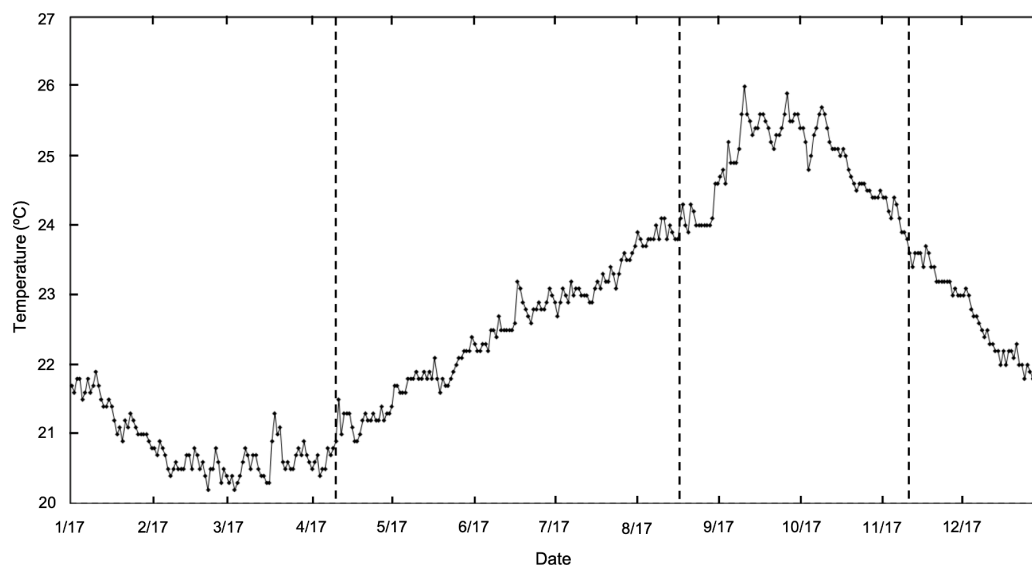


Fig 7. Daily maximum SSTs at the study site covering the year 2017. Dotted lines denote times in which samplings took place: 25 - 26 April, 17 - 18 August and 6 - 7 November. Data provided by the Copernicus Marine Environment Monitoring Service (CMEMS, <http://marine.copernicus.eu/>)

thermal gradient present in the region.

5. Conclusions

This study has demonstrated the existence of two vertical distribution patterns in the BHAB assemblage of southern El Hierro: cell abundances of *Ostreopsis* and *Coolia* decreased from 5 to 20 m depth while cell abundances of *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* showed the reverse pattern, mostly evident from 5 to 10 m. Although these patterns appeared to be consistent through time, further spatio-temporal studies using a reliable, standardized sampling approaches (e.g. artificial substrates) are needed to verify if they stand in the rest of the region, or even other geographical areas. Water motion and light determined vertical and temporal distribution of the BHAB assemblage in a large percentage. Therefore, they are valuable predictors of BHAB vertical patterns in the study region: *Ostreopsis* and *Coolia* are high light adapted genera (shallow genera) and *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* and *Amphidinium* are low water motion adapted genera (depth genera).

An analysis of the vertical and seasonal distribution of *Gambierdiscus* at species level revealed the existence of interspecific differences, highlighting the need for conducting ecological studies at species rather than at genus level. As a consequence, the cell abundance and distribution of *Gambierdiscus* species in the Canary Islands might have been underestimated by considering only limited sampling periods and depth ranges, allowing the species such as *G. excentricus* to "play hide and seek". Therefore, it seems urgent to reevaluate sampling protocols to improve the detection, quantification and risk assessment of this and other BHAB genera in the Canary Islands.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This work was funded by MIMAR Project (MAC/4.6d/066) under the Interreg MAC 2014-2020 Programme. We thank Reservas Marinas de España (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España), Tamia Brito-Izquierdo (TRAGSATEC) and the mariners (GMR Canarias) of Reserva Marina "Punta de la Restinga-Mar de las Calmas" for their technical assistance during sampling. We also thank Mireia Sánchez-Humayor for her assistance in the maintenance of dinoflagellate cultures and Ana Sofia Ramírez-Corbera (IUSA-ULPGC) for her assistance with molecular analysis. Finally, Dr. Ana Amorim acknowledges support from FCT, I.P. through strategic projectUIDB/04292/2020, Sabbatical Grant SFRH/BSAB/127851/2016 and project LISBOA-01-0145-FEDER-031265, co-funded by EU ERDF funds, within the PT2020 Partnership Agreement and Compete 2020,

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.hal.2022.102271.

References

Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierrri, S., Totti, C., 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 34, 7–16.
Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: A review. *Advances in Oceanography and Limnology* 7, 1–15.

Anderson, D.M., Fukuyo, Y., Matsuoka, K., 2003. Cyst methodologies. Manual on harmful marine microalgae, Monographs on oceanographic methodology 11, 165–190.
Bartón, K., 2019. MuMin: multi-model inference. R package version 1.43.6.
Beck, M.W., 2017. ggord: Ordination Plots with ggplot2. R package version 1.0.0.
Boada, L.D., Zumbado, M., Luzardo, O.P., Almeida-González, M., Plakas, S.M., Granade, H.R., Abraham, A., Jester, E.L.E., Dickey, R.W., 2010. Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicol* 56 (8), 1516–1519.
Boisnoir, A., Pascal, P.Y., Cordonnier, S., Lemée, R., 2018. Depth distribution of benthic dinoflagellates in the Caribbean Sea. *Journal of Sea Research* 135, 74–83.
Braun, J., Molina, M., 1988. El mar, el Atlántico en el área de Canarias. In: Afonso, L., Galán, F.M., Rodríguez-Martín, J.A. (Eds.), *Geografía de Canarias. Interinsular Canaria, Santa Cruz de Tenerife*, pp. 18–28.
Bravo, I., Rodríguez, 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.
Bravo, I., Rodríguez, F., Ramilo, I., Afonso-Carrillo, J., 2020. Epibenthic harmful marine dinoflagellates from Fuerteventura (Canary Islands), with special reference to the ciguatera-producing *Gambierdiscus*. *Journal of Marine Science and Engineering* 8 (11), 909.
Chinain, M., Gatti, C.M.I., Darius, H.T., Quod, J.P., Tester, P.A., 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae* 102, 101873.
Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cahiers de Biologie Marine* 53, 373–380.
David, H., Laza-Martínez, A., Rodríguez, F., Fraga, S., Orive, E., 2020. *Coolia guanchica* sp. nov. (Dinophyceae) a new epibenthic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *European Journal of Phycology* 55 (1), 76–88.
Eder, L., Elbrächter, M., 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microsc. Mol. Methods Quant. Phytoplankt. Anal.* 13–20.
Estrada, M., Berdalet, E., 1998. Effects of turbulence on phytoplankton. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series, vol. G 41. Springer-Verlag, Berlin, pp. 601–618.
Fernández-Zabala, J., Tuya, F., Amorim, A., Soler-Onis, E., 2019. Benthic dinoflagellates: Testing the reliability of the artificial substrate method in the Macaronesian region. *Harmful Algae* 87, 101634.
Fraga, S., Penna, A., Bianconi, I., Paz, B., Zapata, M., 2008. *Coolia canariensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new nontoxic epiphytic benthic dinoflagellate from the Canary Islands. *Journal of phycology* 44 (4), 1060–1070.
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.
GEOHAB, 2012. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark.
Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Belin, C., Bottein, M.Y.D., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C.H., Sunesen, I., Pitcher, G.C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P.A., Trainer, V.L., Yñiguez, A. T., Zingone, A., 2021. Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. *Communications Earth & Environment* 2.
Heil, C.A., 1993. Mucus-associated dinoflagellates: large scale culturing and estimation of growth rate. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 501–506.
Harrison, X.A., Donaldson, L., Correa-Cano, M.E., Evans, J., Fisher, D.N., Goodwin, C.E. D., Robinson, B.S., Hodgson, D.J., Inger, R., 2018. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ* 6, e4794.
Jauzein, C., Açaç, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., abboud-Abi Saab, M., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* 91, 116–127.
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.
Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.
Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H., 2017. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *Journal of statistical software* 82, 1–26.
Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J., Tester, P.A., 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays 1. *Journal of phycology* 39 (4), 754–761.
Lobel, P.S., Anderson, D.M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of Ciguatera Dinoflagellate Populations: Sample variability and algal substrate selection. *Biol. Bull.* 175, 94–101.

- Mabrouk, L., Hamza, A., Brahim, M., ben, Bradai, M.N., 2011. Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia. *Marine Ecology* 32, 148–161.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnagli, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-miralles, F., Masó, M., René, A., Maria, A., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, 408–420.
- Monti, M., Cecchin, E., 2012. Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions. *Cryptogamie Algol* 33, 113–119.
- Núñez, D., Matute, P., García, A., García, P., Abadía, N., 2012. Outbreak of Ciguatera Food Poisoning by consumption of amberjack (*Seriola* spp.) in the Canary Islands, May 2012. *Eurosurveillance* 17 (23), 20188.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, Eduard, M.H., Wagner, H., 2019. *vegan*: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Bottein, M.-Y.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.
- Pérez-Arellano, J.L., Luzardo, O.P., Pérez Brito, A., Hernández Cabrera, M., Zumbado, M., Carranza, C., Ángel-Moreno, A., Dickey, R.W., Boada, L.D., 2005. Ciguatera Fish Poisoning, Canary Islands. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1981–1982.
- R Core Team, 2016. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.
- Ramilo, I., Figueroa, R.S., Rayón-Viña, F., Cuadrado, A., Bravo, I., 2021. Temperature-dependent growth and sexuality of the ciguatoxin producer dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. in cultures established from the Canary Islands. *Harmful Algae* 110.
- Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R.I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: implications for future trends of ciguatera in the area. *Harmful Algae* 67, 131–143.
- Rodríguez, F., Riobó, P., Crespín, G.D., Daranas, A.H., de Vera, C.R., Norte, M., Fernández, J.J., Fraga, S., 2018. The toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum maculosum* Faust is a synonym of *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. *Harmful Algae* 78, 1–8.
- Richlen, M.L., Lobel, P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 421, 51–66.
- Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., Anderson, D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30, 999–1011.
- Santos, M., Oliveira, P.B., Moita, M.T., David, H., Caeiro, M.F., Zingone, A., Amorim, A., Silva, A., 2019. Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal bays (SW Iberia): Insights from the plankton. *Harmful algae* 86, 20–36.
- Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A., Montresor, M., 2012. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. *Harmful Algae* 17, 25–34.
- Berdalet, E., Tester, P.A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., Zingone, A., 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30 (1), 36–45. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2017.108>.
- Besada, E.G., Loeblich, L.A., Loeblich III, A.R., 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates form ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bull. Mar. Sci.* 32 (3), 723–735.
- Betancor, S., Tuya, F., Gil-Díaz, T., Figueroa, F.L., Haroun, R., 2014. Effects of a submarine eruption on the performance of two brown seaweeds. *Journal of Sea Research* 87, 68–78.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae* 32, 1–10.
- Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algal News* 55, 15–17.
- Tester, P.A., Vandarsea, M.W., Buckel, C.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Davenport, E.D., Clark, R.D., Edwards, K.F., Taylor, J.C., Vander Pluym, J.L., Hickerson, E.L., Litaker, R.W., 2013. *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species diversity in the flower garden banks national marine sanctuary, Northern Gulf of Mexico, USA. *Harmful Algae* 29, 1–9.
- Tester, P.A., Litaker, R.W., Berdalet, E., 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* 91, 101655.
- Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D.M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin, pp. 293–314 vol. G 41.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233–239.
- Tudó, A., Gaiani, G., Rey Varela, M., Tsumuraya, T., Andree, K.B., Fernández-Tejedor, M., Campas, M., Diogène, J., 2020. Further advance of *Gambierdiscus* Species in the Canary Islands, with the First Report of *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins* 12 (11), 692.
- Tuya, F., Cisneros-Aguirre, J., Ortega-Borges, L., Haroun, R.J., 2007. Bathymetric segregation of sea urchins on reefs of the Canarian Archipelago: role of flow-induced forces. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73, 481–488.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 51–60. <https://doi.org/10.3354/ame026051>.
- Villareal, T.A., Hanson, S., Quaila, S., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 6 (2), 253–259.
- 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), e0153197.

Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Ojeda-Rodríguez, A., Amorim, A., 2016. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). Harmful Algae News 55, 14–16.

Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic)

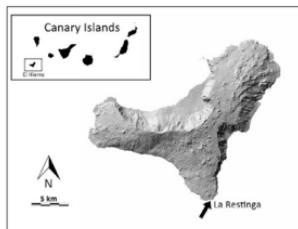


Fig. 1. Shaded relief image of El Hierro (GRAFCAN), Canary Islands. Location of the study area in La Restinga.

The Canary Archipelago (Fig. 1) is located in the southern limit of the temperate Northern Atlantic (28°06'N, 15°24'W) and together with the archipelagos of Azores, Madeira, Selvagens and Cape Verde, is part of a unique biogeographical region known as Macaronesia. El Hierro is the southernmost, smallest and most isolated island of the Canary archipelago and has been declared a UNESCO Biosphere Reserve.

The first record of a harmful algal bloom in the Canary Archipelago occurred quite recently, in August 2004, when a bloom of the planktonic cyanobacteria *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg ex Gomont developed along the coasts of Lanzarote, Fuerteventura, Gran Canaria and Tenerife [1]. In January, this same year, an outbreak of Ciguatera Fish Poisoning (CFP) was docu-

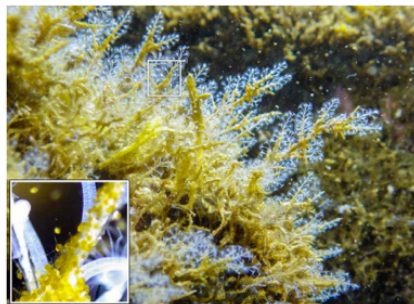


Fig. 2. *Gambierdiscus* mats smothering a cnidarian *Halécium* sp. colony (courtesy L. Moro). Inset: detail showing cells of *Gambierdiscus* spp.

mented for the first time in the Canary Islands, after the ingestion of a locally captured amberjack (*Seriola rivoliana* Valenciennes 1833) [2]. This event was quite unexpected since, by then, the Canary Islands were considered outside the recognised endemic area for CFP and the causative species (*Gambierdiscus* spp.) had not been reported for the region.

The presence of *Gambierdiscus* in the archipelago was first reported in November 2004, at the XI International Conference on Harmful Algae (Cape Town, South Africa), from samples collected in March of the same year on the northern coast of Tenerife [3,4]. Since then, five toxic species of *Gambierdiscus* have been reported for the Canary Islands, including two newly erected species for science, *G. excentricus* S. Fraga and *G. silvae* S. Fraga & F. Rodríguez [4-6]. Until now, most work on *Gambierdiscus* has resulted from opportunistic samples and short sampling expeditions, from which cells have been isolated and cultured under laboratory conditions for further taxonomical and toxicological studies. High densities have never been reported.

In the third week of October 2016, the international subaquatic photography contest Open FotoSub took place in La Restinga – Mar de las Calmas, El Hierro, an ecosystem with a high biodiversity, declared as a protected marine reserve. When diving, some of the participants were intrigued by the presence of a weird-looking brownish matt covering the sea bottom (Fig. 2). To investigate these observations, samples of the macroalgae *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Dictyota* spp. and *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau were collected, by snorkelling (ca. 2m depth), using

plastic bags, from 5 sampling sites in the harbour of La Restinga (27° 37,5' N 17° 59' 5" W). Samples were vigorously shaken and the water suspension was collected in stoppered tubes for further analysis in the laboratory. At the time of sampling water temperature was 25°C and salinity 36.8.

The epiphytic assemblages were investigated by light microscopy (Leica DM6000B) and Scanning Electron Microscopy (SEM) (JEOL JSM-6380LV). For plate tabulation description of *Gambierdiscus* we followed the nomenclature according to [3]. Cells were measured from SEM images using SEM Control User Interface v.7.11A by JEOL. Only cells that were clearly in apical and antapical view, were measured.

Sample observation revealed *Gambierdiscus* spp. was the only dinoflagellate present in the recovered epiphytic community (Fig. 3). A diverse diatom flora co-occurred with *Gambierdiscus* spp., namely species of the genera *Actinocyclus*, *Achnanthes*, *Amphora*, *Nitzschia* and *Pleurosigma* (Fig. 3). In one sample of *H. scoparia* the concentration of *Gambierdiscus* spp. was estimated, reaching more than 10⁴ cells g⁻¹ wet weight. This value is close to some of the maximal concentrations referred for other species of *Gambierdiscus* in CFP affected areas [7].

All cells of *Gambierdiscus* analysed were antero-posteriorly compressed and round to slightly oval shaped in apical view. The thecal surface was smooth with evenly distributed round pores. Observation by calcofluor staining and SEM revealed an almost centrally located Po (slight ventral displacement) with a fish-hook like slit, surrounded by a row of pores, in some areas with 2 rows (Fig. 4). The chloroplasts were golden-brown. The dorso-ventral depth (DV) range was 71.4-82.8µm (n=7) and the width (W) range 62.2-82.9µm, with a mean DV/W ratio of 1.1±0.11. In the episome (Fig. 4), plate 2' was the biggest apical plate and varied from rectangular to hatched-shaped with the ratio between the suture length of 2'/1' and 2'/3' ranging between 0.63 and 1.0 (mean=0.84±0.14, n=9). Plate 3' was pentagonal and small relative to 2'. Plate 4' and plate 3" were symmetrical. Plate 1' was very narrow and small, not visible in apical view but clearly visible in ventral view (Fig. 5). Specimens observed

Soler-Onís, E., Ramírez, A., Fernández-Zabala, J., 2019. First records of *Gambierdiscus excentricus* and *Ostreopsis lenticularis* in the Cape Verde Archipelago (Macaronesia, Central Eastern Atlantic). Harmful Algae News 63, 8–9.

First records of *Gambierdiscus excentricus* and *Ostreopsis lenticularis* in the Cape Verde Archipelago (Macaronesia, Central Eastern Atlantic)

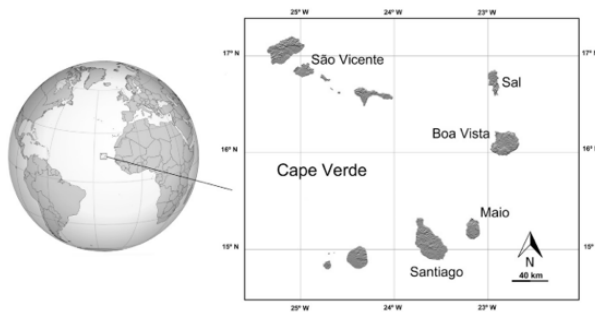


Fig. 1. Map of Cape Verde archipelago (Macaronesia Region).

Harmful algal blooms (HAB) species frequently recorded in tropical latitudes are apparently increasing their distribution in temperate areas [1]. This expansion is linked both to naturally occurring changes, such as global warming, as well as anthropogenic causes such as ship ballast water transport, nutrient loading, marine habitat deterioration and expanding aquaculture [2]. These changes are allowing the establishment of HAB species in areas where they were previously unknown. In some areas, this has been well studied, whereas in others the only evidence of the presence of these species is the harmful impact they have had on marine organisms, the environment and human health.

Macaronesia is a name used to designate several archipelagos of volcanic origin in the Atlantic off the south west coast of Europe and north west of Afri-

ca; the Azores and Madeira (Portugal), the Canary Islands (Spain) and Cape Verde. There are no reports on the occurrence of ciguatoxins (CTXs) and maitotoxins (MTXs)-producing dinoflagellates in Cape Verde.

Currently, the only information available on microalgae in the Cape Verde Islands was published by Silva in 1956 from material collected in Boa Vista Island in 1948 [3]. Silva's study included the first report of a presumed *Gambierdiscus* species named as *Goniodoma* sp. Fraga and Rodríguez described a new benthic dinoflagellate species, *Gambierdiscus silvae*, in the Canary Islands and suggested that probably corresponded to Silva's original description of *Goniodoma* sp. [4].

The objectives of the project MIMAR (MAC/4.6d/066), funded by the European Union included the monitoring, control and mitigation of the observed

changes in the marine ecosystems from Macaronesia. Within the framework of this project, different islands have been sampled within the Cape Verde Archipelago and since 2017 an exhaustive inventory of microalgae species with particular interest on potentially harmful species is being carried out. Sampling has been performed in 32 coastal sites on five Islands: São Vicente, Sal, Maio, Santiago and Boa Vista (Fig.1). Sampling sites included a variety of intertidal and subtidal marine habitats ranging from 1 to 40 meters depth. Habitats included sandy and rocky substrates, macroalgal beds and coral beds (Fig. 2). Benthic microalgae species, both from macroalgae and from artificial substrates were sampled by snorkelling and by SCUBA diving. Water temperature during the sampling period ranged from 24 to 27 °C. Cells were examined with scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6380 LV) and with light microscopy/fluorescence microscopy (LEICA DM6000 B). Cells were stained with fluorescent stain calcofluor for the examination of their plate tabulation. A total of 140 microalgae species were identified. Diatoms were the most numerous group with 108 species. *Gambierdiscus excentricus* Fraga, *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo and *Ostreopsis* cf. *ovata* Y. Fukuyo were identified amongst the dinoflagellates.

Gambierdiscus excentricus had an anteroposteriorly compressed lenticular shape. Measurement ranges



Fig. 2. Macroalgae and corals habitat at Baia das Gatas, São Vicente.

Tester, P. A., Berdalet, E., Chinain, M., Dechraoui Bottein, M. Y., Fernández-Zabala, J., Garrido Gamarro, E., Litaker, R. W., Soler-Onís, E., 2021. Early Warning Systems for *Gambierdiscus* and other benthic harmful algae: sampling challenges. 19th International Conference on Harmful Algae, La Paz, Mexico, pp. 316-321



Early Warning Systems for *Gambierdiscus* and other benthic harmful algae: sampling challenges

Patricia A. Tester^{1*}, Elisa Berdalet², Mireille Chinain³, Marie-Yasmine Dechraoui Bottein⁴, Juan Fernández-Zabala⁵, Esther Garrido Gamarro⁶, R. Wayne Litaker⁷, Emilio Soler-Onís⁵

¹*Ocean Tester, LLC, Beaufort, North Carolina, U.S.A.*; ²*Institute of Marine Sciences, Barcelona, Catalonia, Spain*; ³*Institut Louis Malardé, Papeete-Tahiti, French Polynesia*; ⁴*Université Côte d'Azur, CNRS, UMR 7035 ECOSEAS, Nice, France*; ⁵*Observatorio Canario de HABs, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain*; ⁶*Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy*; ⁷*CSS, Inc. under Contract to National Oceanic and Atmospheric Administration.*

*corresponding author's email: Ocean.Tester@gmail.com

Abstract

Ciguatera poisoning (CP) is a long-neglected foodborne disease affecting tropical regions of the Pacific and Indian Oceans and the Caribbean Sea. CP was raised by the Pacific Nations at the 32nd Session of the FAO Committee on Fisheries in 2016. In 2017, it was an agenda item at the 11th Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods. The committee requested scientific advice from FAO and WHO, so late 2018 a group of experts met to develop the Joint FAO-WHO Report of the Expert Meeting on Ciguatera Poisoning that provided risk management options for CP. In parallel with this, an interagency global ciguatera strategy was developed among FAO, IOC, IAEA and WHO. Building on these initiatives, these three UN Agencies convened an expert meeting to develop Joint FAO, IOC, IAEA Technical guidance for the implementation of Early Warning Systems (EWSs) for harmful algal blooms (HABs). The EWS approach includes monitoring protocols for sampling benthic genera like *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* that produce toxins responsible for CP. Advances in *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* taxonomy, better understanding of their global distribution and toxicity and species-specific molecular identification and enumeration methods help make this possible.

Keywords: Artificial substrate, cell-based early warning system, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*
<https://doi.org/10.5281/zenodo.7033165>



Tester, P. A., Litaker, R. W., Soler-Onís, E., Fernández-Zabala, J., Berdalet, T., 2022. Using Artificial Substrates to Quantify *Gambierdiscus* and Other Toxic Benthic Dinoflagellates for Monitoring Purposes. *Harmful Algae*, 120, 102351. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102351>

Harmful Algae 120 (2022) 102351



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Harmful Algae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hal



Using artificial substrates to quantify *Gambierdiscus* and other toxic benthic dinoflagellates for monitoring purposes

Patricia A. Tester^{a,*}, R. Wayne Litaker^b, Emilio Soler-Onís^{c,d}, Juan Fernández-Zabala^{c,d}, Elisa Berdalet^e

^a Ocean Tester LLC, 295 Dills Point Road, Beaufort, NC 28516, USA

^b CSS Inc., Under Contract to National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Science, Beaufort Laboratory, 101 Pivers Island Rd., Beaufort, NC, 28516, USA

^c Observatorio Canario de Algas Nocivas (OCHAB), FCPCT-ULPGC, Parque Científico Tecnológico Marino de Taliarte, C/ Miramar, 121. 35214 Taliarte, Las Palmas, Canary Islands, Spain

^d Grupo de Ecofisiología Marina (EOMAR), IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira, 35017, Las Palmas, Canary Islands, Spain

^e Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Editor: Dr. C. Gobler

Keywords:

Benthic Harmful Algal bloom (BHAB)
Cell-based early warning system
Dinoflagellates
Epibenthic dinoflagellates
Ostreopsis
Sample replication

ABSTRACT

Collecting methods generally used to determine cell abundances of toxic benthic dinoflagellates (BHAB) use cells dislodged from either macrophytes or artificial substrates. This article compares the advantages of the macrophyte and artificial substrate methods and discusses which method is more appropriate for use in monitoring programs that focus on toxic BHAB species identification and quantification. The concept of benthic dinoflagellate “preference” for specific macrophytes was also reviewed. Examination of data from 75 field studies showed macrophytes with higher surface area per unit biomass harbored higher concentrations of *Gambierdiscus* cells. There was no definitive evidence that cells were actively selecting one macrophyte over another. This observation supports the use of artificial substrates (AS) as a means of assessing cell abundances in complex habitats because cell counts are normalized to a standardized surface area, not macrophyte biomass. The artificial substrate method represents the most robust approach, currently available, for collecting toxic, benthic dinoflagellates for a cell-based early warning system.

1. Introduction

Ciguatera poisoning (CP) is a long-neglected malady affecting tropical regions of the Pacific and Indian Oceans, the Caribbean Sea and more recently, Macaronesia. It is caused by the bioaccumulation of ciguatoxins (CTXs) produced by benthic dinoflagellates in the genera *Gambierdiscus* and *Pukuyoa* (referred to hereafter only as *Gambierdiscus*) in marine food webs. In light of increasing ocean temperatures and sea level rise, CP is of special concern regarding food security for small, tropical, island nations. The Pacific Nations participating in the 32nd Session of the Committee on Fisheries, 2016 specifically raised CP “... as an issue that increasingly affects the tropical and subtropical regions of the Pacific Ocean, Indian Ocean, and Caribbean Sea, between the latitudes 35°N and 35°S. Indeed, it was noted that due to climate change the frequency of storms and hurricanes increases as well as the sea surface temperature (SST)

which impacts on the distribution and proliferation of the ciguatera-toxins (CTX) and makes the occurrence of CFP less predictable (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO 2016).” The following year, CP was a featured agenda item during the 11th Session of the Codex Committee on Contaminants in Food (CCCF 2021).

After hearing testimony, the 2017 Codex Committee requested scientific information and in late 2018 a joint Food and Agriculture Organization–World Health Organization (FAO-WHO, UNESCO) meeting of experts was held to provide advice on the development of risk management options for CP. As a consequence of the Report of the Expert Meeting on Ciguatera Poisoning (FAO and WHO, 2020), a task team was asked to develop implementation plans for Early Warning Systems (EWSs) for Harmful Algal Blooms (HABs) including benthic species (Technical Guidance for the Implementation of Early Warning Systems for Harmful Algal Blooms, FAO, International Oceanographic

* Corresponding author.

E-mail address: ocean.tester@gmail.com (P.A. Tester).

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102351>

Received 10 August 2022; Received in revised form 3 November 2022; Accepted 7 November 2022

1568-9883/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria

