



Acta Botanica  
Mexicana

## Reconocimiento de dos variedades taxonómicas de *Pyrodinium bahamense* (Gonyaulacales, Dinophyceae): var. *bahamense* y var. *compressum*

### Recognition of two taxonomic varieties of *Pyrodinium bahamense* (Gonyaulacales, Dinophyceae): var. *bahamense* y var. *compressum*

María Eugenia Zamudio Resendiz<sup>1</sup>, Alexis de Jesús Escárcega Bata<sup>1,3</sup>, María Luisa Núñez Resendiz<sup>2</sup>

María Esther Meave del Castillo<sup>1</sup>

#### Resumen:

**Antecedentes y Objetivos:** *Pyrodinium* es un género monotípico con dos variedades, var. *bahamense* en el Atlántico, no tóxica, y var. *compressum* en el Indo-Pacífico y tóxica. Hallazgos recientes de toxicidad por envenenamiento paralizante por mariscos (PSP), en poblaciones de *P. bahamense* var. *bahamense*, debilitaron el interés por aceptarlas como independientes, e incluso investigar la posibilidad de cripticismo. En los pocos estudios que han incorporado evidencia molecular en el tratamiento de las variedades, su independencia taxonómica sigue siendo negada, a pesar de la evidente y consistente separación genética presentada en todos los análisis. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue reconocer, desde la evidencia genética, la independencia taxonómica de las dos variedades de *Pyrodinium*: *P. bahamense* var. *compressum* y var. *bahamense*.

**Métodos:** A partir de tres marcadores moleculares (*Lcf*, LSU, SSU) de secuencias disponibles en el GenBank, se construyeron redes de parsimonia estadística y un análisis filogenético concatenado.

**Resultados clave:** En todos los análisis, se obtuvo de manera consistente una estructura genética para *P. bahamense* var. *bahamense* y otra para *P. bahamense* var. *compressum*. Además, la correspondencia de haplotipos y ribotipos resultantes fue siempre la misma, tanto en redes como en la filogenia; es decir, las muestras del Océano Pacífico siempre se colocaron en un grupo distinto al de las secuencias del Océano Atlántico.

**Conclusiones:** La evidencia proporcionada en este estudio demostró que existe un aislamiento reproductivo entre ambas variedades, e incluso la posible presencia de una tercera variedad aún no descrita, por lo cual proponemos la validez e independencia taxonómica de *P. bahamense* var. *compressum* y *P. bahamense* var. *bahamense*.

**Palabras clave:** *Lcf*, LSU, red de parsimonia estadística, SSU, variación genética.

#### Abstract:

**Background and Aims:** *Pyrodinium* is a monotypic genus with two varieties, var. *bahamense* in the Atlantic, non-toxic, and var. *compressum* in the Indo-Pacific and toxic. Recent findings of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxicity in populations of *P. bahamense* var. *bahamense* weakened the interest in accepting both varieties as independent, and even investigating the possibility of crypticism between them. In the few studies that have involved molecular evidence in the treatment of varieties, their taxonomic independence continues to be denied, despite the evident and consistent genetic separation shown in all analyses. Therefore, the aim of this study was to recognize, based on genetic evidence, the taxonomic independence of the two varieties of *Pyrodinium*: *P. bahamense* var. *compressum* and var. *bahamense*.

**Methods:** Based on three molecular markers (*Lcf*, LSU, SSU) of sequences available in GenBank, statistical parsimony networks and a concatenated phylogenetic analysis were constructed.

**Key results:** In all analyses, a genetic structure was consistently obtained for *P. bahamense* var. *bahamense* and another one for *P. bahamense* var. *compressum*. Furthermore, the correspondence of the resulting haplotypes and ribotypes was always the same in both networks and phylogeny, i.e., the samples from the Pacific Ocean were always placed in a different group than those from the Atlantic Ocean.

**Conclusions:** The evidence provided in this study demonstrated the reproductive isolation between both varieties, and even the possible presence of a not yet described third variety, as a consequence of which we propose the validity and taxonomic independence of *P. bahamense* var. *compressum* and *P. bahamense* var. *bahamense*.

**Key words:** genetic variation, *Lcf*, LSU, statistical parsimony network, SSU.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Laboratorio de Fitoplancton Marino y Salobre, Apdo. postal 55-535, 09340 Cd. Mx., México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Laboratorio de Macroalgas Marinas y Salobres, Apdo. postal 55-535, 09340 Cd. Mx., México.

<sup>3</sup>Autor para la correspondencia: [escarcega.alexis@uabc.edu.mx](mailto:escarcega.alexis@uabc.edu.mx)

Recibido: 9 de septiembre de 2021.

Revisado: 12 de octubre de 2021.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 13 de diciembre de 2021.

Publicado Primero en línea: 13 de enero de 2022.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 129(2022).



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Zamudio Resendiz, M. E., A de J. Escárcega Bata, M. L. Núñez Resendiz y M. E. Meave del Castillo. 2022. Reconocimiento de dos variedades taxonómicas de *Pyrodinium bahamense* (Gonyaulacales, Dinophyceae): var. *bahamense* y var. *compressum*. Acta Botanica Mexicana 129: e1967. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.1967>

## Introducción

*Pyrodinium bahamense* Plate es un dinoflagelado teclado, bioluminiscente, perteneciente al orden Gonyaulacales, erigido a partir de organismos colectados por Plate en 1906 en las Bahamas (New Providence Island). Años más tarde, Böhm (1931) encontró ejemplares similares en el Golfo Pérsico, aunque formando cadenas de células comprimidas anteroposteriormente, a los que denominó *Pyrodinium bahamense* f. *compressa* Böhm (*Pbc*). Dos años después en el Mar Rojo, Matzenahuer (1933) describió una especie semejante: *Gonyaulax schilleri* Matzenahuer, la cual después fue transferida por Schiller (1937) al género *Pyrodinium* Plate, señalando que *P. bahamense* f. *compressa* era su sinónimo. En 1972, en el sureste de Asia en Port Moresby, Papúa Nueva Guinea, ocurrió el primer florecimiento algal nocivo (FAN) de *Pbc*, produciendo envenenamiento paralítico por mariscos (PSP, por sus siglas en inglés) (MacLean, 1989). Desde ese momento, varios otros episodios ocurrieron en esa región del Pacífico occidental y a partir de 1987 también en el Pacífico oriental, pues de julio a octubre ocurrió un FAN de *Pbc* en las costas de Guatemala, causando la muerte de 26 personas y la intoxicación de 186 (Rosales-Loessener, 1989a; Cortes-Altamirano et al., 1993). Dado que todos estos eventos tóxicos fueron causados por *Pbc*, los taxónomos enfatizaron aún más la existencia de las dos variedades; reconociéndose la forma comprimida (*compressa*) como la tóxica y la f. *bahamense* como la inocua (Hallegraeff y Maclean, 1989). Steidinger et al. (1980), valorando al menos seis diferencias constantes tanto morfológicas como fisiológicas, estas últimas referente a su toxicidad, consideraron que la variedad *compressa* era realmente conespecífica con *Pyrodinium bahamense*, pero le dieron valor a la categoría de variedad. Más tarde el nombre de *compressa* fue corregido a *compressum* por Balech (1985). De esta manera, ambas variedades fueron aceptadas por la mayoría de los taxónomos, agregando a las diferencias morfológicas y fisiológicas su distinta distribución geográfica, con excepción de Mertens et al. (2015), quienes desconocen el peso de estos caracteres en el reconocimiento de estas variedades y recomiendan tratarlas como un solo taxón. Así, la var. *bahamense* ocurre en latitudes tropicales y subtropicales, principalmente en el Atlántico y Mar

Caribe (Gómez-Aguirre y Licea, 1998; Usup et al., 2012), aunque Martínez-López et al. (2007), Morquecho (2008), y Gárate-Lizárraga y González-Armas (2011) la reportan en áreas costeras del Pacífico mexicano. Por otro lado, la var. *compressum* está distribuida prácticamente en todo el Océano Pacífico (tanto en la porción occidental como en la oriental) y en el Océano Índico (Alonso-Rodríguez et al., 2008; Gárate-Lizárraga y González-Armas, 2011; Morquecho, 2019). Ambas variedades han sido reportadas en coocurrencia en la costa occidental de México (Meave-del Castillo et al., 2019) y en Costa Rica (Vargas-Montero y Freer, 2003). A estas diferencias se pueden sumar las ambientales: Phlips et al. (2006) señalan que la var. *bahamense* se desarrolla en sitios tranquilos y someros, con cambios de salinidad importantes, donde la columna de agua es estable y el tiempo de residencia largo, mientras que la var. *compressum* ocurre en zonas costeras más dinámicas e incluso en el océano abierto, en sitios con tiempos de residencia cortos y temperatura y salinidad estables.

Recientemente, se encontró toxicidad PSP y saxitoxina en una población identificada como var. *bahamense* (Landsberg et al., 2006; Lewitus et al., 2014), lo que ha llevado a sugerir que *P. bahamense* es un complejo de especies y que el término “variedades” ya no está justificado (Mertens et al., 2015), a pesar de toda la evidencia adicional anteriormente presentada por otros autores (Steidinger et al., 1980; Hallegraeff y Maclean, 1989), generando así la problemática actual.

En estudios de filogenia y diversidad genética en grupos de fitoplancton marino, que presentan una baja variación morfológica, como el caso de *Pyrodinium* (Kamikawa et al., 2009; Kuno et al., 2010; Miranda et al., 2012; Cusick et al., 2016; Rhodes et al., 2017; Hernández-Rosas et al., 2018), diferentes marcadores moleculares, como ITS (espaciador transcrito interno), LSU (subunidad grande del ribosoma), SSU (subunidad pequeña del ribosoma), *Lcf* (gen de la luciferasa) y *cox1* (citocromo oxidasa subunidad 1), han sido empleados con éxito en el aporte de evidencia para la delimitación de especies. Adicionalmente, dichos marcadores han permitido comprender la estructura y la conectividad de las poblaciones, con poca o nula diferenciación entre ellas, lo que ha contribuido a un mejor entendimiento

de sus relaciones filogenéticas e historia evolutiva (Scholin et al., 1994; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009; Uwe et al., 2014).

Aunque las poblaciones de *Pyrodinium* con distribución en los océanos Indo-Pacífico y Atlántico Occidental han sido estudiadas con múltiples marcadores (LSU, SSU, *Lcf*) y con todos ellos se ha evidenciado, de manera consistente, la estructura genética entre las dos variedades, los autores han mantenido una posición neutral en cuanto al reconocimiento de la independencia genética entre ellas (Leaw et al., 2005; Usup et al., 2012; Mertens et al., 2015; Cusick et al., 2016). Por tanto, nuestro objetivo fue reconocer, desde la evidencia genética, la independencia taxonómica de las dos variedades de *Pyrodinium*: *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* y *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense*.

## Materiales y Métodos

Secuencias de *P. bahamense* var. *bahamense* y var. *compressum* de los océanos Atlántico occidental e Indo-Pacífico se obtuvieron de la base de datos (GenBank, 2020) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para los marcadores *Lcf*, LSU y SSU (Apéndice 1), ya que estos marcadores tenían un mayor número de secuencias disponibles. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Bioedit v. 7.0.5 (Hall, 1999). Se analizaron los conjuntos de datos de *Lcf*, LSU y SSU, por separado. Algunas de estas secuencias se incluyeron, junto con otras secuencias del orden Gonyaulacales (Apéndice 2), en un conjunto de datos combinado de *Lcf*, LSU y SSU. Para los conjuntos de datos de *Lcf*, LSU y SSU, se generaron redes de parsimonia estadística utilizando el programa TCS v. 1.21 (Clement et al., 2000). Para el conjunto de datos combinados de *Lcf*, LSU y SSU, los taxones para los que no estaba disponible una secuencia de algún marcador se trataron como datos faltantes. Se incluyó como grupo externo a *Hematodinium perezii* Chatton & Poisson; esta especie fue seleccionada por pertenecer a un orden diferente y distante de Gonyaulacales. A partir de este conjunto de datos, se realizaron análisis filogenéticos utilizando máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB), dividiendo por separado los datos en posiciones de codones. El modelo evolutivo seleccionado fue Jukes-Cantor (JC) determinado con base a la

prueba de razón de máxima verosimilitud implementada por el software TOPALi v. 2 (Milne et al., 2009). El análisis de ML se realizó utilizando el software RAXML v. 8 (Stamatakis, 2006). El soporte para cada rama se obtuvo a partir de 1000 réplicas de bootstrap. Para el análisis de BI se utilizó MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist et al., 2012). Se utilizaron cuatro cadenas de la cadena de Markov Monte Carlo, comenzando con un árbol aleatorio y muestreando los datos cada 500 generaciones durante  $5 \times 10^6$ . El 25% de los árboles se descartaron como burn-in.

## Resultados

Las redes de parsimonia estadística y análisis filogenético mostraron que existe variación genética y aislamiento reproductivo entre secuencias de *P. bahamense* var. *bahamense* y var. *compressum* (Figs. 1A, B).

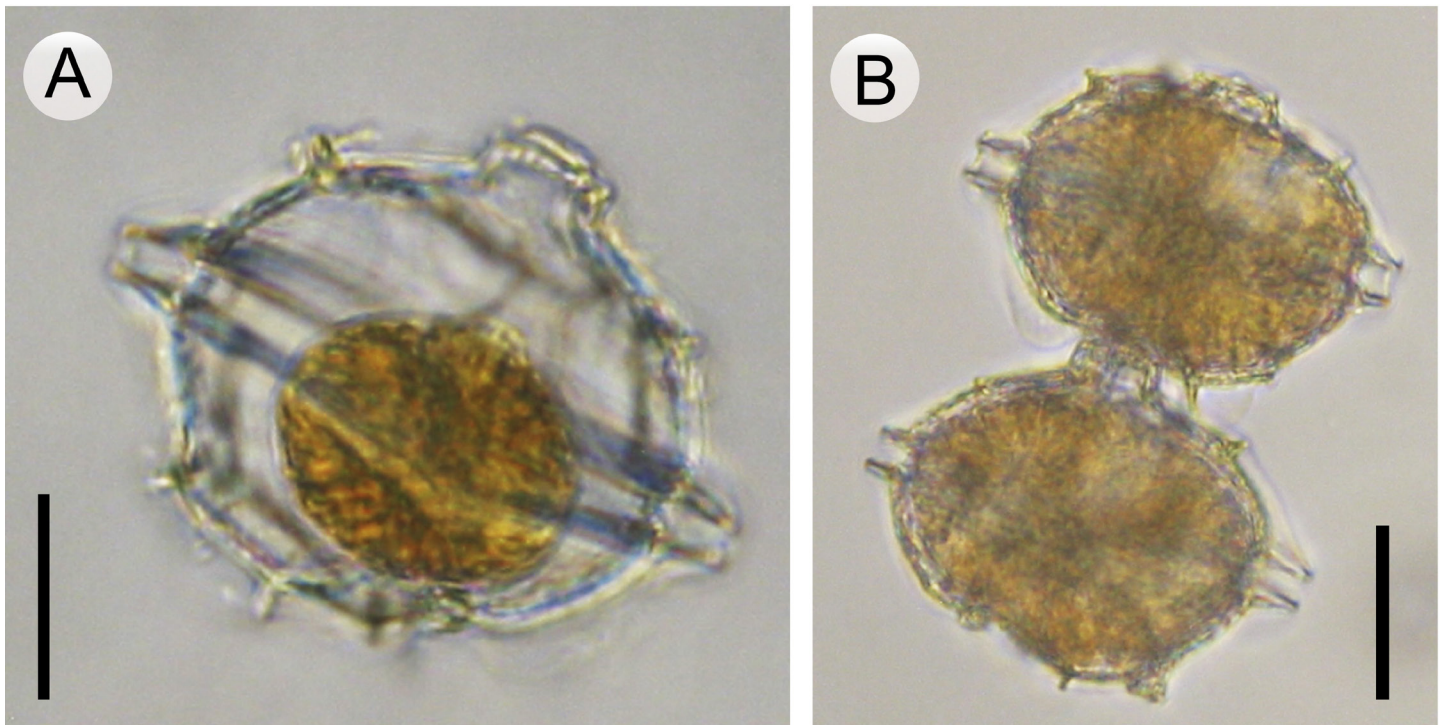
### Variación genética

#### Set de datos del marcador *Lcf*

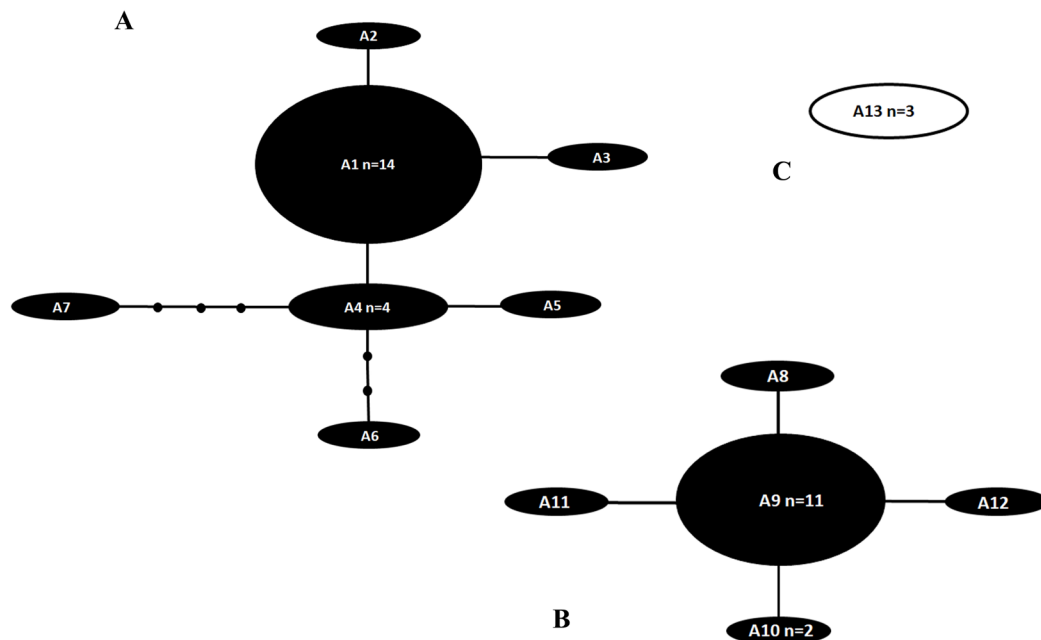
La comparación de 42 secuencias (365 pares de bases (pb)) reveló 38 sitios polimórficos en muestras de *Pyrodinium* de los océanos Atlántico occidental e Indo-Pacífico (Apéndice 1). La red de parsimonia estadística (Fig. 2) mostró 13 haplotipos, A1-A13 (Apéndices 1, 2) dispuestos en tres redes separadas (Figs. 2A-C). El haplotipo A1 tuvo el mayor número de muestras (n=14), seguido del haplotipo A9 (n=11). La primera red estuvo formada por los haplotipos A1-A7 (de River Lagoon, Florida), separados de A1 por un solo paso mutacional, el haplotipo A6 separado por tres pasos mutacionales y el haplotipo A7 separado por cuatro pasos mutacionales (Fig. 2A). La segunda red estuvo formada por los haplotipos A8-A12 (de River Lagoon, Florida), todos ellos separados entre sí por un solo paso mutacional (Fig. 2B). La tercera red estaba formada por un solo haplotipo (A13) (de Malasia) con tres secuencias (Fig. 2C).

#### Set de datos del marcador LSU

La comparación de 15 secuencias (647 pb) reveló siete sitios polimórficos (Cuadro 1). La red de parsimonia estadística (Fig. 3) mostró tres ribotipos interconectados, B1-B3 (Cuadro 1, Apéndice 2). El ribotipo B3 (de Florida y Jamaica) se encontró en nueve secuencias (n=9) y estuvo claramente



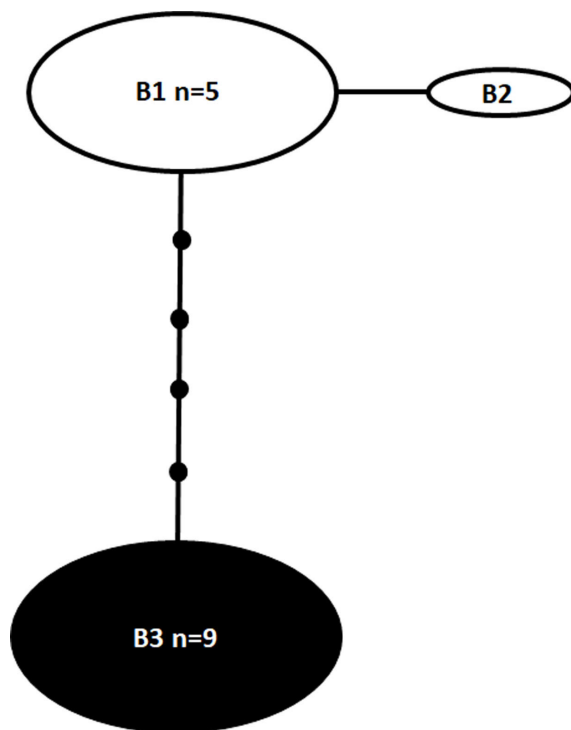
**Figura 1:** *Pyrodinium bahamense* Plate (microscopio óptico). A. célula solitaria de *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* Plate; B. cadena de dos células de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor. Un estudio detallado de la morfología de ambas variedades se puede consultar en Meave del Castillo et al. (2019). Barra de escala: A=20  $\mu$ m; B=30  $\mu$ m.



**Figura 2:** Red de parsimonia estadística para el marcador *Lcf* de secuencias de *Pyrodinium bahamense* Plate. Los haplotipos del Océano Atlántico occidental (*P. bahamense* var. *bahamense* Plate) se indican en negro, mientras que los haplotipos del Océano Indo-Pacífico (*P. bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor) se indican en blanco. A, B y C indican cada una de las diferentes redes. Las líneas representan un paso mutacional; los pequeños círculos negros indican la ausencia de haplotipos. n=número de muestras con secuencia idéntica. No se indica el tamaño de la muestra en los haplotipos con una sola muestra.

**Cuadro 1:** Posiciones variables en secuencias de ARN alineadas de la LSU de *Pyrodinium bahamense* Plate. Ribotipos de *P. bahamense* var. *compressum* (Böhmer) Steidinger, Tester & Taylor se indican en negritas; de manera contraria, se indica el ribotipo de *P. bahamense* var. *bahamense* Plate (ver Fig. 3 para la red de haplotipos).

| Ribotipos/sitios | 2        | 67       | 106      | 108      | 182      | 208      | 575      |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>B1</b>        | <b>A</b> | <b>T</b> | <b>G</b> | <b>T</b> | <b>C</b> | <b>T</b> | <b>G</b> |
| <b>B2</b>        | -        | -        | -        | <b>A</b> | -        | <b>A</b> | <b>T</b> |
| B3               | C        | C        | A        | T        | T        | T        | G        |



**Figura 3:** Red de parsimonia estadística para el marcador LSU de secuencias de *Pyrodinium bahamense*. Los ribotipos del Océano Atlántico occidental (*P. bahamense* var. *bahamense*) se indican en negro, mientras que los ribotipos del Océano Indo-Pacífico (*P. bahamense* var. *compressum*) se indican en blanco. Las líneas representan un paso mutacional; los pequeños círculos negros indican la falta de ribotipos. n=número de muestras con secuencia idéntica. No se indica el tamaño de la muestra en ribotipos con una sola muestra.

separado por los ribotipos B2 (de Filipinas) y B3 (de Malasia, Filipinas y Japón) por cinco pasos mutacionales. Los ribotipos B1 y B2, a su vez, se separaron entre sí mediante un único paso mutacional (Fig. 3).

## Set de datos del marcador SSU

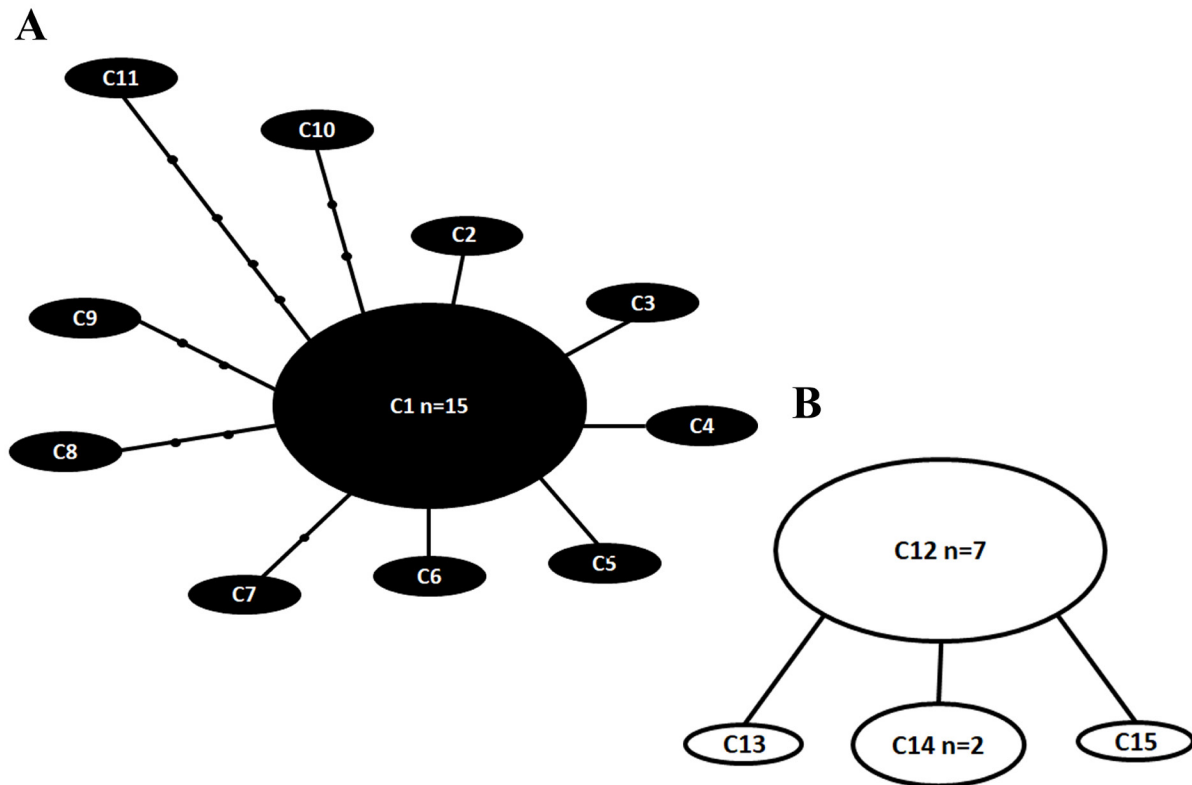
La comparación de 38 secuencias (593 pb) reveló 288 sitios polimórficos (el cuadro no se muestra debido al gran número de sitios polimórficos). La red de parsimonia estadística mostró 15 ribotipos (Apéndice 2, Fig. 4), C1-C15 dispuestos en dos redes separadas (Figs. 4A, B). El ribotipo C1 tuvo el mayor número de muestras (n=15), seguido del ribotipo C12 (n=7). La primera red estuvo formada por los ribotipos C1-C11 (de Florida), los ribotipos C1-C6 separados de C1 por un solo paso mutacional, el ribotipo C7 separado por dos pasos mutacionales, los ribotipos C8-C10 separados por tres pasos mutacionales y el ribotipo C11 separado por cinco pasos mutacionales. (Fig. 4A). La segunda red la formaron los ribotipos C12-C15 de Florida (Fig. 4B), todos separados de C12 por un paso mutacional.

## Análisis filogenético

La combinación de *Lcf*, LSU y SSU constó de 26 secuencias y 1605 pb de longitud. La topología resultante mostró que las secuencias de *Pyrodinium bahamense* formaron un grupo monofilético, con el máximo soporte filogenético, diferenciado a su vez en dos grupos hermanos (Fig. 5). El grupo del Atlántico occidental estuvo integrado por secuencias de la var. *bahamense*, mientras que el grupo Indo-Pacífico por secuencias de la var. *compressum*. Una secuencia de la var. *bahamense*, de Florida, mostró una relación estrecha con secuencias de la var. *compressum* de Malasia y se resolvió como su grupo hermano. Estos dos grupos formaron un clado mayor, también con el máximo apoyo, con secuencias de especies del género *Alexandrium* Halim, como su grupo hermano (Fig. 5).

## Discusión

A pesar de que se han establecido diferencias morfológicas, fisiológicas, ecológicas, genéticas y biogeográficas entre *P. bahamense* var. *bahamense* y var. *compressum*, hoy en día se sugiere que ambas variedades se tratan de la misma especie (Mertens et al., 2015). Balech (1985) fue el primero en hacer esta propuesta con base en un estudio detallado de la teca de ejemplares de la var. *bahamense* (de Puerto Rico y Jamaica) y de la var. *compressum* (procedentes de Nueva Guinea y Filipinas) y no encontró diferencias consistentes, aunque sí ciertas tendencias diferenciales entre la morfolo-

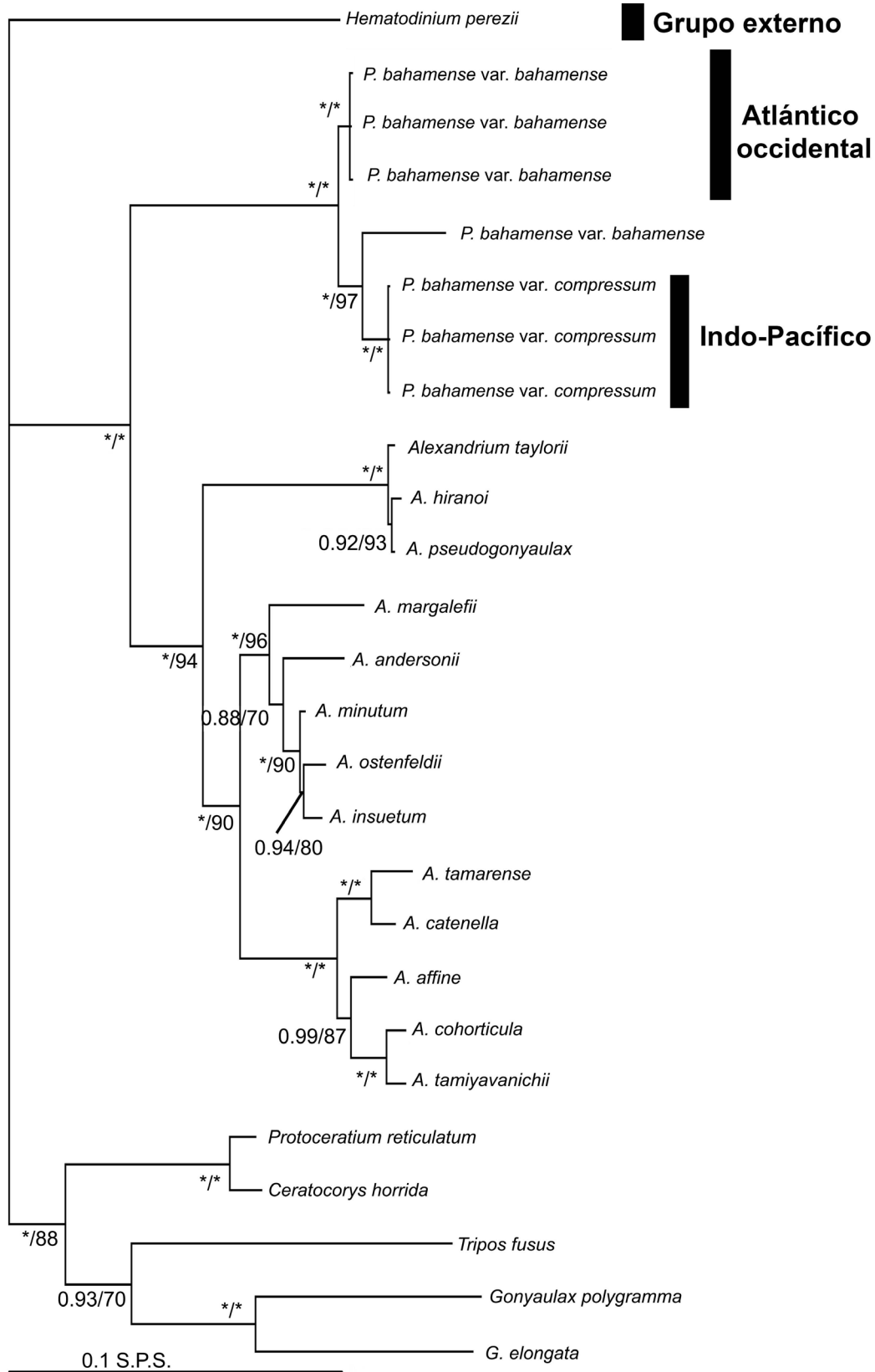


**Figure 4:** Red de parsimonia estadística para el marcador SSU de secuencias de *Pyrodinium bahamense* Plate. Los ribotipos del Océano Atlántico occidental (*P. bahamense* var. *bahamense* Plate) se indican en negro, mientras que los ribotipos del Océano Indo-Pacífico (*P. bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor) se indican en blanco. A, B y C indican cada una de las diferentes redes. Las líneas representan un paso mutacional; los pequeños círculos negros indican la falta de ribotipos. n=número de muestras con secuencia idéntica. No se indica el tamaño de la muestra en ribotipos con una sola muestra.

gía de ambas variedades a las que no se les dio peso taxonómico y, aunque propuso que las diferencias de toxicidad encontradas entre ambos taxa podrían deberse a la ocurrencia de una evolución críptica, en la que la diferenciación únicamente era fisiológica, consideró que las diferencias en toxicidad podían deberse a agentes externos, incluyendo las bacterias simbióticas (Balech, 1985; Usup et al., 2012). De esta manera, Balech (1985) señaló que *Pyrodinium* contiene un solo taxón, sinonimizando las siguientes especies con *Pyrodinium bahamense*: *P. bahamense* f. *compressum* ("compressa"), *Gonyaulax schilleri*, *P. schilleri* (Matzenauer) Schiller, *P. bahamense* var. *compressum* ("compressa") (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor, así como sus quistes fósiles *Polysphaeridium zoharyi* (Rossignol) Davey & Williams y *Hemicystodinium zoharyi* (Rossignol) Wall. Adicionalmente, la concepción de validar a las variedades, e incluso pensar en que ambos taxa podrían ser especies crípticas, dejó

de considerarse cuando Landsberg et al. (2006) y Lewitus et al. (2014) registraron toxicidad tipo PSP y saxitoxinas en una población de *P. bahamense* var. *bahamense* de Indian River Lagoon, Florida.

Con respecto a la toxicidad, se han encontrado distintos perfiles de saxitoxinas en diferentes regiones del planeta, e incluso dentro de poblaciones de la misma variedad, como puede apreciarse en el Cuadro 2. Sin embargo, las toxinas no están relacionadas con variaciones genéticas al interior de organismos de la misma especie, sino más bien con una respuesta fisiológica a ciertas condiciones ambientales particulares que generan un tipo de estrés, por lo que existen especies potencialmente tóxicas que no en todos los ambientes expresan toxicidad. Usup et al. (1994) encontraron que el contenido y composición de PSP se afecta por los factores que están relacionados con la tasa de crecimiento de la especie, como es la luz. La mayor



**Figura 5:** Topología bayesiana basada en datos de secuencias combinadas de los marcadores *Lcf*, *LSU* y *SSU* de *Pyrodinium bahamense* Plate. IB (izquierda) seguido de los valores de soporte de ML (derecha) en las ramas. Los asteriscos indican soporte total (1.00% IB, 100% ML). El grupo Atlántico occidental indica secuencias de *P. bahamense* var. *bahamense* Plate y el grupo Indo-Pacífico indica secuencias de *P. bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor (ver resultados). S.P.S.=sustituciones por sitio. Los números de acceso de GenBank (2020) para las secuencias utilizadas en este análisis se proporcionan en el Apéndice 3.

**Cuadro 2:** Perfil de toxinas de envenenamiento por consumo de mariscos (PSP) de distintas poblaciones de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor (*Pbc*) y *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* Plate (*Pbb*). Abreviaturas: dc-STX=decarbamoil saxitoxina, STX=Saxitoxina (grupo carbamoil), NeoSTX=Neosaxitoxina (grupo carbamoil), GTX1, GTX4 Gonyautoxina 1, Gonyautoxina 4 (grupo carbamoil), GTX5, GTX6=Gonyautoxina5, Gonyautoxina 6 (grupo N-sulfodecarbamoil), C1-C4 (grupo N-sulfcarbamoil). Las toxinas marcadas con \* son las más potentes. Los símbolos indican: (-) Ausencia de toxina, (+) Bajo porcentaje de toxina >50% y (++) Alto porcentaje de toxina <50%.

| Toxinas PSP/var.-procedencia-referencia   | dc-STX | STX* | NeoSTX* | GTX1* | GTX 2 | GTX3 | GTX4* | GTX5 (B1) | GTX6 | C1-C4 |
|---|--------|------|---------|-------|-------|------|-------|-----------|------|-------|
| <i>Pbc</i>  |        |      |         |       |       |      |       |           |      |       |
| Malasia<br>Usup et al. (1994)   | +      | +    | ++      | -     | -     | -    | -     | ++        | +    | -     |
| Indopacific populations<br>Hummert et al. (1997), Montojo et al. (2006), Gedaria et al. (2007). | +      | +    | +       | -     | -     | -    | -     | +         | +    | -     |
| Guatemala (Rosales-Loessener, 1989b)  |        | +    | +       | -     | +     | +    | +     | -         | -    | -     |
| México (Acapulco)<br>Gárate-Lizárraga et al. (2012)   |        | ++   | ++      | -     | -     | +    |       | +         | +    | +     |
| <i>Pbb</i>  |        |      |         |       |       |      |       |           |      |       |
| Florida Indian River Lagoon (Landsberg et al., 2006)  | +      | +    | -       | -     | -     | -    | -     | +         | -    | -     |

concentración de toxinas ocurre en la fase de crecimiento exponencial de la población. En cultivos de *Pyrodinium*, el contenido de toxina aumentó al disminuir la temperatura (de 8 a 22 °C) y la salinidad (de 24 a 20 g/kg), y disminuyó considerablemente al disminuir la intensidad luminosa de 90 a 15  $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ . Dado lo anterior, sugerimos realizar estudios más profundos que permitan explicar cómo puede ser que poblaciones de *P. bahamense* var. *bahamense*, que no solían expresar toxicidad en su ambiente, lo hagan de manera espontánea. Dichos estudios proporcionarían evidencia sólida para determinar las condiciones bajo las cuales se expresa la toxicidad en las poblaciones de una u otra variedad, sin que esto represente un criterio decisivo en el reconocimiento de su independencia taxonómica. Al ser individuos de la misma especie, ambas serían potencialmente tóxicas, aunque no siempre lo expresarán, según el ambiente, como el caso de *P. bahamense* var. *bahamense* en el Atlántico.

Todas las secuencias utilizadas en la presente contribución ya han sido publicadas en los trabajos de Mertens et al. (2015) y Cusick et al. (2016); en sus análisis filogenéticos claramente se observa una diferenciación genética entre las variedades *bahamense* y *compressum*. Sin embargo, dichos autores desconocen la validez taxonómica de estas

variedades, pues discuten que existe solo una ligera variación genética entre ellas.

En los resultados que mostraron nuestras redes de parsimonia estadística, utilizando los tres marcadores (*Lcf*, LSU y SSU), fue siempre consistente y evidente una estructuración genética completa entre las dos variedades. Las secuencias de *P. bahamense* var. *bahamense* siempre se agruparon en una red, o incluso en dos redes independientes con el marcador *Lcf*; mientras que las secuencias de la var. *compressum*, siempre formaron otra red, igualmente independiente. Asimismo, la correspondencia de los haplotipos y ribotipos resultantes con los tres marcadores fue siempre la misma. Es decir que, en las tres redes estadísticas, las muestras del Océano Indo-Pacífico siempre se colocaron en un grupo diferente al de las del Atlántico occidental; no hubo interconexión. Particularmente, la diferencia de bases entre ambas variedades fue muy superior a lo esperado con SSU, lo cual se suma al hecho de que tradicionalmente los marcadores nucleares suelen ser altamente polimórficos y no permiten realizar hipótesis filogenéticas certeras (Saunders, 2005). Contrariamente el marcador LSU, a pesar de ser nuclear, resultó ser muy poco polimórfico y conservado para este género. No obstante, aunque los dos grupos de variedades estuvieron interconectados en la



red, se observó una distancia genética notable entre ellos (cinco pasos mutacionales), lo que sugiere también un aislamiento reproductivo. Para *Lcf*, la red de parsimonia estadística mostró tres estructuras genéticas representadas en tres redes o clados independientes: dos correspondientes a las poblaciones del Atlántico occidental y una correspondiente con las del Indo-Pacífico. Este resultado igualmente sugiere que al interior de las poblaciones del Atlántico occidental, particularmente en las de River Lagoon, Florida, podría haber una tercera variedad involucrada dentro del espectro morfológico atribuido a la variedad *P. bahamense* var. *bahamense*, aún subestimada.

Los análisis filogenéticos, en concordancia, también mostraron la misma estructura que las redes de parsimonia, donde las secuencias del Indo-Pacífico formaron un grupo monofilético, independiente del clado conformado por las secuencias del Atlántico occidental, lo que implica una diferencia biogeográfica importante entre las variedades. Dado que se realizó un análisis concatenado con los tres marcadores utilizados en nuestro análisis, la filogenia también evidenció una tercera estructura genética al interior de las poblaciones de *P. bahamense*, hasta ahora no detectada con los marcadores SSU y LSU en estudios anteriores; sino que fue expuesta hasta los análisis filogenéticos realizados con *Lcf* (Cusick et al., 2016). Esto responde en gran parte al hecho de que los marcadores moleculares utilizados hasta ahora en la construcción de hipótesis filogenéticas, con SSU y LSU, no son específicos para dinoflagelados, sino que son universales para estudios con eucariontes en general (Scholin et al., 1994; Matsuoka et al., 2006). Por esta razón, las distancias genéticas detectadas a nivel interespecífico entre diversos géneros de dinoflagelados es tan corta que, en muchos casos, no resuelve concretamente las relaciones filogenéticas entre especies. Sin embargo, marcadores más específicos y menos conservados o degenerados, como *Lcf*, permitirán detectar cambios evolutivos más recientes, lo que a su vez resolvería de manera más robusta la filogenia. Particularmente para *P. bahamense*, el conjunto de análisis que presentamos, concretamente la presencia de esta tercera estructura con *Lcf*, deja en claro la ausencia de flujo genético entre las dos variedades, por lo que al estar aisladas reproductivamente se sustenta su independencia y validez taxonómica. Incluso la diferencia genética entre

ellas, en cuanto al número de sitios polimórficos o variables, mostrada con los marcadores *Lcf* (38 bp) y SSU (288 bp), sugiere que esta estructura puede corresponder a especies distintas dentro del género *Pyrodinium*. Esta posibilidad revela la necesidad de realizar un estudio morfológico, molecular y ecológico más amplio, en el que se incluyan además secuencias de poblaciones del Pacífico tropical mexicano y Centro América, y del Golfo de México y el resto del Caribe ya que, hasta ahora, los estudios moleculares involucran solo organismos de Florida, Puerto Rico, Jamaica y del Indo-Pacífico. Si bien no existen caracteres morfológicos que permitan discriminar entre la var. *compressum* y la var. *bahamense*, los límites de distribución de las entidades genéticas reconocidas y, en consecuencia, los factores ecológicos asociados a esta distribución, sí las discriminan. Por lo tanto, rechazamos la existencia de un complejo ente ambas variedades. Es importante hacer énfasis en que, si existiera un complejo, este estaría al interior de las poblaciones de *P. bahamense* var. *bahamense*, que comparten distribución y condiciones ambientales en el Atlántico. Sin embargo, las poblaciones de *P. bahamense* var. *compressum* se encuentran claramente fuera de dicho complejo ya que, aunque filogenéticamente estén emparentadas (porque son variedades de una especie o posiblemente de tres especies de un mismo género), no están interconectadas genéticamente. Consecuentemente, es importante describir a fondo esta tercera estructura genética en un estudio posterior, debido a que de momento no contamos con más información que las tres secuencias moleculares disponibles en GenBank (2020), por lo que no podemos describirla o establecerla como tercera variedad o especie de *Pyrodinium*.

En conclusión, tanto las redes haplotípicas como los análisis filogenéticos mostraron la ausencia de flujo genético entre las dos variedades de *Pyrodinium* (var. *bahamense* y var. *compressum*), por lo que, al estar aisladas reproductivamente, se sustenta su validez taxonómica, cumpliendo con el concepto biológico de especie (Mayr, 1942). A pesar de que se ha reportado la coocurrencia de ambas, como hemos discutido anteriormente, no existe evidencia de que la variedad tóxica que se reportó en Florida corresponda morfológicamente con var. *compressum* o var. *bahamense*, ya que además se ha reportado traslape de caracteres morfológicos diagnósticos entre ambas (Meave del Castillo

et al., 2019). Por otro lado, nuestros resultados genéticos proporcionan evidencia sobre la posibilidad de que, al interior de *Pyrodinium* (género monoespecífico), existan al menos dos especies, en vez de variedades. Dado lo anterior, proponemos la validez e independencia taxonómica de *P. bahamense* var. *compressum* y var. *bahamense*, cuyo sustento no solo es genético, sino ecológico y biogeográfico, aunque no morfológico. Adicionalmente, no solo es necesario realizar estudios más integrales entre todos los enfoques biológicos (ecológico, biogeográfico, taxonómico, evolutivo y fisiológico), que permitan encontrar caracteres más robustos que delimiten a estas variedades u otras especies en conflicto, sino también aceptar la evidencia proporcionada por los genes, aunque esta no empate con la morfología. En la actualidad, el criterio morfológico prevalece, erróneamente, sobre la evidencia molecular en la toma de decisiones taxonómicas, lo que se ve plasmado en un sistema de clasificación artificial e inestable, que hasta ahora no refleja la historia evolutiva ni las relaciones filogenéticas entre las especies de fitoplancton. Tal es el caso del género *Alexandrium*, que en todos las filogenias no es monofilético (Scholin et al., 1994; Cusick et al., 2016), por lo que la sistemática de todo este grupo debe ser reevaluada. En la toma de decisiones taxonómicas, lo que se ve plasmado en un sistema de clasificación artificial e inestable, que hasta ahora no refleja la historia evolutiva ni las relaciones filogenéticas entre las especies.

## Contribución de autores

MEZR y MEMC concibieron y diseñaron el estudio y preguntas de investigación. MLNR y AJEB realizaron la integración de las bases de datos, los análisis e interpretación de los resultados. Todos los autores contribuyeron con la redacción, discusión, revisión y aprobación del manuscrito final.

## Financiamiento

Este estudio fue apoyado por los proyectos HJ014 y KT020 de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

## Agradecimientos

A los revisores anónimos por su importante contribución para mejorar el manuscrito.

## Literatura citada

- Alonso-Rodríguez, R., D. U. Hernández-Becerril e I. Gárate-Lizárraga. 2008. Catálogo de microalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Sinaloa, México. 198 pp.
- Balech, E. 1985. A revision of *Pyrodinium bahamense* Plate (Dinoflagellata). Review of Palaeobotany and Palynology 45(1-2): 17-34. DOI: [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(85\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0034-6667(85)90063-6)
- Böhm, A. 1931. Peridineen aus dem Persischen Golf und dem Golf von Oman. Archiv für Protistenkunde 74: 188-197.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9(10): 1657-1659. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cortés-Altamirano, R., L. Muñoz-Cabrera y O. Sotomayor-Navarro. 1993. Envenenamiento Paralítico por Mariscos (PSP) causado por el dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en la costa suroeste de México. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología 20(1): 43-54.
- Cusick, K. D., S. W. Wilhelm, P. E. Hargraves y G. S. Saylor. 2016. Single-cell PCR of the luciferase conserved catalytic domain reveals a unique cluster in the toxic bioluminescent dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. Aquatic Biology 25: 139-150. DOI: <https://doi.org/10.3354/ab00664>
- Gárate-Lizárraga, I. y R. González-Armas. 2011. Occurrence of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* along the southern coast of the Baja California Peninsula. Marine Pollution Bulletin 62(3): 626-630. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.009>
- Gárate-Lizárraga, I., B. Pérez-Cruz, J. A. Díaz-Ortiz, M. Alarcón-Tacuba, L. A. Chávez-Almazán, M. A. Alarcón-Romero, S. López-Silva, J. J. Bustillos-Guzmán y S. Licea-Durán. 2012. Toxicity and paralytic toxin profile in *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* and violet oyster in Bahía de Acapulco, Guerrero, Mexico. Harmful Algae News 45: 2-3.
- Gedaria, A. I., B. Luckas, K. Reinhardt y R. V. Azanza. 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. Toxicon 50(4): 518-529. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.021>



- GenBank. 2020. National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (consultado diciembre de 2020).
- Gómez-Aguirre, S. y S. Licea. 1998. Blooms of *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean. In: Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández y T. Wyatt (eds.). Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Vigo, España. Pp. 61-62.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41: 95-98.
- Hallegraeff, G. M. y J. L. Maclean. 1989. Preface. In: Hallegraeff, G. M. y J. L. Maclean (eds.). Biology, epidemiology, and management of *Pyrodinium* red tides. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam and International Center from Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines. Pp. 8-10.
- Hernández-Rosas, A., M. E. Meave del Castillo, J. Díaz-Larrea y F. Rodríguez. 2018. Single-cell PCR amplification of thecate dinoflagellates: a case study of *Tripos* (Dinophyceae). Journal of Applied Phycology 30: 1117-1124. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10811-017-1269-1>
- Hummert, C., M. Ritscher, R. Reinhardt y B. Luckas. 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. Chromatographia 45: 312-316.
- Kamikawa, R., H. Nishimura y Y. Sako. 2009. Analysis of the mitochondrial genome, transcripts, and electron transport activity in the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Gonyaulacales, Dinophyceae). Phycological Research 57(1): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00511.x>
- Kuno, S., R. Kamikawa, S. Yoshimatsu, T. Sagara, S. Nishio y Y. Sako. 2010. Genetic diversity of *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae) in Japanese coastal areas. Phycological Research 58(1): 44-52. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00557.x>
- Landsberg, J. H., S. Hall, J. N. Johannessen, K. D. White, S. M. Conrad, J. P. Abbott, L. J. Flewelling, R. W. Richardson, R. W. Dickey, E. L. E. Jester, S. M. Etheridge, J. R. Deeds, F. M. Van Dolah, T. A. Leighfield, Y. Zou, C. G. Beaudry, R. A. Benner, P. L. Rogers, P. S. Scott, K. Kawabata, J. L. Wolny y K. A. Steidinger. 2006. Saxitoxin Puffer Fish Poisoning in the United States, with the First Report of *Pyrodinium bahamense* as the Putative Toxin Source. Environmental Health Perspectives 114(10): 1502-1507. DOI: <http://doi.org/10.1289/ehp.8998>
- Leaw, C. P., P. T. Lim, B. K. Ng, M. Y. Cheah, A. Ahmad y G. Usup. 2005. Phylogenetic analysis of *Alexandrium* species and *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) based on theca morphology and nuclear ribosomal gene sequence. Phycologia 44: 550-565.
- Lewitus, A., S. Bargu, M. Byrd, C. Dorsey, L. Flewelling, A. Flowers, C. Heil, C. Kovach, V. Lovko y K. Steidinger. 2014. Resource guide for harmful algal bloom toxin sampling and analysis. White Paper from the Gulf of Mexico Alliance, Water quality priority issue team, Harmful algal blooms workgroup. Florida, USA. 45 pp.
- Litaker, R. W., M. W. Vandersea, M. A. Faust, S. R. Kibler, M. Chinain, M. J. Holmes, W. C. Holland y P. A. Tester. 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). Phycologia 48(5): 344-390. DOI: <https://doi.org/10.2216/07-15.1>
- Maclean, J. L. 1989. Red tides in Papua New Guinea Waters. In: Hallegraeff, G. M. y J. L. Maclean (eds.). Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium* red tides. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam and International Center from Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines. Pp. 27-38.
- Martínez-López, A., A. E. Ulloa-Pérez y D. C. Escobedo-Urías. 2007. First record of vegetative cells of *Pyrodinium bahamense* (Gonyaulacales Goniodomataceae) in the Gulf of California. Pacific Science 61(2): 289-293. DOI: [https://doi.org/10.2984/1534-6188\(2007\)61\[289:FROVCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2984/1534-6188(2007)61[289:FROVCO]2.0.CO;2)
- Matsuoka, K., H. Kawami, R. Fuji y M. Iwataki. 2006. Further examination of the cyst-theca relationship of *Protoperidinium thulesense* (Peridinales, Dinophyceae) and the phylogenetic significance of round brows cysts. Phycologia 45(6): 632-641. DOI: <https://doi.org/10.2216/05-42.1>



- Matzenahuer, L. 1933. Die Dinoflagellaten des Indischen Ozeans. (Mit Ausnahme der Gattung *Ceratium*). Botanisches Archiv 35: 437-510.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press. New York, USA. Pp. 289-290.
- Meave del Castillo, M. E., M. E. Zamudio-Resendiz, M. A. Castillo-Rivera, F. Gutiérrez-Mendieta, F. Varona-Cordero y H. Hernández-Cárdenas. 2019. Co-ocurrencia de dos dinoflagelados tóxicos en la Bahía de Acapulco, Guerrero, México: una oportunidad para cuantificar su biología y ecología. Acta Botanica Mexicana 127: e1559. DOI: <http://doi.org/10.21829/abm127.2020.1559>
- Mertens, K. N., J. Wolny, C. Carbonell-Moore, K. Bogus, M. Ellegaard, A. Limoges, A. de Vernal, P. Gurdebeke, T. Omura, A. Al-Muftah y K. Matsuoka. 2015. Taxonomic re-examination of the toxic armored dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Plate 1906: Can morphology or LSU sequencing separate *P. bahamense* var. *compressum* from var. *bahamense*? Harmful Algae 41: 1-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.09.010>
- Milne, I., D. Lindner, M. Bayer, D. Husmeier, G. McGuire, D. F. Marshall y F. Wright. 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. Bioinformatics 25(1): 126-127. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn575>
- Miranda, L. N., Y. Zhuang, H. Zhang y S. Lin. 2012. Phylogenetic analysis guided by intragenomic SSU rDNA polymorphism refines classification of "*Alexandrium tamarense*" species complex. Harmful Algae 16: 35-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.01.002>
- Montojo, U. M., S. Sakamoto, M. F. Cayme, N. C. Gatdula, E. F. Furio, J. R. Relox, S. Sato, Y. Fukuyo y M. Kodama. 2006. Remarkable difference in accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins among bivalve species exposed to *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* bloom in Masinloc bay, Philippines. Toxicon 48(1): 85-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.014>
- Morquecho, L. 2008. Morphology of *Pyrodinium bahamense* Plate (Dinoflagellata) near Isla San José, Gulf of California, Mexico. Harmful Algae 7(5): 664-670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.02.003>
- Morquecho, L. 2019. *Pyrodinium bahamense* one the most significant harmful dinoflagellate in Mexico. Frontiers in Marine Science 6: 1. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00001>
- Phlips, E. J., S. Badylak, E. Bledsoe y M. Cichra. 2006. Factors affecting the distribution of *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* in coastal waters of Florida. Marine Ecology Progress Series 322: 99-115. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps322099>
- Plate, L. 1906. *Pyrodinium bahamense* n. g., n. sp. die Leucht-Peridinee des "Feuersees" von Nassau, Bahamas. Archiv für Protistenkunde 7: 411-442.
- Rhodes, L., K. F. Smith, A. Verma, B. G. Curley, D. T. Harwood, S. Murray, G. S. Kohli, D. Solomona, T. Rongo, R. Munday y S. A. Murray. 2017. A new species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae) from the south-west Pacific: *Gambierdiscus honu* sp. nov. Harmful Algae 65: 61-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.010>
- Richlen, M. L., S. L. Morton, P. H. Barber y P. S. Lobel. 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). Harmful Algae 7(5): 614-629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.020>
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard y J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematics Biology 61(3): 539-542. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rosales-Loessener, F. 1989a. The Guatemala experience with red tides and paralytic shellfish poisoning. In: Hallegraeff, G. M. y J. L. Malean (eds.). Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium* red tides. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei and International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines. Pp. 49-51.
- Rosales-Loessener, F. 1989b. Management of red tides and paralytic shellfish poisoning in Guatemala. In: Hallegraeff, G. M. y J. L. Malean (eds.). Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium* red tides. Fisheries Department Ministry of Development, Brunei and International Center for Living Aquatic Resources



- Management. Manila, Philippines. Pp. 153-154.
- Saunders, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B* 360: 1879-1888. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1719>
- Schiller, J. 1937. Dinoflagellate. In: Rabenhorst, L. (ed.). *Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, 10(3). Akademie Verlag, Leipzig, Germany. 589 pp.
- Scholin, C. A., M. Herzog, M. Sogin y D. M. Anderson. 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(6): 999-1011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x>
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688-2690. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Steidinger, K. A., L. S. Tester y F. J. R. Taylor. 1980. A redescription of *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* (Böhm) stat. nov. from Pacific red tides. *Phycologia* 19(4): 329-334. DOI: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-19-4-329.1>
- Usup, G., D. Kulis y D. M. Anderson. 1994. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Natural Toxins* 2(5): 254-262. DOI: <https://doi.org/10.1002/nt.2620020503>
- Usup, G., A. Ahmad, K. Matsuoka, P. T. Lim y C. P. Leaw. 2012. Biology, ecology and bloom dynamics of the toxic marine dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. *Harmful Algae* 14: 301-312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.026>
- Uwe, J., R. W. Litaker, M. Montresor, S. Murray, M. L. Brosnahan y D. M. Anderson. 2014. Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: The introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 165(6): 779-804. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.10.001>
- Vargas-Montero, M. y E. Freer. 2003. Co-occurrence of different morphotypes of *Pyrodinium bahamense* during an extensive bloom in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. In: Villalba, A., B. Reguera, J. Romalde y R. Beiras, (eds.). *Molluscan Shellfish Safety*. Intergovernmental Oceanographic Commission, United Nations Educational, Scientific Cultural Organization. Galicia, España. Pp. 211-217.



**Apéndice 1:** Posiciones variables en secuencias de ADN alineadas del marcador *Lcf* en *Pyrodicticum bahamense* Plate. El haplotipo de *P. bahamense* var. *compressum* (Böhm) Steidinger, Tester & Taylor se indica en negritas; de manera contraria, se indican los haplotipos de *P. bahamense* var. *bahamense* Plate (ver Fig. 2 para la red de haplotipos).

| Haplotipos/sitios | 6 | 10 | 12 | 13 | 15 | 16 | 17 | 18 | 20 | 25 | 27 | 44 | 52 | 67 | 72 | 82 | 85 | 103 | 134 | 140 | 146 | 147 | 155 | 156 | 172 | 174 | 176 | 182 | 192 | 210 | 223 | 226 | 228 | 264 | 279 | 280 | 281 | 289 |   |
|-------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| A1                | A | A  | G  | C  | G  | G  | A  | T  | A  | C  | C  | T  | G  | G  | T  | T  | T  | C   | A   | T   | A   | T   | T   | T   | T   | T   | G   | T   | A   | G   | C   | T   | A   | T   | C   | G   | T   | A   |   |
| A2                | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | C  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |
| A3                | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | T  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | T   | -   | -   | -   |   |
| A4                | - | -  | -  | T  | -  | -  | -  | C  | -  | -  | -  | -  | T  | -  | C  | -  | C  | -   | -   | G   | G   | C   | -   | -   | -   | C   | T   | -   | G   | C   | -   | C   | G   | G   | -   | -   | -   | C   |   |
| A5                | - | T  | -  | A  | -  | -  | -  | T  | -  | -  | T  | -  | G  | -  | T  | -  | T  | -   | -   | T   | A   | T   | -   | -   | -   | T   | G   | -   | A   | G   | -   | T   | A   | T   | C   | -   | -   | A   |   |
| A6                | - | A  | -  | T  | -  | -  | -  | C  | -  | -  | C  | -  | T  | T  | C  | -  | C  | -   | -   | G   | G   | C   | -   | -   | -   | C   | T   | -   | G   | C   | -   | C   | G   | G   | T   | -   | -   | C   |   |
| A7                | - | -  | -  | C  | -  | -  | -  | T  | -  | -  | -  | -  | G  | G  | T  | -  | T  | -   | -   | T   | A   | T   | -   | -   | -   | T   | G   | C   | A   | G   | -   | T   | A   | T   | -   | -   | -   | A   |   |
| A8                | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | C  | T  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | G   | -   | -   | v   | -   | -   | -   | -   | -   | T   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | C   | -   | -   |   |
| A9                | G | -  | -  | T  | -  | -  | -  | C  | A  | C  | -  | -  | T  | -  | C  | -  | C  | -   | A   | G   | G   | C   | -   | -   | -   | C   | T   | -   | G   | C   | -   | C   | G   | G   | T   | -   | -   | C   |   |
| A10               | A | -  | -  | C  | -  | -  | G  | T  | -  | -  | -  | -  | G  | -  | T  | -  | T  | -   | -   | T   | A   | T   | -   | -   | -   | T   | G   | -   | A   | G   | -   | T   | A   | T   | -   | -   | -   | A   |   |
| A11               | - | -  | -  | T  | -  | -  | A  | C  | -  | -  | -  | -  | T  | -  | C  | -  | C  | -   | -   | G   | G   | C   | -   | -   | -   | C   | T   | -   | G   | C   | -   | C   | G   | G   | -   | -   | C   | C   |   |
| A12               | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | A   | T   | -   |   |
| <b>A13</b>        | - | -  | T  | -  | T  | T  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | G  | -  | T  | G  | T  | G   | -   | -   | -   | -   | A   | A   | C   | -   | -   | -   | -   | -   | G   | T   | T   | -   | -   | C   | G   | C   | A |



**Apéndice 2:** Datos de las secuencias de *Pyrodinium bahamense* Plate utilizadas en el presente estudio, separadas por marcador molecular, con datos de recolección y números de acceso de GenBank (2020). Junto a cada número de acceso, se especifica el haplotipo o ribotipo al que perteneció cada secuencia para cada marcador molecular. \* indica que para esa secuencia no hubo datos de colecta disponibles.

| Región                                 | Datos de colecta (localidad; fecha de colecta)   | Lcf         | LSU         | SSU          |
|--|--|-------------|-------------|--------------|
| Atlántico oeste                        | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Banana River, VIII.2012.                              | KX377142-A1 | AB970713-B3 | KX377182-C1  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Indian River VIII.2012; Banana River, VI.2012         | KX377143-A1 | AB970714-B3 | KX377184-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, IX.2012; Indian River VIII.2012; Banana River, VI.2012.          | KX377148-A1 | AB970715-B3 | KX377185-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, IX.2012; Banana River VI.2012; Jamaica, Oyster Bay, XII.2014.    | KX377149-A1 | AB970716-B3 | KX377188-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, XII.2012; Banana River, XI.2012; Jamaica: Oyster Bay, XII.2014.  | KX377151-A1 | AB970717-B3 | KX377190-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, IX.2012; Banana River, VI.2012; Jamaica: Oyster Bay, XII.2014.   | KX377152-A1 | AB970718-B3 | KX377192-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, IX.2012; Indian River, VIII.2012; Jamaica: Oyster Bay, XII.2014. | KX377153-A1 | AB970719-B3 | KX377193-C1  |
|  | EUA: Florida, Banana River, IX.2012; Banana River, IX2012; Jamaica: Oyster Bay, XII.2014.    | KX377154-A1 | AB970720-B3 | KX377195-C1  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XI.2012; Mosquito Bay, XI.2012; Jamaica: Oyster Bay, XII.2014.   | KX377157-A1 | AB970721-B3 | KX377196-C1  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XII.2012.  | KX377159-A1 |             | KX377197-C1  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XII.2012.  | KX377160-A1 |             | KX377198-C1  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XII.2012.  | KX377161-A1 |             | KX377199-C1  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII,2012; Mosquito Bay, XII.2012.                               | KX377165-A1 |             | KX377200-C1  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2013; Mosquito Bay, XII.2012.                               | KX377168-A1 |             | KX377201-C1  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XI.2012; Mosquito Bay, XII.2012.                                 | KX377156-A2 |             | KX377202-C1  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012.   | KX377141-A3 |             | KX377180-C2  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Banana River, VI.2012                                 | KX377146-A4 |             | KX377189-C3  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Banana River, VI.2012.                                | KX377146-A4 |             | KX377183-C4  |
|  | EUA: Florida, Indian River, VIII.2013; Banana River, VII.2008.                               | KX377169-A4 |             | KX377178-C5  |
|  | EUA: Florida, Indian River, VIII.2013; Banana River, VIII.2008.                              | KX377171-A4 |             | KX377181-C6  |
|  | EUA: Florida, Indian River, VIII.2013; Banana River VI.2012.                                 | KX377170-A5 |             | KX377186-C7  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII, 2013; Banana River, VII.2008.                              | KX377166-A6 |             | KX377179-C8  |
|  | EUA: Florida, Mosquito Bay, XI.2012; Mosquito Bay, XII.2012.                                 | KX377155-A7 |             | KX377203-C9  |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VII.2012; Indian River, VIII.2012.                               | KX377133-A8 |             | KX377194-C10 |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Banana River, VI.2012.                                | KX377135-A9 |             | KX377187-C11 |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012; Banana River, VI.2012.                                | KX377136-A9 |             | KX377191-C12 |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VI.2012.   | KX377137-A9 |             |              |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VI.2012.   | KX377138-A9 |             |              |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VI.2012.   | KX377139-A9 |             |              |
|  | EUA: Florida, River Lagoon, VI.2012.   | KX377140-A9 |             |              |
| EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012. | KX377144-A9  |             |             |              |
| EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012. | KX377145-A9  |             |             |              |





## Apéndice 2: Continuación.

|               |  |                     |              |               |
|---------------|--|---------------------|--------------|---------------|
|               | EUA: Florida, Mosquito Bay, XII.2012.  | KX377158-A9         |              |               |
|               | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2013.   | KX377163-A9         |              |               |
|               | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2013.   | KX377167-A9         |              |               |
|               | EUA: Florida, River Lagoon; VIII.2012.   | KX377147-A10        |              |               |
|               | EUA: Florida, Banana River, IX.2012.   | KX377150-A10        |              |               |
|               | EUA: Florida, Mosquito Bay, XII.2012.  | KX377162-A11        |              |               |
|               | EUA: Florida, River Lagoon, VIII.2012.   | KX377134-A12        |              |               |
| Indo-Pacífico | Malasia: Sabah, Kinarut, Kota, Kinabalu, VIII.2006.                                      | YG0YLCR01CHNN6W-A13 | AB936754-B1  | DQ500119-C13  |
|               | Filipinas: Masinloc Bay, III.1996; Malasia: Sabah, Kota Belud, Kota Kinabalu, VIII.2006. | YG0YLCR01BOJTU-A13  | AB936755-B1  | DQ500120-C13  |
|               | Filipinas: Palawan, III.2001; Malasia: Sabah, Gaya Bay, VIII.2006.                       | YG0YLCR01CHNN6W-A13 | AB936756-B1  | DQ500121-C13  |
|               | Malasia: Sabah, Gaya Bay, VIII.2006.   | -                   | AY566191-B1  | DQ500122-C13  |
|               | Malasia: Sabah, Gaya Bay, VIII.2006.   |                     | AY566192*-B1 | DQ500123-C13  |
|               |  |                     | AY154959*-B2 | GU186374*-C13 |
|               |  |                     |              | GU186377*-C13 |
|               |  |                     |              | GU186378*-C13 |
|               |  |                     |              | GU186378*-C14 |
|               |  |                     |              | GU186375*-C15 |
|               |  |                     |              | GU186376*-C15 |



**Apéndice 3:** Secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank (2020), utilizadas en los análisis filogenéticos de los genes *Lcf*, LSU y SSU. El guion (-) indica que no hubo secuencia disponible para la especie.

| Taxa  | <i>Lcf</i>      | LSU      | SSU      |
|---|-----------------|----------|----------|
| <i>Alexandrium affine</i> (H. Inoue & Y. Fukuyo) Balech   | AY766382        | JF521618 | DQ171879 |
| <i>A. andersonii</i> Balech   | -               | KF034857 | KF925334 |
| <i>A. catenella</i> (Whedon & Kofoid) Balech  | -               | KJ127898 | KF908796 |
| <i>A. cohorticula</i> (Balech) Balech   | -               | AF174614 | AF113935 |
| <i>A. hiranoi</i> Kita & Fukuyo   | -               | AY438018 | LC056070 |
| <i>A. insuetum</i> Balech   | -               | JF521630 | JF521630 |
| <i>A. margalefii</i> Balech   | -               | AF033531 | U27498   |
| <i>A. minutum</i> Halim   | -               | AY962851 | AY883006 |
| <i>A. ostefeldii</i> (Paulsen) Balech & Tangen  | -               | AB753842 | U27500   |
| <i>A. pseudogonyaulax</i> (Biecheler) Horiguchi ex K. Yuki & Y. Fukuyo                          | -               | JF521638 | JF521638 |
| <i>A. tamarense</i> (Lebour) Balech   | AY766383        | KF018283 | AY883004 |
| <i>A. tamiyavanichii</i> Balech   | -               | AB607261 | JQ692035 |
| <i>A. taylorii</i> Balech   | -               | AY438018 | AJ535385 |
| <i>Ceratocorys horrida</i> Stein  | JN995230        | -        | AF022154 |
| <i>Gonyaulax elongata</i> (Reid) Ellegaard, Daugbjerg, Rochon, J. Lewis & Harding               | -               | AY154964 | KU358950 |
| <i>G. polygramma</i> F. Stein   | -               | DQ162802 | AY775287 |
| <i>Hematodinium perezii</i> Chatton & Poisson   |                 | JN641989 | EF065717 |
| <i>Protoceratium reticulatum</i> (Claparède & Lachmann) Bütschli                                | AY766386        | FJ155820 | AB727655 |
| <i>Pyrodictinium bahamense</i> L. Plate   | KX377142        | AB970713 | KX377182 |
|   | KX377143        | AB970714 | KX377184 |
|   | KX377148        | AB970716 | KX377192 |
|   | KX377137        | -        | KX377191 |
| <i>Pyrodictinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> (Böhm) Steidinger, Tester & F.J.R. Taylor | YG0YLCR01CHNN6W | AY566191 | DQ500119 |
|   | YG0YLCR01B0JTU  | AY566192 | DQ500120 |
|   | -               | AB936754 | DQ500121 |
| <i>Tripos fusus</i> (Ehrenberg) F. Gómez  | -               | AF260390 | AF022153 |

