

Desarrollo de sondas para la detección de *Pseudo-nitzschia delicatissima* en la costa Catalana, España: estudios preliminares

Laurence M. Elandaloussi^{1,3}, Roger A. Venail^{1,3},
Sonia Quijano-Scheggia^{2,3}, Margarita Fernández-Tejedor^{1,3},
Esther Garcés^{1,2,3}, Jordi Camp^{2,3}, Jorge Diogene^{1,3} y Karl Andree^{1,3}

(1) IRTA-Centre d'Aqüicultura, Crta. Poble Nou, Km 5.5,
43540-Sant Carles de la Ràpita, Spain

(2) Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, CMIMA,
Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, E08003 Barcelona, Spain

(3) CRA, Centre de Referència en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya, Spain

Resumen

Este trabajo recoge los actuales avances sobre el desarrollo de sondas moleculares para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y PCR en tiempo real como métodos de detección de *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

Introducción

Dentro del género *Pseudo-nitzschia* de diatomeas se encuentran algunas especies asociadas a la producción de ácido domoico, toxina responsable del envenenamiento amnésico por mariscos (ASP). Aunque algunas especies pertenecientes a este género tales como *P. pungens*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. delicatissima* y *P. calliantha* ya han sido detectadas a lo largo de la costa catalana y aunque sean productoras potenciales de ácido domoico, hasta la fecha no ha habido presencia ni de envenenamiento amnésico por mariscos ni de toxinas amnésicas en moluscos en esta zona.

La identificación de este género puede realizarse por medio de la microscopía óptica normal, sin embargo, la discriminación entre las especies a menudo requiere la observación de caracteres morfológicos por medio de la microscopía electrónica. Debido a esto, se han desarrollado algunos métodos alternativos de identificación, como es el caso de los métodos moleculares que constituyen valiosas herramientas para la rápida identificación de algas potencialmente tóxicas. De hecho, ya se recurre a sondas especie-específicas para la identificación de algunas especies de *Pseudo-nitzschia* en norte América [1].

Un primer paso en el desarrollo de las herramientas moleculares para la identificación de una especie diana supone diferenciar las regiones conservadas de las múltiples secuencias variables del ADN, lo cual requiere el conocimiento de la diversidad molecular de una especie en particular dentro de la misma zona geográfica. Por lo tanto las sondas desarrolladas para las especies de *Pseudo-nitzschia* norte americanas [1] pueden no tener un buen resultado con las especies locales en Europa.

La detección específica del fitoplancton puede realizarse utilizando métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o la técnica de hibridación *in situ*. Obtener las secuencias diana óptimas para los oligonucleótidos es un paso necesario en ensayos de detección especie-específicos ADN/ADN o ARN/ADN. En este trabajo se presentan nuestros resultados preliminares en el desarrollo de oligonucleótidos para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la PCR en tiempo real como métodos alternativos de detección de *Pseudo-nitzschia*.

Métodos

Cultivos. Células de *P. delicatissima* fueron aisladas a partir de muestras de campo provenientes del Delta del Ebro, España, durante el invierno 2005-2006. Los cultivos se mantuvieron a 16° C con un fotoperiodo de 12:12 (L:D) en medio f/2 con silicatos [2].

Microscopía. Las células de *Pseudo-nitzschia* aisladas fueron preparadas [3] y examinadas morfológicamente utilizando un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-3500N). Para la microscopía electrónica de transmisión, algunas gotas del material libre de materia orgánica fueron depositadas sobre filtros de policarbonato, recubiertas con oro-paladio y observadas con un microscopio Hitachi H800.

Extracción ADN, clonaje y secuenciación. Las extracciones de ADN fueron realizadas utilizando un DNeasy® Plant Kit de Qiagen y las regiones ITS1, 5.8S y ITS2 fueron amplificadas por PCR utilizando los cebadores MicroSSU (5'-TGAACCTGCGGAAGGATC-3') y Dino E (5'-CCKSTTCAYTCGCCRTTAC-3'). Los amplicones resultantes fueron clonados y secuenciados.

Análisis de las secuencias. Las secuencias de *Pseudo-nitzschia* depositadas en el GenBank y aquellas obtenidas en este estudio fueron utilizadas para los análisis. Las secuencias fueron alineadas empleando los programas BioEdit y ClustalW.

Sondas. Las sondas de oligonucleótidos fueron diseñadas analizando los alineamientos de las secuencias de *Pseudo-nitzschia* para que reconocieran las regiones de ARN especie-específicas de *P. delicatissima* (Pdel1, PdelRa2 y PdelRa3).

Técnica de hibridación "Whole-cell Hybridisation". Las sondas UniC (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') [4], Pdel1 (5'-CCAACGAAA CCAAGCAAAG-3') [5] y UniR (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') fueron marcadas en la extremidad 5' con fluoresceína para ser utilizadas en ensayos FISH [1]. Los cultivos clonales de *P. delicatissima* fueron hibridados con las sondas Pdel1, UniC (control positivo) y UniR (control negativo) y observados mediante microscopía de epifluorescencia.

PCR en tiempo real. Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa PrimerExpress. La PCR en tiempo real fue realizada en una Real-Time PCR system 7300 (Applied Biosystem). La optimización del ensayo fue realizada utilizando un plásmido ADN que contenía la región ITS1-

5.8S-ITS2 del ADNr como molde. Una matriz de pruebas cruzadas utilizando todos los cebadores especie-específicos con todos los clones de ADNr fue realizada a intervalos de 2° C desde 60° C hasta 70°C con el fin de eliminar cualquier reacción no específica entre cebadores y clones de ADNr de las especies no diana (datos no presentados). La especificidad de PdelRa2 y PdelRa3 fue probada en ensayos con la PCR en tiempo real utilizando plásmidos que contenían las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de varias especies de fitoplancton y con ADN genómico extraído de las cepas *P. delicatissima*.

Resultados

Cuatro cultivos clonales no axénicos de *Pseudo-nitzschia delicatissima* aisladas del Delta del Ebro, llamadas clones A4, D3, Ra2 y Ra3 fueron utilizadas en este estudio (Tabla 1). Basándose en la microscopía electrónica [6] estas cepas fueron identificadas como *P. delicatissima* [5]. La amplificación de la región ITS por medio de la PCR generó una secuencia inequívoca con una longitud promedio de 879 nucleótidos. La identificación de las especies fue apoyada por el análisis de estas secuencias.

Especie (cepa)	Fecha de aislamiento	Origen	Número de acceso GenBank
<i>P. delicatissima</i> (A4)	23/02/06	Bahía de Alfacs, delta del Ebro	DQ530625
<i>P. delicatissima</i> (D3)	20/02/06	Bahía de Fangar, delta del Ebro	DQ530622
<i>P. delicatissima</i> (Ra2)	29/03/05	Puerto de Sant Carles de la Ràpita	DQ990362
<i>P. delicatissima</i> (Ra3)	29/03/05	Puerto de Sant Carles de la Ràpita	DQ990363

Tabla 1. Fecha de aislamiento, origen y accession number de las cepas utilizadas en este estudio.

Las regiones más convenientes para diseñar sondas/cebadores fueron identificadas a partir de los alineamientos obtenidos utilizando los programas CrystalW y BioEdit con las secuencias depositadas en el GenBank y aquellas obtenidas en este estudio. Dentro de estas regiones seleccionadas, no se pudo encontrar una región conservada en las múltiples secuencias variables de *P. delicatissima* (Fig.1).

Los análisis de las secuencias de 879 pb revelaron una gran similitud entre los clones de *P. delicatissima* A4, D3 y Ra2 (>99 %). La secuencia del clon Ra3 presentó una mayor divergencia con respecto a aquellas de los clones Ra2, A4 y D3 (81-82% de similitud) (Tabla 2).

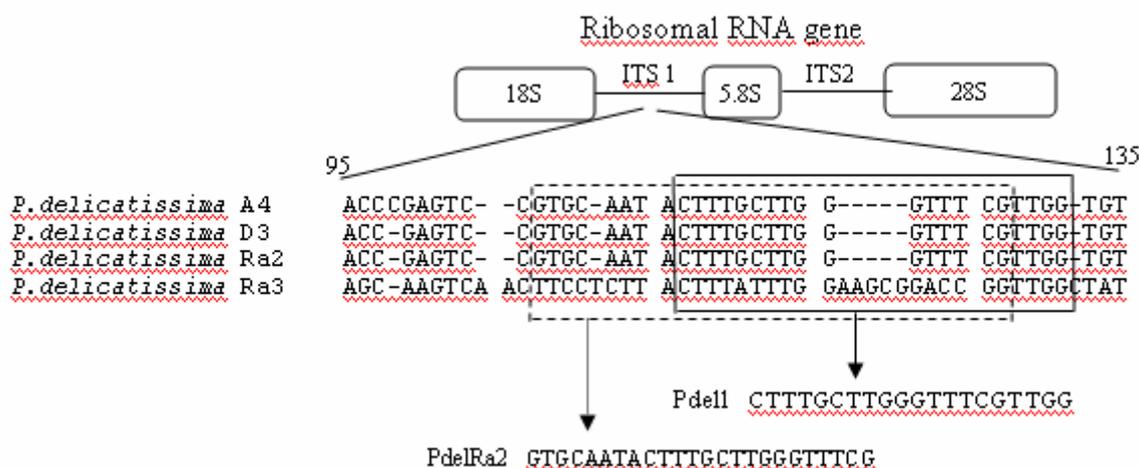


Figura 1. Posición y secuencias de las sondas de oligonucleótidos específicas para *P. delicatissima*.

	D3	Ra2	Ra3
A4	0,9986979	0,9973958	0,8218054
D3		0,9986962	0,8206331
Ra2			0,8194607

Tabla 2. Similitud entre las cepas de *P. delicatissima* (Identities).

Se desarrollaron sondas especie-específicas para la identificación de *P. delicatissima* del Delta del Ebro, dos entre ellas dirigidas a tres clones y una dirigida específicamente a Ra3. Los resultados preliminares con el clon *P. delicatissima* A4 mostraron una hibridación con la sonda Pdel1. Sin embargo, las pruebas positivas con FISH no revelaron señales de fluorescencia ni altas ni homogéneas. Adicionalmente, no se observó ningún marcaje al utilizar el clon *P. delicatissima* D3 con esta sonda. Ningún marcaje fluorescente pudo ser observado al exponer los clones de *P. delicatissima* a las sondas negativas, mientras que la sonda positiva marcó las células. Las imágenes de las pruebas realizadas con FISH con el clon A4 están presentadas en la Fig. 2.

Por otra parte, la PCR en tiempo real utilizando los cebadores PdelRa2 y PdelRa3 mostró una hibridación con sus respectivas secuencias diana utilizando un plásmido ADN como molde (Fig. 3). Resultados similares se obtuvieron al utilizar el cebador PdelRa2 con ADN genómico de *P. delicatissima* o con una mezcla de plásmidos ADN que contenían secuencias ADNr de varias especies de *Pseudo-nitzschia* (*P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. pungens*, clon *P. delicatissima* Ra3) y *Protoceratium reticulatum*, que cuando se utilizó un plásmido ADN conteniendo secuencias ADNr de *P. delicatissima* como molde.

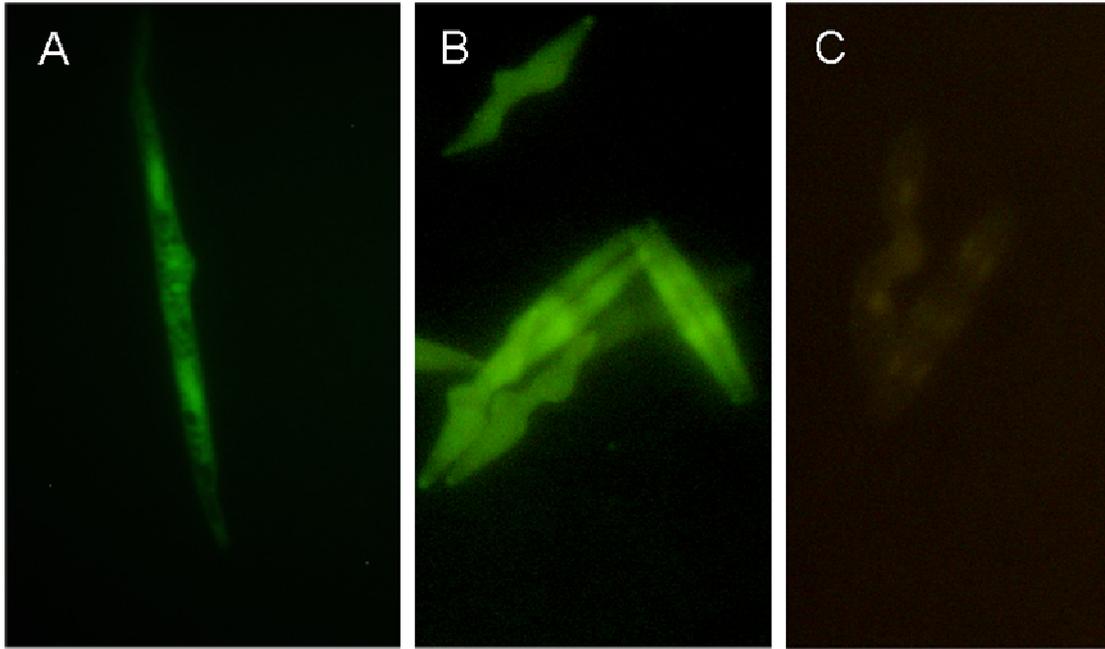


Figura 2. Imágenes de FISH de las pruebas de hibridación del clon *P. delicatissima* A4 con la sonda Pdel1 (A) *P. delicatissima*-específica, la sonda universal UniC (B) como control positivo y la sonda UniR (C) como control negativo.

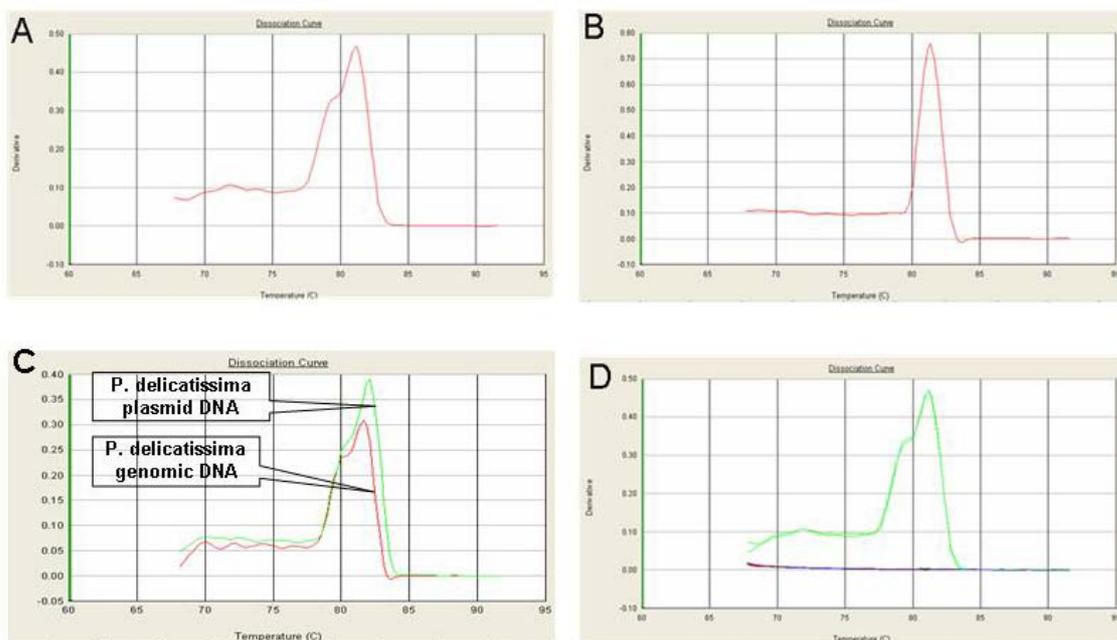


Figura 3. PCR en tiempo real. Curvas de disociación obtenidas utilizando (A): el cebador PdelRa2 con un plásmido ADN conteniendo secuencias ADN_r del clon *P. delicatissima* Ra2; (B): Plásmido de ADN conteniendo secuencias ADN_r del clon de la cepa Ra3 amplificado usando el cebador específico para Ra3; el cebador PdelRa2 con (C): ADN genómico del clon *P. delicatissima* Ra2 y el plásmido correspondiente; (D): una mezcla de plásmidos conteniendo secuencias ADN_r de 23 cepas pertenecientes a 6 especies.

Discusión

Sondas especie-específicas dirigidas a *P. delicatissima* desarrolladas en Norte America [1] presentan diferencias de al menos una base con las secuencias LSU de las cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas en el delta del Ebro (datos no presentados). Debido a esto, se diseñaron los oligonucleótidos Pdel1, PdelRa2 y PdelRa3 específicos de los clones aislados en la costa catalana. De las cuatro secuencias obtenidas a partir de los clones aislados provenientes del Delta del Ebro, una entre ellas (clon Ra3) presentó una gran divergencia con respecto a las demás. Ninguna región conveniente en la región ITS de *P. delicatissima* pudo encontrarse para el desarrollo de un oligonucleótido específico para los cuatro clones. Sin embargo, se diseñaron dos oligonucleótidos dirigidos a los clones *P. delicatissima* A4, D3 y Ra3 y otra dirigida al clon Ra3. Los oligonucleótidos PdelRa2 y PdelRa3 mostraron ser específicas de las secuencias diana en las pruebas de PCR en tiempo real al utilizar una mezcla de plásmidos ADN conteniendo las secuencias de varias especies de *Pseudo-nitzschia* y aquellas de otras especies de fitoplancton como molde. El siguiente paso será utilizar estas dos sondas en combinación para la detección de todas las variantes de *P. delicatissima* utilizando ADN extraído de muestras de campo.

La señal débil observada en la hibridación *in situ* de la sonda Pdel1 con el clon A4 puede indicar que esta sonda tiene problemas para acceder a su secuencia diana o que las células contienen una cantidad de ARNr muy bajo. El contenido del ARNr de nuestros cultivos de *Pseudo-nitzschia* parece ser relativamente bajo haciendo difícil su detección con marcaje fluorescente. De hecho, una leve disminución de la cantidad del ARNr en las células de diferentes cultivos conlleva a un marcaje restringido lo cual podría explicar la ausencia de marcaje observado en algunas de las cepas cuando son marcadas con su sonda específica. No se puede negar que la afinidad de unión entre las sondas y las secuencias diana sea débil. La hibridación *in situ* requiere un emparejamiento de bases estable entre la sonda de oligonucleótidos y la secuencia diana de ARN. En el momento de diseñar los oligonucleótidos anti-sentido (oligómeros) que se unirán con alta afinidad, es conveniente considerar la estructura de la hebra del ARN diana. El incremento de la energía requerida para romper los enlaces intramoleculares de la estructura secundaria reduce la eficiencia de la unión de la sonda. Sin embargo, la optimización de la eficiencia de unión de las sondas y/o de la permeabilidad de la membrana celular puede conseguirse al alterarse las condiciones de hibridación. Adicionalmente, la selección de las sondas basándose en criterios termodinámicos para obtener una alta afinidad con la secuencia diana puede ser útil al reducir el largo proceso de probar varias sondas para una hibridación eficiente con el ARN [7,8].

En conclusión, el protocolo para la hibridación *in situ* aún necesita ser optimizado en términos de eficiencia de la unión de la sonda, además, estas sondas moleculares deben ser probadas con un mayor número de especies de *Pseudo-nitzschia* tanto de cultivos como de muestras de campo e igualmente con especies de microalgas no relacionadas para determinar las

reacciones cruzadas. La secuenciación de clones adicionales de *Pseudo-nitzschia* provenientes de aguas catalanas se está llevando a cabo actualmente para obtener la diversidad molecular y desarrollar oligonucleótidos específicos para la detección de una variedad más amplia de especies de *Pseudo-nitzschia*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA-2005-00109-00-00, INIA. El trabajo de E. Garcés está financiado por el contrato Ramon y Cajal del Ministerio de Educación y Ciencia. Sonia Quijano está financiada por una Beca PROMEP, México.

Referencias

- [1] Scholin, C.A., K.R. Buck, T. Britschgi, G. Cangelosi, F.P. Chavez. 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich formats. *Phycologia*. 35:190-197.
- [2] Guillard, R.R.L. Culture methods. 1995. En: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.). *Manual of harmful microalgae*. IOC Manuals and Guides. No. 33, UNESCO. Paris. 45-62.
- [3] Lundholm, N., G.R. Hasle, G.A. Fryxell, P.E. Hargraves. 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia lineata*. *Phycologia*. 41:480-97.
- [4] Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel, M.L. Sogin. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding proteins. *Gene*. 71: 491-499.
- [5] Elandoussi, L.M., R. Venail, S. Quijano-Scheggia, M. Fernández-Tejedor, E. Mallat, J. Diogene, E. Garcés, J. Camp, K. Andree. 2006. Molecular tools for the identification of *Pseudo-nitzschia calliantha* and *P. delicatissima* in the Ebre Delta, Spain. In press in "Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae". Copenhagen. Denmark.
- [6] Lundholm, N., O. Moestrup, Y. Kotaki, K. Hoef-Emden, C. Scholin, P. Miller. 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analysis. *Journal of Phycology*, 42: 464-481.
- [7] Mathews, D.H., M.D. Disney, J.L. Childs, S.J. Schroeder, M. Zuker, D.H. Turner. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101:7287-7292.
- [8] Matveeva, O.V., D.H. Mathews, A.D. Tsodikov, S.A. Shabalina, R.F. Gesteland, J.F. Atkins, S.M. Freier. 2003. Thermodynamic criteria for high hit rate antisense oligonucleotide design. *Nucleic Acids Research*. 31:4989-4994.