

Estudio comparativo sobre metodologías cuantitativas para la detección de especies de *Gambierdiscus* en Canarias

Isabel Bravo y Francisco Rodriguez

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

Informe nº 3

Proyecto: “Tropicalización y ciguatera en Canarias”

Actividad: “Puesta a punto y estudio comparativo de diferentes métodos moleculares para conteos celulares de *Gambierdiscus* usando microscopía y técnica de PCR con vistas a proponer métodos de monitoreo cuantitativo” (A3)



INTRODUCCIÓN

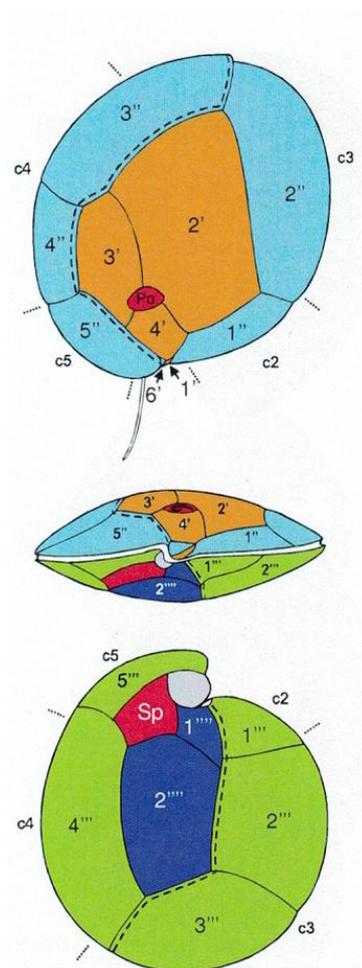
Uno de los problemas a los que se enfrenta la investigación sobre la ciguatera es que cualquier estudio de campo diseñado para conocer las poblaciones del agente productor de las ciguatoxinas, requeriría la capacidad de identificar de manera fiable las diferentes especies de *Gambierdiscus*. Estas especies son muy similares morfológicamente por lo que resulta muy difícil de diferenciarlas por los métodos tradicionales basados en microscopía óptica o microscopía electrónica. Por lo tanto, en la actualidad para identificar inequívocamente células de *Gambierdiscus*, se utilizan las técnicas de secuenciación genética. Las más usadas actualmente son aquellas basadas en secuencias del ADN ribosomal.

En la actualidad existen 14 especies diferentes de *Gambierdiscus*: *G. australes*, *G. balechii*, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. cheloniae*, *G. excentricus*, *G. honu*, *G. lapillus*, *G. pacificus*, *G. polynesiensis*, *G. yasumotou*, *G. ruetzleri*, *G. scabrosus*, *G. silvae* y *G. toxicus*.

De estas especies, cinco han sido detectadas en Canarias: *G. australes*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. excentricus* y *G. silvae*.

Un objetivo del presente proyecto fue proporcionar una comparación morfológica detallada de las especies que se han detectado en las Islas Canarias para poder valorar hasta que punto sería útil aplicar la taxonomía morfológica para la separación de las especies existentes en Canarias. Y por otro lado valorar, con el estado de conocimiento de las técnicas genéticas que hoy en día se utilizan en la identificación de *Gambierdiscus*, cómo podemos enfrentarnos a la cuantificación específica de los mismos.

ESTUDIO MORFOLÓGICO



1. Metodología

Al igual que en otros géneros de dinoflagelados, todas las especies de *Gambierdiscus* tienen en común la fórmula de la tabulación de las placas tecales (Figura 1), sin embargo, a diferencia de muchos otros géneros, resulta muy difícil establecer diferencias significativas en la configuración de las placas entre las 14 especies conocidas. Sin embargo, el hecho de que en Canarias sólo hayan aparecido 5 especies, nos animó a realizar el estudio morfológico de aquellas placas tecales que en la bibliografía estaban descritas con mayor posibilidad de que sirvieran para la discriminación entre especies.

El estudio lo realizamos sobre células de cultivos de cada especie obtenidos de aislamientos de células a partir de muestras de Canarias. Estos cultivos se identificaron primeramente mediante análisis genéticos por secuenciación de las regiones D1–D3 y D8–D10 del gen ribosomal LSUrRNA.

Figura 1. Esquema mostrando la tabulación de placas de *Gambierdiscus* que se usa en taxonomía (extraído de Fraga 2014).

Definimos 3 parámetros basados en diversas medidas de estas placas que nos definen la forma de cada una de ellas (Figura 2). Realizamos medidas de las placas de 30-70 células de cada especie (de 1-3 cepas según disponibilidad). Estas medidas se realizaron sobre fotografías sacadas al microscopio óptico usando epifluorescencia con las células teñidas con calcofluor. Para lo cual se utilizó un microscopio Leica con epifluorescencia implementado con filtro para UV y cámara de fotos AxioCam HRc (Zeiss, Göttingen, Alemania) acoplada con programa de análisis de imagen.

Para el estudio morfológico nos basamos en la forma de dos placas, la segunda apical (2', ver figura 1) situada en la epiteca y la segunda antiapical (2''', ver figura 1).

Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- R1 para definir la forma rectangular o en forma de hacha de la placa segunda apical (Figura 2)
- R2 para el grado de excentricidad, dependiendo de la localización de la placa Po de la epiteca al centro del lado lateral de la placa segunda apical (Figura 2).
- R3 nos dió la forma de la placa antiapical de la hipoteca (Figura 2).

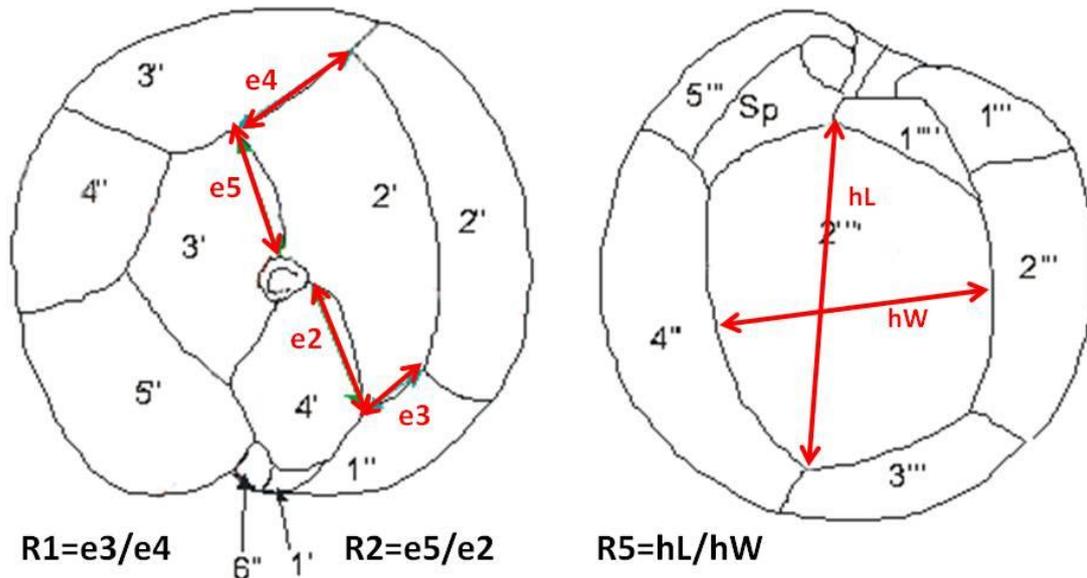


Figura 2. En rojo se indican las medidas realizadas en el estudio morfométrico de las cinco especies de *Gambierdiscus* detectadas en Canarias. Debajo las fórmulas de los parámetros utilizados.

Las diferentes especies de *Gambierdiscus* se caracterizaron según los valores de los 3 parámetros mencionados, se tomaron los valores de los percentiles del 5% y del 95% para los límites inferior y superior de cada variable (Tabla I). Para la clasificación, en un primer paso, aplicando funciones lógicas de Excel (SI, Y, O) a los parámetros R2 y R3, se diferenciaron 5 grupos:

- 1) Un alto porcentaje de *G. excentricus* se separó por el parámetro R2.
- 2) Un pequeño porcentaje de *G. excentricus* se solapó con *G. australes*
- 3) Un tercer grupo constituido por más del 75% de *G. australes*
- 4) Un cuarto grupo constituido por el resto de *G. australes* solapado con *G. caribaeus*
- 5) Un grupo compuesto conjuntamente por *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. silvae*

En un segundo paso las especies de los grupos compuestos por más de una especie se intentaron separar mediante observación de otras características como forma general

de la célula y tamaño. En la práctica estos grupos al ser poco numerosos se estudiaron las imágenes una a una.

Tabla 1. Valores de los percentiles de los parámetros R1, R2 y R3 usados en el análisis morfométrico de las cinco especies de *Gambierdiscus* detectadas en Canarias

	ESPECIE	Percentiles						
		5	10	25	50	75	90	95
R1 (epi3/epi4)	AUSTRALES	,5260	,5556	,6017	,6856	,7985	,9005	,9463
	CARIBAEUS	,6184	,6628	,7280	,8143	,9151	1,0421	1,2462
	CAROLINIAN.	,2829	,3107	,3864	,4947	,5709	,6477	,6806
	EXCENTRIC	,4916	,5227	,5724	,6344	,7289	,8661	,9355
	SILVAE	,3624	,3876	,4605	,5505	,6892	,8008	,8503
R2 (epi5/epi2)	AUSTRALES	1,3408	1,4367	1,5763	1,6885	1,8120	1,9704	2,1167
	CARIBAEUS	,9526	1,0262	1,1481	1,3333	1,4532	1,5567	1,7844
	CAROLINIAN.	1,0477	1,1248	1,2570	1,3935	1,5889	1,7701	1,8415
	EXCENTRIC.	2,1899	2,2190	2,3405	2,4633	2,8273	3,2360	3,5649
	SILVAE	,6340	,7234	,9177	1,0054	1,1179	1,2458	1,3278
R5 (hipoL/hipoW)	AUSTRALES	1,5669	1,6077	1,7164	1,8311	1,9722	2,0635	2,1757
	CARIBAEUS	1,2170	1,2248	1,2953	1,3947	1,5135	1,6346	1,7689
	CAROLINIAN.	1,0956	1,1216	1,1851	1,2531	1,3264	1,3889	1,4305
	EXCENTRIC	1,4929	1,5090	1,5792	1,6722	1,7931	1,9004	1,9452
	SILVAE	1,1724	1,1890	1,3204	1,4143	1,5206	1,5904	1,6225

2. Resultados

A continuación se indican las características y grado de diferenciación conseguida mediante el estudio morfométrico realizado con los cultivos de las cinco especies de *Gambierdiscus* detectadas en Canarias:

1. *G. excentricus* se diferenció fácilmente por la excentricidad de la placa apical (R2).
2. *G. australes* y *G. caribaeus* resultaron muy parecidos aunque bastantes *G. australes* (aproximadamente 75%) se diferenciaron por la placa antiapical alargada. Estas son las dos especies que presentaron más problema de diferenciación.
3. En el último grupo, *G. caribaeus*, *G. carolinianus* y *G. silvae*, en comparación con las dos especies anteriores, tienen en común su placa antiapical más cuadrangular. La primera especie se diferencia de la segunda y tercera principalmente por el parámetro R1, ya que *G. caribaeus* tiene la placa apical más cuadrada. *G. carolinianus* y *G. silvae* son muy similares, aunque se

podieron diferenciar en un alto porcentaje por el tamaño ya que *G. silvae* es más pequeña.

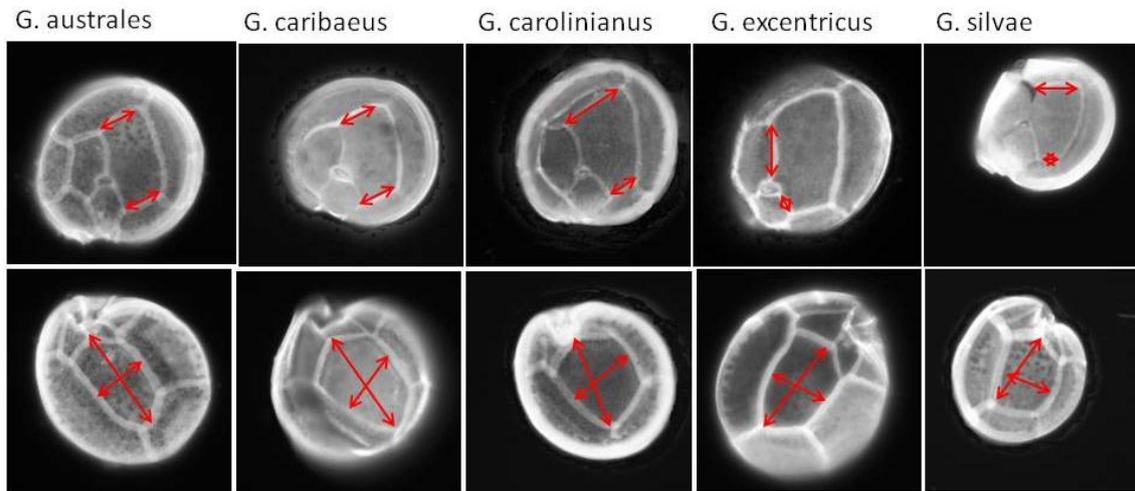


Figura 3. Fotografías de las cinco especies de *Gambierdiscus* detectadas en Canarias. Las flechas indican las medidas realizadas en el estudio morfométrico que más caracterizan a cada especie.

El grado de diferenciación del estudio fue suficientemente adecuado para permitir aplicarlo a muestras del medio natural con el fin de tener una distribución por especies y al mismo tiempo compararlo con aquella obtenida por otros métodos. Para ello el método se aplicó a las muestras naturales obtenidas en este proyecto de las islas de La Gomera. Como resultado se obtuvo la distribución por especies que se muestra en la Figura 4.

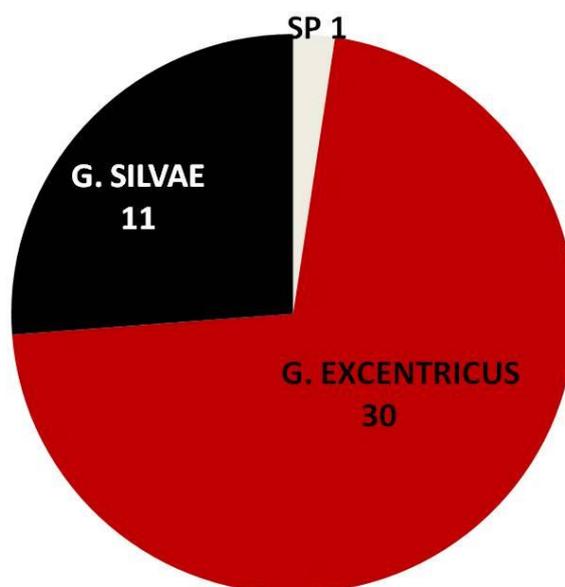


Figura 4. Número de especímenes de cada especie de *Gambierdiscus* obtenidos en el estudio morfológico aplicado a las muestras de La Gomera (muestreo realizado en 2017 durante el presente proyecto).

Además el estudio morfométrico se aplicó a muestras naturales que se habían obtenido en una campaña realizada en 2016 en la isla de Fuerteventura, y que estaban en el laboratorio sin analizar por carecer de un método apropiado. Como resultado de estos análisis se pudo obtener la distribución por especies que era desconocida hasta el momento y que se muestra en la Figura 5.

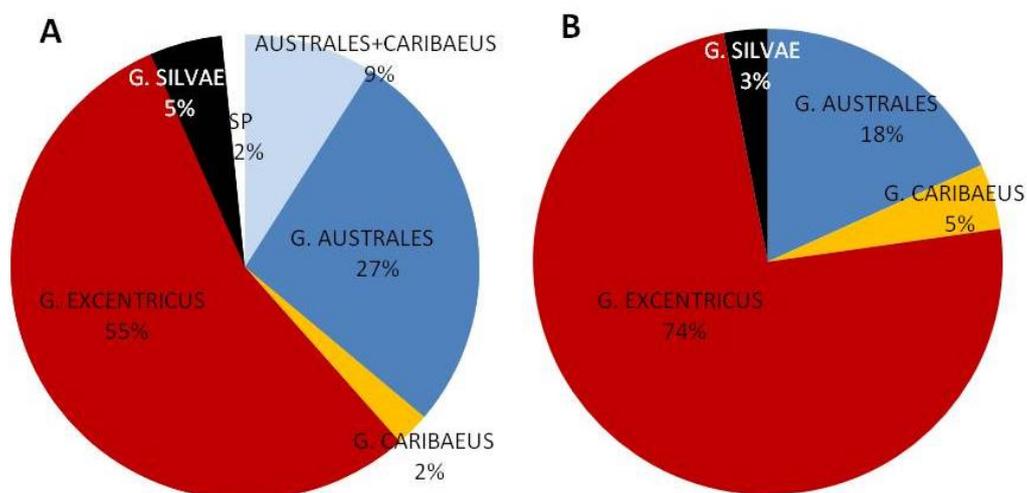


Figura 5. Distribución porcentual de las especies de *Gambierdiscus* detectadas en dos localizaciones de la Isla de Fuerteventura: El Cotillo (A) y Las Playitas (B (muestreo realizado en 2016 durante el proyecto CICAN: <https://proyectocican.es/cican/>)).

ESTUDIOS BASADOS EN MÉTODOS MOLECULARES

La metodología más usada para la identificación de especies de fitoplancton por técnicas moleculares es la secuenciación del DNA de genes ribosomales, bien de células de cultivos obtenidos a partir de aislamientos celulares realizados de las muestras naturales, o bien de células individuales directamente aisladas de las mismas. Sin embargo, en el caso de especies del género *Gambierdiscus*, el método de extracción y amplificación de células fijadas presenta muchas dificultades por el escaso y variable porcentaje de éxitos que se obtienen. Por ello, en general, se realiza sobre células vivas sin fijar. Esto supone un gran problema ya que es difícil realizar todos los análisis necesarios sin que las muestras se deterioren. Por ello, y porque se necesitaban cultivos para los estudios de toxinas y morfología, la identificación por métodos moleculares se basó en los cultivos establecidos de las muestras de La Gomera y La Palma, al igual que se hizo para el estudio morfológico. Además, se realizó un estudio sobre extracción y amplificación de células de *Gambierdiscus* fijadas, con el fin de desarrollar un protocolo para poder conservar las muestras naturales y así facilitar la realización de estudios de biodiversidad del género.

También se llevó a cabo un estudio de cuantificación de células de *Gambierdiscus* mediante la técnica de q-PCR. Los análisis de q-PCR permiten estimar de forma semi-cuantitativa la composición y abundancia relativa de especies de fitoplancton en una muestra natural. Sin embargo, esta técnica no está implementada para las especies del género *Gambierdiscus*. En el presente proyecto nos hemos centrado en poner a punto dicha técnica para la identificación semi-cuantitativa de *G. excentricus* porque es una de las especies más abundantes del género en Canarias y la más tóxica según la bibliografía que hay en la actualidad, por otro lado muy escasa.

1. ESTUDIO BASADO EN EL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES DE GAMBIERDISCUS

1.1 Metodología

La metodología se basó en la obtención de los cultivos por aislamientos celulares (ver metodología en el informe 1 del presente proyecto) y a continuación en la amplificación y secuenciación de DNA. Los aislamientos se llevaron a cabo a partir de

las muestras naturales obtenidas en este proyecto de las islas de La Gomera y La Palma.

Para la amplificación del DNA, primeramente se aislaron manualmente células individuales de cada cultivo, lavándolas en gotas de agua destilada para eliminar el exceso de sales que puede interferir en los análisis. Posteriormente se depositan en un microtubo de 200 μ l, y 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.

No es necesario realizar un clonaje posterior a la PCR dado que los análisis proceden de células individuales de cultivos clonales.

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.

1.2 Resultados

En la Figura 6 se muestra la distribución por especies de *Gambierdiscus* obtenida por métodos moleculares, en la que dominan por este orden *G. excentricus*, *G. silvae*, *G. caribaeus* y *G. australes*. Además se resumen las diferencias relativas en la presencia de dichas especies, respecto al estudio morfométrico, en el apartado “Estudio comparativo” que se describe más abajo.

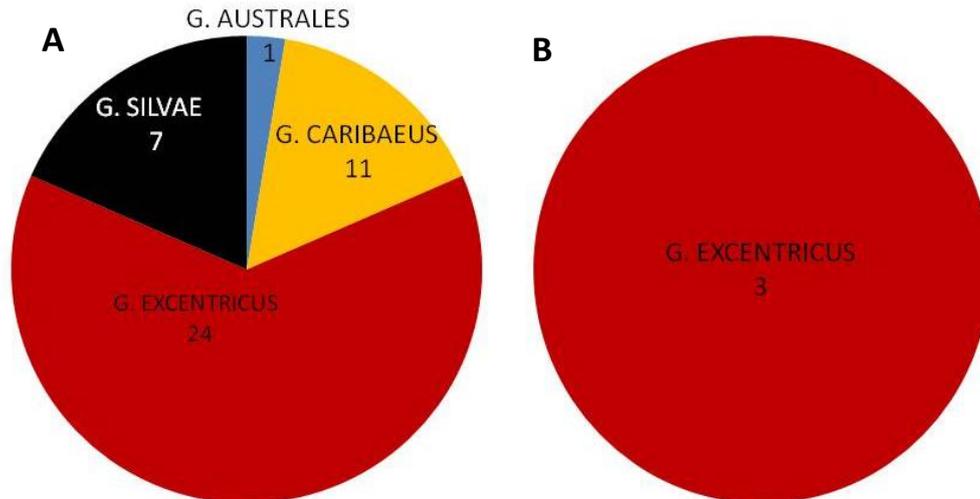


Figura 6. Número de especímenes de cada especie de *Gambierdiscus* obtenidas en el estudio de genética llevado a cabo en las muestras de La Gomera (A) y La Palma (B).

2. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE CÉLULAS DE *GAMBIERDISCUS* FIJADAS

Se realizaron en total 6 experimentos para probar dos fijadores (etanol y lugol) y diversos tratamientos con o sin proteinasa K. Se utilizaron cultivos de *Gambierdiscus* con estos fijadores en diferentes concentraciones. La región a amplificar para su posterior secuenciación fue D8-D10 y los primers utilizados fueron el FD8 y el RB.

Los resultados de las diversas pruebas indicaron que el mayor problema es romper la dura pared de celulosa de las células de *Gambierdiscus*. Este problema es el que origina la baja tasa de éxito de las extracciones y por lo tanto de la secuenciación.

El problema de romper las células fue abordado utilizando diferentes tratamientos para ver cual rompía mejor la pared de las células. Estas pruebas se basaron en: 1) diferentes concentraciones de lugol, 2) diferentes tratamientos con nitrógeno líquido, 3) con/sin proteinasa K y 4) diferentes tratamientos con calor.

De los resultados se puede extraer el siguiente procedimiento para fijar y obtener una buena extracción de DNA:

- 1) fijar con lugol en concentración final de 0,05 μ L lugol

- 2) añadir 5µL de tampón de extracción (Tris-HCl pH8 10mM+EDTA 2mM+Cl Na150mM+SDS 1%)
- 3) incubar 2 horas a 56°C con agitación,
- 4) sumergir tres veces en nitrógeno líquido
- 5) mantener 9 minutos a 95°C

3. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS DE *GAMBIERDISCUS* MEDIANTE LA TÉCNICA DE Q-PCR

Para el desarrollo de esta técnica contamos con el laboratorio del Dr. Wayne Litaker (NOAA, Beaufort, EEUU), dado que ellos disponen de los cebadores específicos para *G. excentricus*, todavía sin publicar.

Después de obtenerlos (gracias a una colaboración informal con dicho laboratorio), hemos comenzado los análisis empleando cultivos de *G. excentricus* aislados en Canarias, con el fin de calibrar la señal obtenida mediante q-PCR para poder luego estimar las concentraciones en el medio natural.

Los resultados hasta el momento han sido positivos para las muestras analizadas a partir de ADN extraído de cultivos de *G. excentricus*, demostrando que los cebadores son válidos para las cepas aisladas en Canarias. Un segundo paso consiste en estimar la abundancia de *G. excentricus* en el medio natural, para lo cual se necesita obtener unas rectas de calibrado entre la densidad celular y la respuesta del análisis por q-PCR.

La metodología seguida consiste en la extracción de ADN total de cultivos de *G. excentricus* y la utilización de un ensayo de q-PCR de tipo SYBR Green. Durante la q-PCR es posible visualizar el progreso de la reacción y calcular a posteriori de forma semi-cuantitativa la abundancia específica de *G. excentricus*.

No obstante, a pesar de los resultados positivos sobre cultivos, en la actualidad seguimos trabajando en esta técnica para mejorar nuestras rectas de calibrado ya que las obtenidas hasta el momento no son satisfactorias e impiden emplear la técnica de forma semi-cuantitativa para estimar la abundancia de *G. excentricus* en muestras naturales. Además, en un futuro próximo trabajaremos en el desarrollo de la técnica

de q-PCR para las demás especies presentes en Canarias, que ya cuentan con cebadores específicos publicados por otros autores (excepto para *G. silvae*) en otras regiones del mundo afectadas por ciguatera.

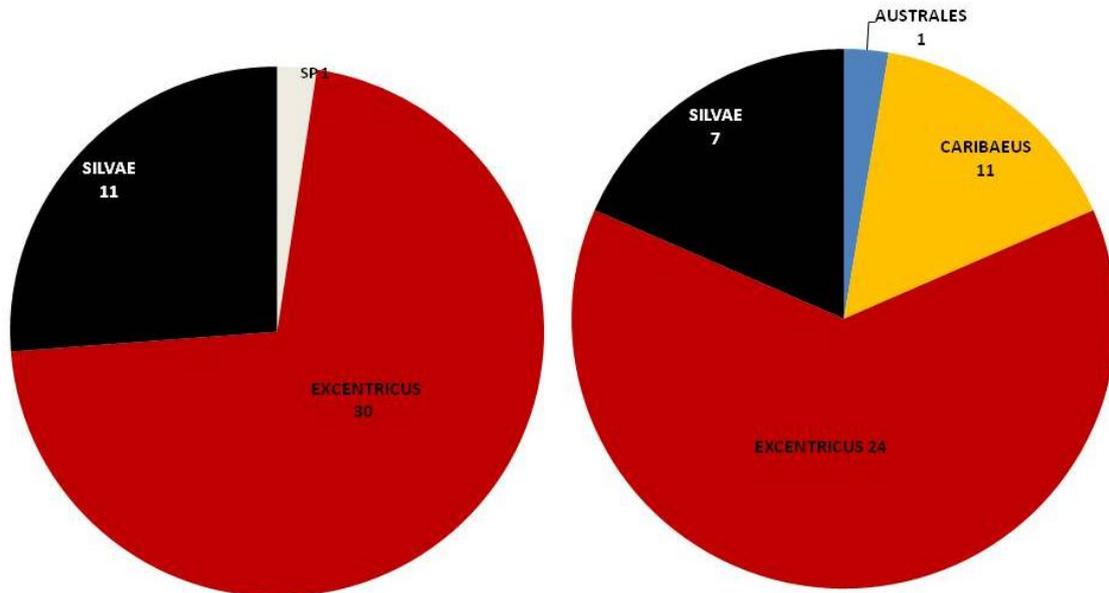


Figura 7. Número de especímenes de cada especie de *Gambierdiscus* obtenidas en el estudio de morfología (A) y genética (B) llevado a cabo en las muestras de La Gomera.

ESTUDIO COMPARATIVO

El estudio comparativo se realizó sobre los resultados de la distribución de especies de *Gambierdiscus* obtenidas del estudio morfológico y del estudio genético basado en el establecimiento de cultivos celulares de *Gambierdiscus*. Estos datos se refieren todos a las muestras recogidas en la Isla de La Gomera en octubre de 2017 durante el presente proyecto (ver informe 1 sobre la actividad A1). En La Palma sólo se detectó *G. excentricus*, si bien en concentraciones muy bajas (hasta 40 cels/gr de alga), lo cual no fue suficiente para realizar los análisis morfológicos para la comparación.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 A y B (por métodos morfológicos y métodos genéticos respectivamente). Se observó lo siguiente:

- 1) *G. excentricus* fue la especie más abundante dominando con porcentajes del 63% y 72% en el estudio genético y morfológico respectivamente.

- 2) *G. silvae* apareció como segunda especie 26% en el estudio morfológico y 18% en el genético.
- 3) *G. caribaeus* (16%) sólo se detectó en el estudio genético. En el estudio morfológico no se observaron especímenes de esta especie ni de *G. australes* con la que se podía confundir.
- 4) Se observó muy bajo porcentaje de *G. australes* (3%) en los análisis genéticos, no detectándose en el estudio morfológico. Esta baja concentración de esta especie llama la atención ya que es una de las dos especies mayoritarias en El Hierro, Gran Canaria, Fuerteventura y Tenerife.

El desacuerdo observado entre ambos estudios se ve reflejado principalmente en la no observación de *G. caribaeus* en el estudio morfológico, lo cual evidencia el sesgo que puede tener cada estudio dependiendo de la metodología utilizada.

En lo que concierne a los análisis genéticos la aparición de un porcentaje elevado de *G. caribaeus* se debe probablemente al mejor acondicionamiento de esta especie en el momento de establecer los cultivos, lo cual claramente puede introducir un sesgo en los resultados a partir de la genética.

CONCLUSIONES

1. Es necesario seguir profundizando en el desarrollo de técnicas moleculares cuantitativas para las distintas especies de *Gambierdiscus*.
2. La morfología puede ser de gran ayuda pero para realizar conteos rutinarios consume mucho tiempo y no sería totalmente resolutivo.
3. Conocer las especies tóxicas y las que no lo son simplificaría el problema que supone la identificación de especies de *Gambierdiscus* al poder centrarse sólo en las que causan el síndrome de la ciguatera.

BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE

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

Fraga S. 2014. Caracterización taxonómica y ecología de especies crípticas o pseudocrípticas de dinoflagelados nocivos. Tesis de doctorado, Departamento de Ecología e Bioloxía animal, Universidade de Vigo.

GEOHAB, 2012. GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC, Paris, pp. 64.

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.

AGRADECIMIENTOS

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