

Análisis morfológico, molecular y contenido de toxinas de *Dinophysis cf ovum*, registrado en las Rías Baixas en Mayo de 2005

Nicolás Raho¹, Gemita Pizarro², Laura Escalera², Beatriz Reguera²
e Irma Marín¹.

(1) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid,
Cantoblanco, 28049 Madrid.

(2) Instituto Español de Oceanografía, Cabo Estai, Canido, Aptdo 1552, 36200 Vigo.

Resumen

Dinophysis acuminata Claparède et Lachmann es el principal organismo portador de toxinas DSP, causantes de prolongados cierres de extracción de bivalvos, en la costa suratlántica europea (Francia, Irlanda, España y Portugal). No obstante, bajo esta denominación taxonómica se incluyen una serie de morfoespecies de *Dinophysis* cuya característica común es poseer sus grandes placas hipotecales con un contorno que varía entre ovoide, elipsoidal y sub-esférico.

A finales de Mayo de 2006 se registró una repentina floración de un *Dinophysis* sp. de contorno ovalado muy regular, tecas muy delicadas, y talla pequeña (L: 31-42 μm ; W: 22.5-32 μm), fácilmente distinguible del *D. acuminata* típico de las Rías Baixas gallegas. Este *Dinophysis cf ovum*, con morfología próxima a *D. ovum* Schüt y a *D. sphaerica* Stein, es muy similar a los *D. cf acuminata* descritos en Bahía de Thermaikos (Grecia) y en las costas de Huelva. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC/MS) de arrastres ricos en esta especie revelaron un contenido moderado ($< 10 \text{ pg cel}^{-1}$) de ácido okadaico (AO).

El análisis comparado de diferentes regiones del operón del rRNA obtenido a partir de células de *D. cf ovum*, aisladas *in vivo* por micromanipulación, presentan diferencias con respecto a las obtenidas para el *D. acuminata* típico de la región, lo que sugiere una diferente adscripción filogenética.

Introducción

Varias especies del género *Dinophysis* han sido señaladas como las principales responsables de la presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos en Japón, Europa, Chile y Nueva Zelanda. Dada la persistencia de estas especies a lo largo del año, pueden constituir la principal amenaza para la explotación de los recursos marisqueros (cultivados o en bancos naturales) en las regiones costeras expuestas a proliferaciones de *Dinophysis*.

Todos los resultados disponibles confirman la gran variabilidad en cuanto al contenido de toxina por célula que presentan estos organismos,

inclusive entre células de la misma especie y localidad [1,2,3]. A su vez, se observa una gran variedad morfológica intraespecífica [4,5,6], por lo que su correcta identificación resulta difícil.

La identificación taxonómica de especies del género *Dinophysis* se basa fundamentalmente en el tamaño y forma de las dos grandes placas hipotecales, forma de la aleta sulcal izquierda y sus radios, presencia o ausencia de cloroplastos y la ornamentación de las tecas [5]. Estos criterios agregan dificultad a la hora de identificar las especies potencialmente tóxicas que deben ser identificadas en programas de seguimiento. Es, por lo tanto, muy importante el control de la presencia de especies de fitoplancton productores de toxinas en las costas de producción de moluscos así como la cuantificación de las toxinas que se acumulan en las diferentes especies de moluscos, especialmente de moluscos filtradores bivalvos, que captan las células y sus toxinas con gran facilidad.

La biología molecular provee de herramientas que permiten mejorar la identificación de organismos en laboratorio, así como en muestras ambientales. Debido a las dificultades encontradas para establecer especies de *Dinophysis* en cultivo, se emplearon técnicas muy sensibles de amplificación de DNA a partir de células individuales. Recientemente estas técnicas han generado secuencias para un rango de especies de *Dinophysis* y han provisto de datos importantes en cuanto a variabilidad genética dentro del género y su filiación filogenética con otros dinoflagelados [7,8,9].

A finales de Mayo de 2006 se registró una repentina floración de un *Dinophysis sp.* de contorno ovalado muy regular, tecas muy delicadas, y talla pequeña, fácilmente distinguible del *D. acuminata* típico de las Rías Baixas gallegas. Este *Dinophysis cf ovum*, con morfología próxima a *D. ovum* Schüt y a *D. sphaerica* Stein, es muy similar a los *D. cf acuminata* descritos en Bahía de Thermaikos, Grecia (2004) [10].

Materiales y métodos

El muestreo se realizó en la estación de Bueu (Pontevedra), el 12 de Junio de 2006, con bomba sumergible, a 1m de profundidad. Mediante un sistema de salabres superpuestos, se obtuvo un concentrado de la fracción de plancton de 20-70 μm .

Se filtró un volumen conocido del concentrado de plancton para posterior extracción de toxinas lipofílicas y análisis mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC/MS). Previamente se tomó una alícuota de este concentrado y se fijó con lugol para la identificación y conteo de las células fitoplanctónicas contenidas en el extracto. A su vez, se midió la longitud máxima (L), la profundidad (W) y el cingulo (C) de 44 individuos de *D. cf ovum*, y de 6 células pequeñas mediante el micrométrico ocular de un microscopio invertido NIKON ECLIPSE 2000.

La amplificación por PCR del 28s rDNA, a partir de células de *D. cf ovum* aisladas por micromanipulación, se llevó a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Cada célula se lavó 3 veces en agua de mar filtrada y por último en solución tamponada de fosfato (PBS 1X). Las células se transfirieron a tubos eppendorf de 200 µl que contenían 1x tampón de la enzima, 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de los cebadores FD8 (5'-GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG-3') y RB (5'-GATAGGAAGCGACATCGA-3') y 0,025 u/µl Taq DNA Polimerasa (Roche).

Las secuencias obtenidas se compararon con aquéllas disponibles en el GenBank mediante el algoritmo de BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) y se alinearon utilizando Clustal X [11]. Los análisis filogenéticos se realizaron mediante la técnica de "Neighbor Joining".

Resultados

En el muestreo realizado se observó una población formada sólo por dinoflagelados, y en la que la especie dominante era un *Dinophysis* de talla pequeña-mediana, claramente distinguible del *D. acuminata* habitual en las Rías Baixas.

El análisis de las muestras, fijadas con lugol, reveló una población formada sólo por dinoflagelados, y en la que la especie dominante era un *Dinophysis* de talla pequeña-mediana, claramente distinguible del *D. acuminata* habitual en las Rías Baixas. Este *Dinophysis*, al que denominaremos provisionalmente *Dinophysis cf ovum*, constituía el 97% de las especies de *Dinophysis* presentes (Tabla 1).

Especie	Nº cel.	Factor	Cel./mL	%
<i>Ceratium furca</i>	42	6,67	280	5,9
<i>Ceratium fusus</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Ceratium horridum</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Dinophysis acuminata</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Dinophysis caudata</i>	2	6,67	13	0,3
<i>Dinophysis rotundata</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Dinophysis skagii</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Dinophysis cf ovum</i>	333	6,67	2220	47,0
<i>Diplopsalis lenticula</i>	58	6,67	387	8,2
<i>Protoperidinium depressum</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Protoperidinium diabolus</i>	75	6,67	500	10,6
<i>Protoperidinium divergens</i>	7	6,67	47	1,0
<i>Protoperidinium cf leonis</i>	2	6,67	13	0,3
<i>Protoperidinium steinii</i>	65	6,67	433	9,2
<i>Protoperidinium t ovatum small</i>	105	6,67	700	14,8
<i>Scripsiella sp</i>	5	6,67	33	0,7
TOTAL			4727	

Tabla 1. Composición específica y frecuencia de las distintas especies obtenidas en la fracción 20-70 µm .del concentrado de plancton

Las mediciones de células indicaron que se trataba de una especie de *Dinophysis* de talla inferior a *D. acuminata*, con placas hipotocales ovaladas y de textura muy delicada y radio R3 de la aleta sulcal izquierda corto y delicado (Fig. 1 a-b). Por otro lado, las células pequeñas de *D. cf ovum* presentaron una morfología muy distintas de la de *D. skagii*, la angulosa célula pequeña de *D. acuminata* (Fig. 1c).

		L (μm)	W (μm)	C (μm)
<i>Dinophysis cf. ovum</i> (n =44)	Media \pm SD	36,6 \pm 2,4	26,4 \pm 2,1	8,5 \pm 1,2
	Rango	32 - 42	22,5 - 32	7,5 - 12
<i>Dinophysis cf. ovum</i> Células pequeñas (n = 6)	Media \pm SD	27,5 \pm 1,55	19,5 \pm 1,3	6,9 \pm 1,2
	Rango	25.5 - 30	18 - 21	5.8 - 9

Tabla 2. Morfometría (micrométrico ocular) de *D. cf ovum* y sus células pequeñas



Figura 1. Célula vegetativa normal (a), mediana (b) y pequeña (c) de *D. cf ovum*. Micrografía Nomarski (DIC), 600 X, tomada con cámara NIKON en microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE-2000.

El análisis por LC-MS del extracto del concentrado de plancton (Fig. 2) reveló la presencia de niveles bajos de ácido okadaico (OA) (8,5 pg cel^{-1}). Al igual que como es habitual en *D. acuminata*, no se detectó presencia de otras toxinas, tales como las Dinophysistoxinas y Pectenotoxinas (DTX2, PTX2), comunes en extractos de las Rías Baixas que contienen *D. acuta* y/o *D. caudata*.

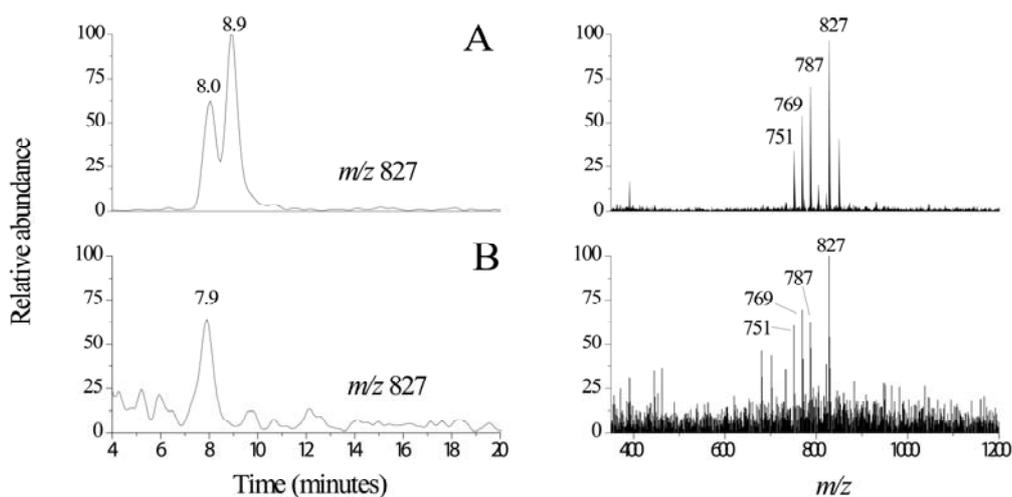


Figura 2. A. Cromatograma de estándar de AO (TR 8,0 min) y DTX2 (TR 8,9 min) (izda.), y espectro m/z de AO estándar. B. Cromatograma de AO (TR 7,9 min) estándar de muestra de concentrado de plancton (20-77 μm) rico en *Dinophysis cf. ovum* (izqda.) y espectro m/z de AO presente en la misma muestra.

Estudios preliminares basados en el estudio de secuencias de la región D8 a D10 del 28s rDNA (Fig. 3) parecen indicar una separación entre la especie en estudio y las otras especies de *Dinophysis* analizadas, lo cual estaría de acuerdo con las diferencias observadas en la morfometría y contenido de toxina por célula.

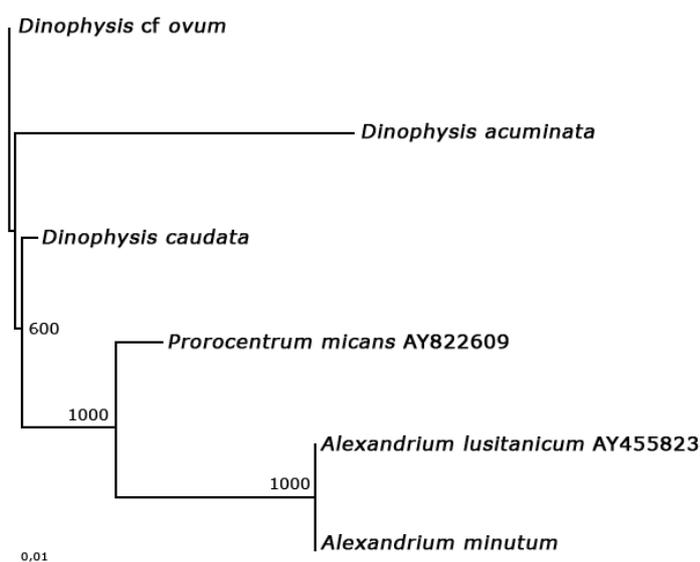


Figura 3. Árbol filogenético inferido por Neighbor Joining basado en secuencias parciales del 28s rDNA (850 pb). Los índices Bootstrap (1000) se observan en los nodos internos.

Discusión

Bajo la denominación taxonómica *Dinophysis acuminata* (o *D. cf acuminata*) se incluyen una serie de morfoespecies (*D. acuminata*, *D. ovum*, *D. sphaerica*, *D. okamurai*, etc.) cuya característica común es poseer las dos grandes placas hipotecales de tamaño medio-pequeño, con un contorno que varía entre ovoide, elipsoidal y sub-esférico. La separación de estas especies al microscopio óptico en contajes rutinarios de programas de seguimiento, y en especial si coinciden en la misma muestra, es muy dificultosa. La diferenciación mediante secuenciación del 28s rDNA y futura preparación de sondas moleculares contra las distintas especies ayudaría a aliviar este problema.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los subproyectos DINOPHYSIS GALICIA y DINOGENES del proyecto coordinado PHYCODISIS (CTM2004-04078-C03). Esto es una contribución al Core Research Project "HABs in Upwelling Systems" del programa GEOHAB de SCOR-COI.

Referencias

- [1] Andersen, P., Hald, B. & Emsholm, H. 1996. Toxicity of *Dinophysis* in Danish coastal waters. En: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 281-284.
- [2] Lee, J.-S., T.T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard, T. Yasumoto. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1:147-152.
- [3] Reguera, B., G. Pizarro. En prensa. Planktonic dinoflagellates which produce polyether toxins of the old "DSP Complex". En: Botana, L. (Ed) *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology physiology and detection*. Taylor and Francis, 2nd edition. Chapter 15.
- [4] Solum, I. 1962. The taxonomy of *Dinophysis* populations in Norwegian waters in view of biometric observations. *Nytt. Mag. Bot.* 10:5-32.
- [5] Larsen, J., Q. Moestrup. 1992. Potentially toxic phytoplankton. 2. Genus *Dinophysis* (Dinophyceae). En: Lindley, J.A. (Ed.). *ICES Identification Leaflets for Plankton*. 180:1-12.
- [6] Reguera, B., S. González-Gil. 2001. Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 37:318-333.
- [7] Rehnstam-Holm, A.S., A. Godhe, D.M. Anderson. 2002. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America. *Phycologia*. 41:348-357.
- [8] Edvardsen, B., K. Shalchian-Tabrizi, K.S. Jakobsen, L.K. Medlin, E. Dahl, S. Brubak, E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.* 39:395-408.
- [9] Hart, M.C., D.H. Green, E. Bresnan, C.J. Bolch. 2007. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. *Harmful Algae*. 6:271-287.
- [10] Koukaras, K., G. Nikolaidis. 2004. *Dinophysis* blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea). *J. Plankton Res.* 26:445-457.
- [11] Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24:4876-4882.