

Biodiversidad de *Gambierdiscus* en Canarias y su relación con la tropicalización

Isabel Bravo y Francisco Rodriguez

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo. Subida Radio Faro,
50, 36390 Vigo, Pontevedra

Informe nº 2

Proyecto: “Tropicalización y ciguatera en Canarias”

Actividad: “Identificación y cuantificación de *Gambierdiscus*, especies de dinoflagelados acompañantes y macroalgas en las muestras de Canarias por métodos de microscopía y secuenciación genética” (A2)



INTRODUCCIÓN

Actualmente existen numerosos trabajos que describen la aparición de especies de distribución típicamente tropical en zonas de transición biogeográfica más templadas como los archipiélagos macaronésicos en el Atlántico nororiental. Este proceso que se ha denominado tropicalización se ha asociado, en muchos casos, con el calentamiento global debido al cambio climático. Este fenómeno se explica porque las especies marinas desplazan sus distribuciones a latitudes más altas en respuesta al calentamiento de sus aguas. Hay trabajos que enfatizan que el cambio climático puede alterar profundamente las comunidades ecológicas y reconfigurar los ecosistemas, pudiendo causar impactos sociales y económicos importantes.

Gambierdiscus es un género de dinoflagelados bentónicos que produce ciguatoxinas, el agente causante de la enfermedad denominada ciguatera endémica en regiones tropicales y subtropicales como el Mar Caribe, las Islas Hawaianas, Australia, Sudeste Asiático y el Océano Índico. Algunas especies de dinoflagelados bentónicos nocivos de regiones tropicales y/o subtropicales como los pertenecientes al género *Gambierdiscus*, aparentemente han expandido su distribución en la última década hacia regiones templadas. Así se ha documentado la aparición de especies de *Gambierdiscus* en regiones subtropicales y templadas como las Islas Canarias, el Mar Mediterráneo, el Golfo de México y en el Océano Atlántico frente a la costa de Carolina del Norte (GEOHAB, 2012). El estudio de la distribución de estos organismos representa un aspecto clave en los estudios de algas nocivas en los últimos años por el peligro que supone para la salud humana. Así lo pone de manifiesto en la el Panel Internacional sobre FANs de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (http://hab.ioc-unesco.org/index.php?option=com_oe&task=viewDocumentRecord&docID=10751).

BIOGEOGRAFÍA DE GAMBIERDISCUS EN LAS ISLAS CANARIAS

1. Material y métodos

La metodología de muestreo, procesado de las macroalgas para la obtención de las muestras conteniendo las microalgas epifitas y el aislamiento de los *Gambierdiscus* para la obtención de cultivos se describe en el informe nº 1.

Los conteos de las concentraciones de *Gambierdiscus* se realizaron en las muestras de epifitas fijadas con formaldehído y teñidas con el fluorocromo “calcofluor” para poder distinguir bien las tecas fluorescentes de los *Gambierdiscus*. Los contajes se realizaron al microscopio invertido de epifluorescencia Axiovert 125 (Carl Zeiss AG, Alemania) preparado con un filtro de excitación UV. Además de las células de *Gambierdiscus* se realizaron contajes de los dinoflagelados acompañantes. La abundancia de microalgas se expresó como células por gramo de peso seco de la macrofitas, las cuales se pesaron una vez escurridas en papel de laboratorio.

La identificación por métodos moleculares se basó en los cultivos establecidos de las muestras de La Gomera y La Palma, o bien de células individuales directamente aisladas de las mismas. A continuación se amplificó y secuenció el DNA. Para la amplificación del DNA, primeramente se lavaron las células en gotas de agua destilada para eliminar el exceso de sales que puede interferir en los análisis. Posteriormente se realiza un choque térmico con tres pases por nitrógeno líquido para romper las células. A continuación se prepara la reacción de PCR para amplificar los fragmentos marcadores del gen LSUrRNA. Para ello se usan cebadores adecuados para el género *Gambierdiscus* (D1R/LSUB para la región D1-D3 y FD8/RB para D8-D10) con los que se han construido en los últimos años las filogenias moleculares para dichos organismos. Una vez comprobadas las reacciones de PCR positivas, los productos son purificados y enviados a secuenciar al C.A.C.T.I. (Universidade de Vigo). Las secuencias legibles son alineadas y se construyen las filogenias moleculares que permiten identificar las especies. No obstante, dadas las distancias genéticas entre especies de *Gambierdiscus*, es posible hacer una identificación previa mediante la herramienta BLAST disponible en la web NCBI, que aloja la base de datos genética GenBank.

2. Resultados

En la actualidad el trabajo publicado en 2017 por el grupo del IEO con título “Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity ‘hotspot’ of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area” es el primer y único estudio publicado de distribución de especies del género *Gambierdiscus* en las Islas Canarias. Posteriormente se describió un “bloom” de *G. caribaeus* en la isla de El Hierro y ya no existen más trabajos sobre este tema hasta el realizado en este proyecto en las islas de La Palma y La Gomera (resultados sombreados de la figura 1).

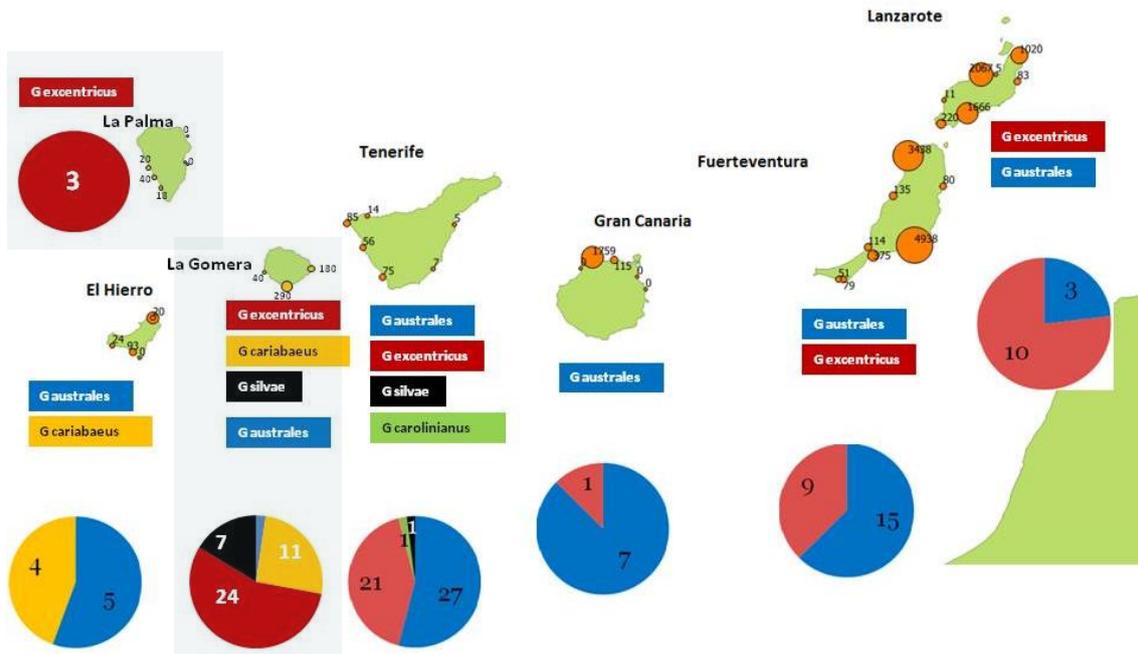


Figura 1. Los círculos y números en las costas de las islas muestran las concentraciones totales máximas de *Gambierdiscus* spp. (células·g⁻¹ peso escurrido de macrófita). Los círculos en la parte inferior indican el número de secuencias genéticas conseguidas para células individuales de *Gambierdiscus* de cada especie. Las especies están indicadas por los siguientes colores: *G. caribaeus* (amarillo), *G. australes* (azul), *G. carolinianus* (verde), *G. silvae* (negro), *G. excentricus* (castaño). (Datos de Rodríguez et al 2017 actualizados con los datos de este proyecto de La Gomera y La Palma, mostrados en recuadros sombreados)

En el presente proyecto se completó la distribución de las especies de *Gambierdiscus* en las siete islas principales del archipiélago. Para ello se muestrearon las islas de La Gomera y La Palma que no habían sido incluidas en estudios previos. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de las especies detectadas en cada una de las islas. Esta información corresponde a los datos previos (publicación Rodríguez y col. 2017) más los resultados obtenidos en este proyecto.

Los muestreos realizados en 2017 en La Palma y La Gomera arrojaron los siguientes resultados a partir de la secuenciación de LSUrDNA: de un total de 60 cepas aisladas (57 en La Gomera y 3 en La Palma) la amplia mayoría de cultivos pertenecieron a dos especies, *G. excentricus* y *G. caribaeus*. En la figura 2 se representan el total de cepas identificadas para las cuatro especies de *Gambierdiscus* detectadas en dichos muestreos. Sin embargo, estos datos no son trasladables a la hora de estudiar la distribución de especies debido a la diferente viabilidad a la hora del establecimiento de los cultivos de las diferentes especies (esto se trata en el Informe nº 3 del presente proyecto). Por otro lado, las únicas tres cepas aisladas en La Palma fueron identificadas como *G. excentricus*.

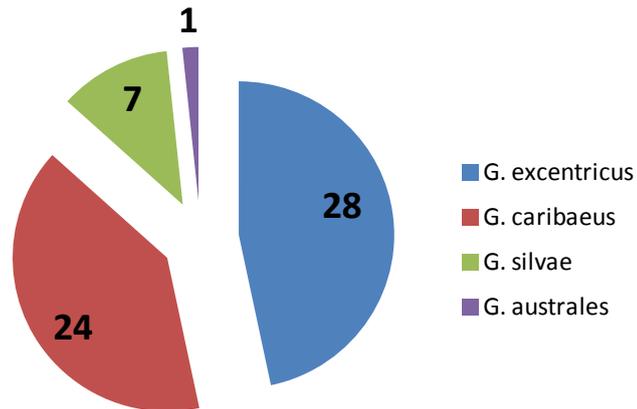


Figura 2. Número de cepas identificadas para las cuatro especies de *Gambierdiscus* representadas en los muestreos de 2017 en La Palma y La Gomera.

A continuación describimos la distribución geográfica de las cinco especies de *Gambierdiscus* encontradas hasta la fecha en las Islas Canarias. Estas descripciones incluyen los datos específicos de las islas Canarias (según Rodríguez y col. y los datos obtenidos en este proyecto). Dado el interés de relacionar esta distribución con la posible influencia de la tropicalización que están sufriendo las comunidades marinas en el archipiélago, además de su distribución en esta región, se ha recopilado toda la información de la biogeografía a nivel mundial encontrada en la bibliografía, es decir aquella en zonas tropicales y subtropicales, así como su expansión en zonas más templadas.

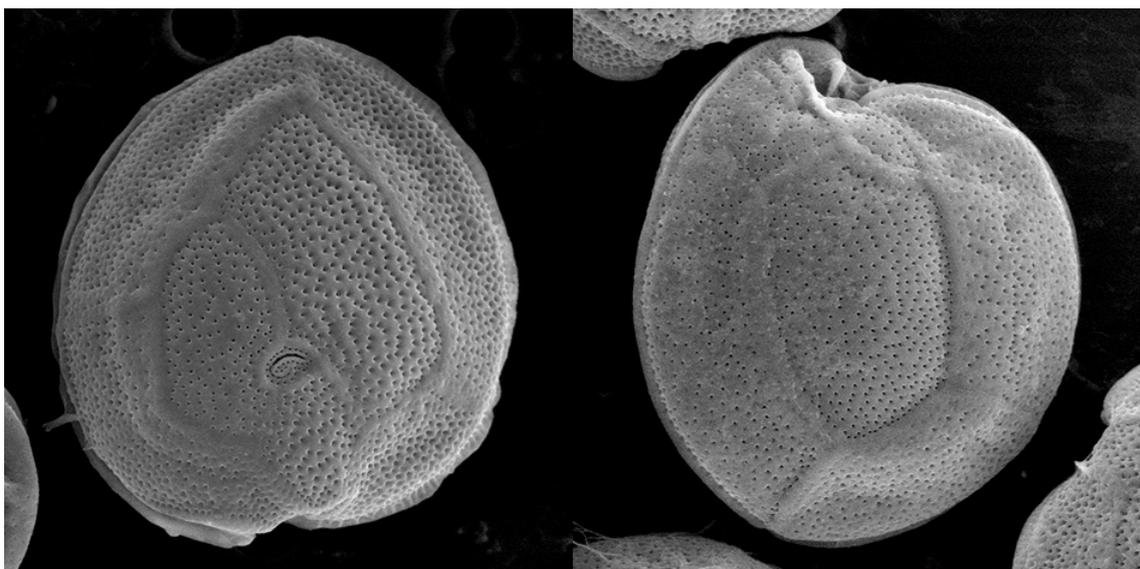


Figura 3. Fotografías de la epiteca (izquierda) y la hipoteca (derecha) de *G. australes* al microscopio electrónico de barrido. Células de la cepa VGO1161 aislada de las Islas Canarias.

Gambierdiscus australes

La especie *G. australes* fue originalmente descrita en 1999 por Chinain y colaboradores basándose en especímenes asociados a macroalgas (*Jania* sp y *Amphiroa* sp) de zonas de arrecife de coral en la isla de Raivavae (Polinesia Francesa). La distribución de esta especie se consideraba limitada al Océano Pacífico, sin embargo el trabajo de Chinain menciona también esta especie en Cayo Manatee (Belize, Mar del Caribe). Además está también en el Océano Índico entre las especies de *Gambierdiscus* documentadas para la costa de Pakistán (Mar de Arabia) y recientemente se ha detectado en las costas de las Islas Baleares (Mar Mediterráneo).

G. australes fue documentada por primera vez en las islas Canarias en muestras de epifitos recogidos de una mezcla de macroalgas de charcos de marea en Punta Hidalgo (Tenerife) y La Puntilla (Gran Canaria) por Fraga y Rodriguez en 2014. Estos autores citan también como acompañantes las especies *G. excentricus* y *G. silvae*.

En los estudios más recientes de distribución de especies de *Gambierdiscus* en las 7 islas del archipiélago canario (incluido este proyecto), *G. australes* es, junto con *G. excentricus*, una de las dos especies más abundantes en general en el archipiélago (Fig. 1). Sin embargo, existen diferencias entre islas como se observa en esa figura, por ejemplo cabe destacar que no se detectó en la isla de La Palma y en muy baja concentración en La Gomera.

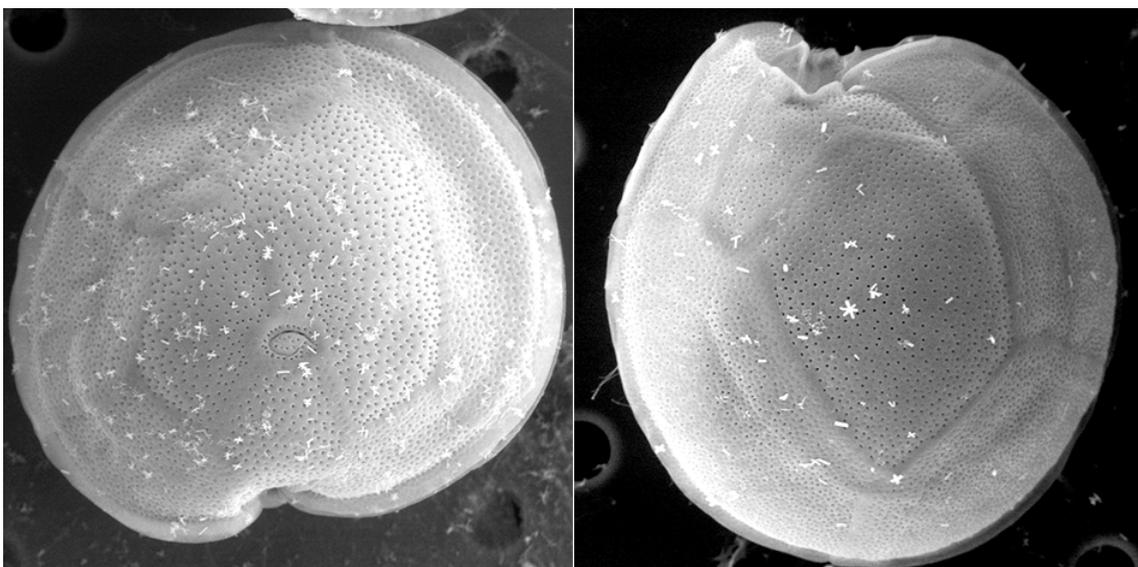


Figura 4. Fotografías de la epiteca (izquierda) y la hipoteca (derecha) de *G. caribaeus* al microscopio electrónico de barrido. Células de la cepa VGO1237 aislada de las Islas Canarias.

Gambierdiscus caribaeus

La especie *G. caribaeus* fue originalmente descrita por Litaker y colaboradores en 2009 basándose en especímenes de cultivos establecidos a partir de una muestra de agua recolectada en el Cayo Carrie Bow (Belize, Mar del Caribe). La distribución de esta especie se extiende a todo el Caribe incluida Florida (EEUU) y ha sido también documentada en las islas de Tahití (Polinesia Francesa) y Palaos (Micronesia) en el Océano Pacífico.

G. caribaeus fue documentada por primera vez en las islas Canarias por Rodríguez y colaboradores en 2017 en la isla de El Hierro asociada a macroalgas en un charco de marea en Tacorón y en sustrato artificial en La Estaca en muestreos realizados en Septiembre de 2015. En esa misma isla, en octubre de 2016, Soler-Onís y colaboradores documentaron una elevada concentración de células de esta especie (más de 10^4 células·g⁻¹ de peso húmedo de alga) en el puerto de La Restinga. Y posteriormente, en septiembre de 2017 se detectó en La Gomera, asociada a macroalgas en Playa La Cueva (San Sebastián de La Gomera) y en Playa de Santiago, y asociada al sedimento del fondo del puerto de Santiago (datos obtenidos en el presente proyecto).

Además, existen otros registros de *G. cf. caribaeus* en Fuerteventura asociados a macroalgas en la Playa de El Cotillo y en el puerto de Las Playitas (datos obtenidos en el presente proyecto). La presencia en esta isla de *G. caribaeus* está basada en el estudio morfológico de las células de *Gambierdiscus*, el cual reveló la presencia mayoritaria de *G. excentricus* y en segundo lugar *G. australes* en ambas localidades. Las células identificadas como *G. cf. caribaeus* constituyeron menos del 5% (12 células en total). Esta presencia basada en pocos especímenes y el hecho de aparecer junto con *G. australes* que es una especie morfológicamente muy similar a *G. caribaeus*, nos inclina a considerar la necesidad de verificar esta presencia mediante análisis genéticos.

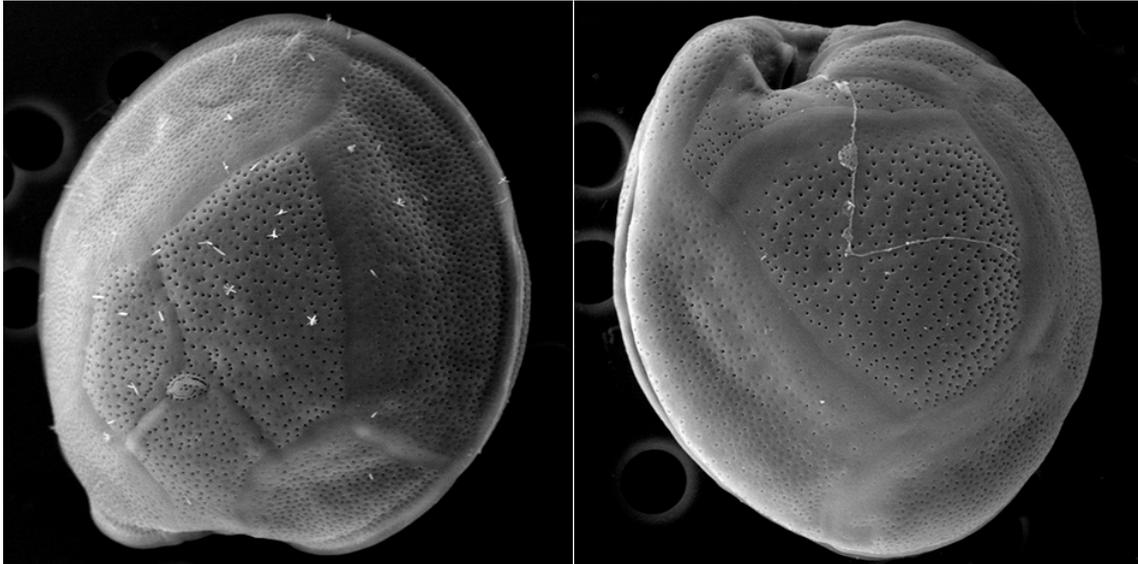


Figura 5. Fotografías de la epiteca (izquierda) y la hipoteca (derecha) de *G. carolinianus* al microscopio electrónico de barrido. Células de la cepa VGO1297 aislada de las Islas Canarias.

Gambierdiscus carolinianus

G. carolinianus fue descrita originalmente en 2009 por Litaker y colaboradores, quienes la aislaron de una muestra de macroalga recolectada a una profundidad de 45 metros cerca del Cabo Fear en Carolina del Norte (EEUU) en Agosto de 2004. Posteriormente, esta especie se observó que tenía una amplia distribución en el Mar Caribe, extendiéndose su distribución más al norte hasta las Islas Bermudas. Al igual que la especie anterior *G. carolinianus* es considerada por esos autores con una amplia distribución geográfica, encontrándose en latitudes tropicales y subtropicales tanto en el Atlántico como en el Pacífico. Además, en 2013 es citada por Holland y colaboradores en muestras de Creta (Grecia) que podría corresponderse con la descrita como *Gambierdiscus* sp. en trabajos anteriores.

En las Islas Canarias *G. carolinianus* sólo se detectó en una muestra de algas en un charco de marea en la localidad de Alcalá (Tenerife) en 2014, por lo que, por ahora, se puede considerar de muy escasa presencia en el archipiélago.

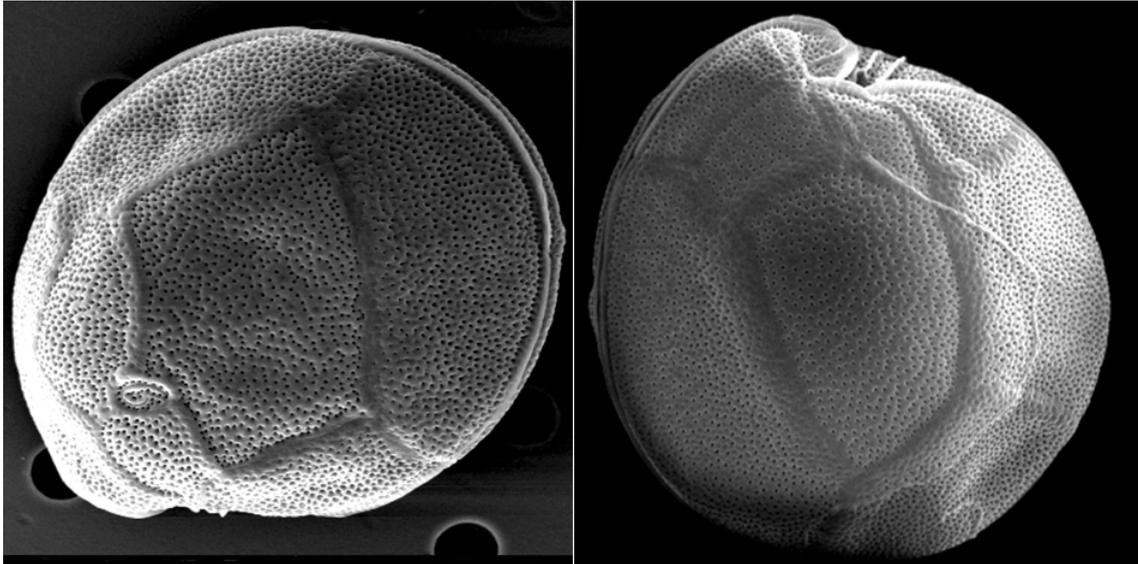


Figura 6. Fotografías de la epiteca (izquierda) y la hipoteca (derecha) de *G. excentricus* al microscopio electrónico de barrido. Células de la cepa VGO790 aislada de las Islas Canarias.

Gambierdiscus excentricus

La primera descripción de *G. excentricus* fue realizada en 2011 por Fraga y colaboradores a partir de cultivos establecidos de muestras de macroalgas procedentes de varias localizaciones de las Islas Canarias (Punta Hidalgo en Tenerife, Charco del Conde en La Gomera y Playa Las Cabras en La Palma). Posteriormente, en un estudio de distribución de especies de *Gambierdiscus* realizado desde 2014 a 2016 en 5 islas del archipiélago, Rodríguez y colaboradores la describen, junto con *G. australes*, como una de las dos especies más común en las islas de Fuerteventura y Lanzarote. Hasta el momento, los datos sugieren que sus densidades decrecen desde la isla más occidental (Lanzarote) hasta la más occidental de El Hierro, siendo esta isla la única en la que todavía no se ha detectado.

En el Océano Atlántico, además de en las Islas Canarias, ha sido citada en la cercana isla de Madeira y en la costa de Brasil (en Playa Tartaruga, Río de Janeiro) asociada a la macroalga *Sargassum furcatum*. Además, según Fraga y colaboradores en su descripción original, la especie correspondiente al *Gambierdiscus sp.* citado en las costas de Marruecos por Ennaffah y Chaira en 2015 correspondería a *G. excentricus* por la morfología de sus placas tecales. En el Océano Índico ha sido observada en la costa de Salalah en Oman (Mar de Arabia) (comunicación personal de María Saburova). Sin embargo, no se ha observado ni en el Mar del Caribe ni en el Pacífico, a pesar de los numerosos estudios sobre distribución de *Gambierdiscus* en la zona.

Gambierdiscus silvae

Al igual que la especie anterior, *G. silvae* fue originalmente descrita a partir de especímenes en cultivos establecidos desde muestras de macroalgas recogidas en charcos de marea de varias localidades de las Islas Canarias: La puntilla en Las Palmas (Febrero de 2010) y Punta Hidalgo en Tenerife (Septiembre 2013). Posteriormente, en el estudio de distribución de especies de *Gambierdiscus* realizado desde 2014 a 2016 en 5 islas del archipiélago por Rodríguez y colaboradores, se registró esta especie solamente en la isla de Tenerife (Playa Las Américas 2014 y 2015) y aparentemente en muy baja concentración comparada con las especies más dominantes: *G. australes* y *G. excentricus*. En los estudios incluidos en el presente proyecto, *G. silvae* se observó en la isla de La Gomera en 2017, en dos localizaciones: Charco de la Condesa y Playa de Santiago. Los datos obtenidos hasta el momento sugieren una mayor concentración de esta especie en esa isla que en el resto del archipiélago.

Según Fraga y Rodríguez en la descripción original de la especie en el 2014, *G. silvae* estaría presente también en el archipiélago de Cabo Verde ya que, por sus características morfológicas, la especie documentada por Silva en 1956 como *Goniodoma* sería probablemente *G. silvae*.

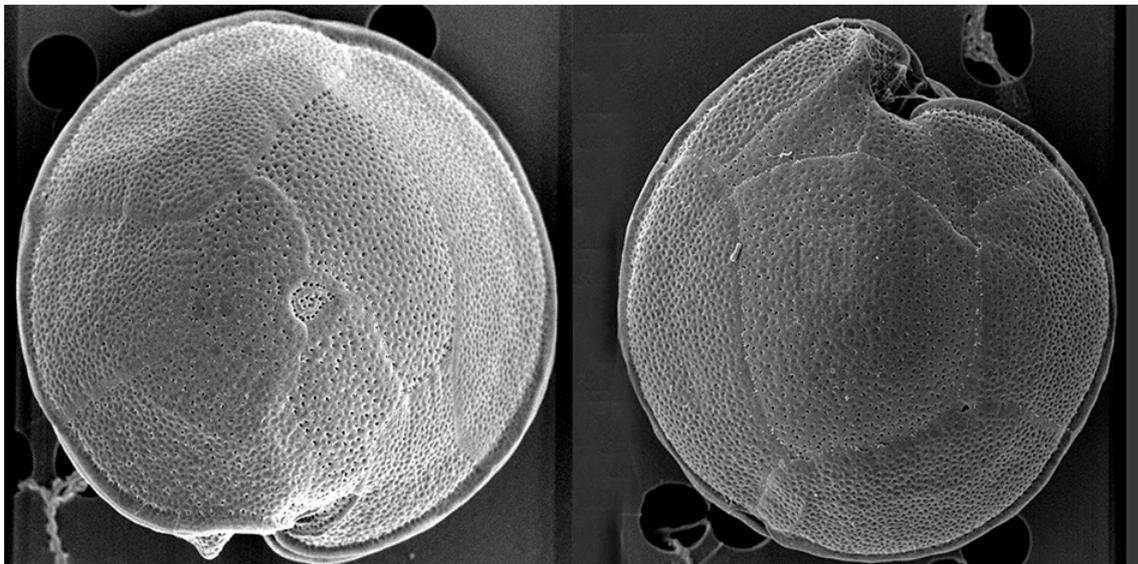


Figura 7. Fotografías de la epiteca (izquierda) y la hipoteca (derecha) de *G. silvae* al microscopio electrónico de barrido. Células de la cepa VGO1022 aislada de las Islas Canarias.

OTROS GÉNEROS DE DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

En las muestras de La Gomera y La Palma se identificaron otros géneros de dinoflagelados diferentes a *Gambierdiscus* (Tabla 1). Por su importancia en relación a su potencialidad tóxica destacamos los siguientes:

1. Especies del género *Prorocentrum*, destacaron por su gran diversidad
2. Especies del género *Coolia*
3. Especies del género *Ostreopsis*
4. Especies del género *Vulcanodinium*

Tabla 1. Concentraciones máximas y medias (células·g⁻¹ de alga) de otros géneros de dinoflagelados diferentes a *Gambierdiscus* encontrados en las muestras de La Gomera y La Palma. Las estaciones y sus códigos se corresponden con las del Informe nº 1 (ver la Figura 1 y Tabla 1).

Isla de La Palma		Especies									
		<i>Prorocentrum</i> spp		<i>Coolia</i> spp		<i>Ostreopsis</i> spp		<i>Vulcanodinium</i> spp		Otros	
Código/Estación		Max	Med	Max	Med	Max	Med	Max	Med	Max	Med
1	P. Charco azul					596	521				
2	Playa Charco azul					128	43			408	136
3	Los Cancajos					62	21	922	328	175	79
4	Playa Los Cancajos			133	66	940	470	313	290	133	66
5	Playa Tazacorte					2759	1221	223	84	690	266
7	.Charco verde			613	102	1702	966	425	193	340	71
8	Playa La Zamora	170	49	56	11	375	98			75	15
Isla de La Gomera											
10	Playa La Cueva	5672	586	574	119	574	125	2872	557	1149	266
12	Playa Santiago	1659	450	1343	264	290	41	1450	468	3282	1207
13	Ch. de la Condesa	788	163	1035	137	1595	403			348	70

BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE

Brito A, López C, Ocaña O, Herrera R, Moro L, Monterroso O, Rodríguez A, Clemente S, Sánchez JJ. 2017. Colonización y expansión en Canarias de dos corales

potencialmente invasores introducidos por las plataformas petrolíferas. *VIERAEA* **45**: 65-82.

Caillaud A, De la Iglesia P, Darius HT, Pauillac S, Aligizaki K, Fraga S, Chinain M, Diogène G. 2010. Update on Methodologies Available for Ciguatera Determination: Perspectives to Confront the Onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe. *Marine Drugs* **8**: 1838-1907.

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

Fraga S, Rodriguez 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**: 839-853.

Fraga S, Rodriguez F, Caillaud A, Diogene 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.

Kaufmann MJ, Santos F, Maranhão, M. 2015. Checklist of nanno- and microphytoplankton off Madeira Island (Northeast Atlantic) with some historical notes. *Nova Hedwigia* **101**: 205-232.

Litaker RW, Vandersea MW, Faust MA, Kibler SR, Chinain M, Holmes MJ, Holland WC, Tester PA. 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* **48**: 344-390.

Litaker RW, Vandersea MW, Faust MA, Kibler SR, Nau AW, Holland WC, Chinain M, Holmes MJ, Tester PA. 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon* **56**: 711-730.

Rodríguez F, Fraga S, Ramilo I, Rial P, Figueroa RI, 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.

Verges A, Steinberg P, Hay M, Poore A, Campbell A, Ballesteros E, Heck K, Booth D, Coleman M, Feary D, Figueira W, Langlois T, Marzinelli E, Mizerek T, Mumby P, Nakamura Y, Roughan M, van Sebille E, Sen Gupta A, Smale D, Tomas F, Wernberg T, Wilson S. 2014. The tropicalization of temperate marine ecosystems: climate-mediated changes in herbivory and community phase shifts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **281**.

Wernberg T, Bennett S, Babcock R, de Bettignies T, Cure K, Depczynski M, Dufois F, Fromont J, Fulton C, Hovey R, Harvey E, Holmes T, Kendrick G, Radford B, Santana-Garcon J, Saunders B, Smale D, Thomsen M, Tuckett C, Tuya F, Vanderklift M, Wilson S. 2016. Climate-driven regime shift of a temperate marine ecosystem. *Science* **353**: 169-172.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Fundación Biodiversidad y el Instituto Español de Oceanografía. Participaron también Isabel Ramilo en los conteos celulares, Amelia Fernandez en los cultivos de *Gambierdiscus* y Pilar Rial en los análisis de genética.