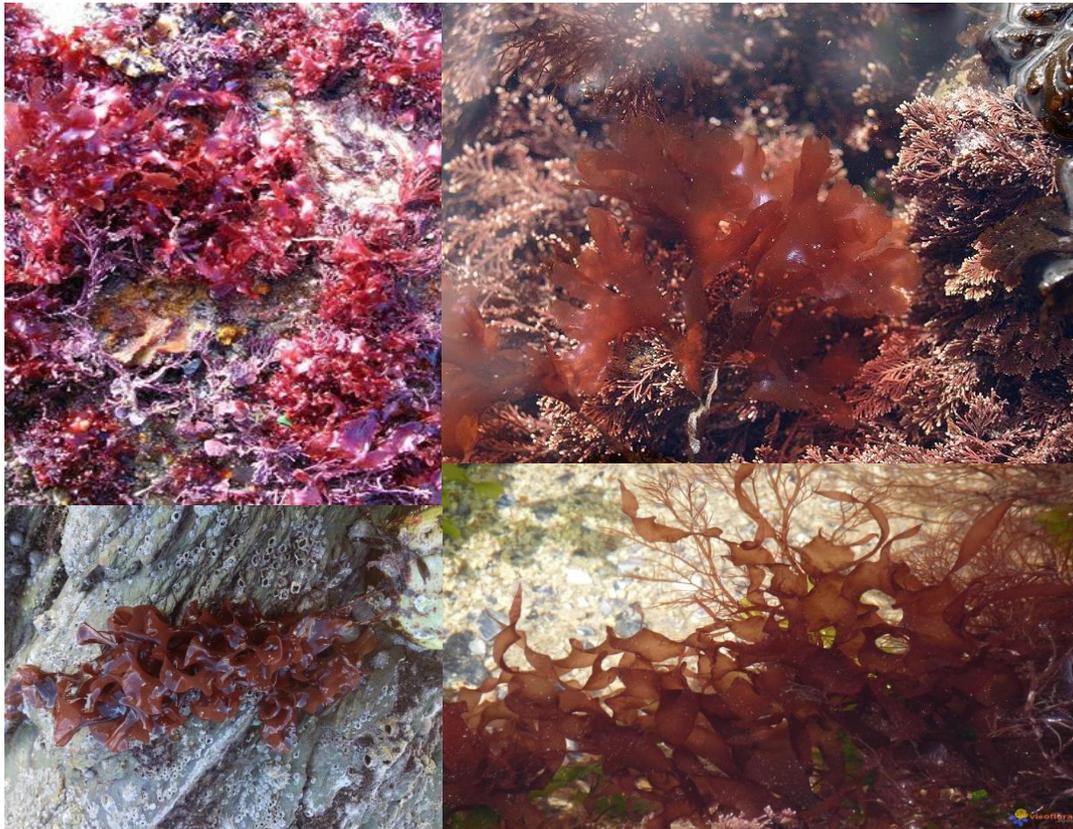




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Identificación y caracterización morfológica y genética de algas invasoras en Asturias



Marcos Montes Berdasco
22-07-2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión
Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Identificación y caracterización morfológica y genética
de algas invasoras en Asturias.

Marcos Montes Berdasco

Firma

José Manuel Rico Ordás

Yaisel Juan Borrell Pichs

Firma

Firma

Índice de contenidos

| | |
|--|---------|
| 1. Introducción | Pág. 1 |
| 1.1. Planteamiento y objetivos | Pág. 3 |
| 2. Materiales y métodos | Pág. 4 |
| 2.1. Sitio de estudio | Pág. 4 |
| 2.2. Muestras de estudio | Pág. 5 |
| 2.3. Análisis molecular | Pág. 9 |
| 2.3.1. Extracción de ADN. | Pág. 9 |
| 2.3.2. PCR | Pág. 9 |
| 2.3.3. Secuenciación | Pág. 9 |
| 2.3.4. Barcoding en genebank y Bold | Pág. 10 |
| 2.3.5. Análisis filogenéticos | Pág. 10 |
| 3. Resultados | Pág. 10 |
| 3.1. Morfología externa de <i>Prionitis sp 3jeju</i> | Pág. 14 |
| 3.2. Morfología externa de <i>Prionitis sp 2 jeju</i> | Pág. 14 |
| 3.3. Morfología externa de <i>Grateloupia turuturu</i> | Pág. 15 |
| 3.4. Análisis filogenético | Pág. 14 |
| 4. Discusión | Pág. 17 |
| 5. Conclusiones | Pág. 24 |
| 6. Bibliografía | Pág. 25 |

RESUMEN

La introducción de especies exóticas marinas y su posible actividad invasiva se considera hoy en día la 3ª gran amenaza global para la biodiversidad. Para evitar estos daños es necesario mantener controles que permitan una certera y rápida identificación de las especies que están invadiendo o siendo introducidas. Los métodos morfológicos muchas veces no son capaces de discernir especies crípticas por lo que hoy en día se usan métodos de identificación genética, con especial relevancia el uso de barcoding. El caso de las algas rojas foliosas es muy característico en Europa, ya que debido a que su simple morfología han ocurrido introducciones crípticas, como el caso de *G. turuturu* que se confundía con *G. doryphora*. La presencia de esta Galicia nos pone en antecedentes, de que esto sucede en costas cantábricas. Por lo que nosotros proponemos un estudio para la identificación de especies crípticas introducidas en Asturias, mediante el uso de técnicas de barcoding usando a COI como marcador principal. Se encontraron dos especies alóctonas, nunca antes descritas en Europa (*Grateloupia hawaiiiana* and *Prionitis sp 3jeju*).

ABSTRACT

The introduction of exotic species and their possible invasive activities are nowadays considered the 3rd greatest threat to global biodiversity. In order to evade these damages it is necessary to maintain regular controls that may allow a quick and precise identification of species that are involved in introduction or invasive process. Morphological identification methods are, in many times, no longer able to discern cryptic species, and so, genetic identification it is gaining new relevance, especially genetic barcoding. A particular case in Europe would be of the foliose red algae because of their simple morphology, cryptic introductions have occurred, like the introduction of *G. turuturu* which was confused with *G. doryphora*. The presence of *G. turuturu* in Galicia gives as enough background to tell that this same process may be happening in Cantabrian coasts as a cryptic invasion. We propose an algae identification study centered on foliose red algae using Barcoding techniques, as COI as the main marker. We found two species that were never described before in Europe (*Grateloupia hawaiiiana* and *Prionitis sp 3jeju*).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haber sido posible sin la colaboración de ciertas personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento:

A Yaisel y a Rico, mis tutores, por su dedicación, entusiasmo, y ante todo paciencia, y también por ser muy majos.

A Eva García Vázquez y a todo el departamento de genética por darme un agradable recibimiento el tiempo en el que he estado trabajando ahí, y a toda la gente que me ayudo ahí.

Al área de Fisiología Vegetal, por dejarme todos los materiales que he necesitado y su gran amabilidad, con mención especial para M.J. Cañal, Luis Valledor, Chus, Mauro y Daniel.

A todos mis compañeros pero en especial a Mario, Alejandro Rivera, Javi Alfaro y a Fran.

Y más importante, a mi novia Lucia, por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

Gracias a todos.

1. INTRODUCCIÓN

La introducción de especies alóctonas en ambientes marinos puede suponer una amenaza para los ecosistemas marinos litorales, al presentar éstas comportamientos potencialmente invasivos, que pueden llegar a competir y desplazar a las especies autóctonas. Dichos comportamientos generan condiciones de estrés que pueden producir, a su vez, en cambios en los ecosistemas, llegando incluso a comprometer la integridad de los mismos. Tan importantes pueden llegar a ser los procesos de invasión de especies exóticas que han sido clasificados como una amenaza global para la biodiversidad, junto a la pérdida de hábitat y la fragmentación (Walker y Steffern 1997), pudiendo repercutir negativamente sobre la economía (Nunnes y Markandia 2008). Las principales fuentes de introducción de estas especies exóticas tienen su origen en la actividad antropogénica: la acuicultura, el transporte de especies exóticas, la circulación por canales y, en especial, junto a los barcos y transportados en todo tipo de actividad portuaria, ya sea de forma local o transnacional, por lo que estas zonas portuarias serían las más proclives a recibir especies exóticas que se asentasen en ellas (Nunnes 2014).

Las macroalgas marinas tienen una gran importancia en los ecosistemas marinos al proporcionar amplios servicios ecológicos: sirven de sustrato para múltiples animales sésiles, proporcionan hábitat a organismos móviles y constituyen una fuente de alimento para muchos de esos organismos (Voerman *et al.* 2013). Así pues, son un elemento relevante a proteger en los ecosistemas marinos puesto que, al aportar oxígeno al agua, gran parte de la comunidad que hay en el hábitat marino depende de ellas (Graham *et al.* 2002).

Un método usual para la identificación de especies exóticas se basa en la caracterización morfológica y fisiológica de las mismas, seguido de un análisis comparativo de dichos caracteres. Sin embargo, es muy común que especies exóticas se establezcan en un ecosistema sin provocar ningún tipo de alarma debido a su naturaleza críptica, al tener una morfología similar a algunas algas autóctonas o debido a una mala caracterización del proceso introductor cuando varias especies alóctonas son similares entre sí. En estos casos, la dificultad de la caracterización morfológica hace necesario utilizar métodos de detección con base genética, como métodos de barcoding (McIvor *et al.* 2001; Saunders 2008), que suponen una herramienta de identificación muy útil y fiable. Esta técnica consiste en el uso de diferencias nucleotídicas en un solo gen para investigar diferencias evolutivas,

especialmente en genes conservados. Los genes plastídicos y mitocondriales son los más usados, ya que pueden mutar más rápido que los nucleares, pudiendo ser usados de forma más específica para la identificación de especies al comparar sus diferencias (Moore 1995). La particularidad del barcoding radica en el uso de una inmensa base de datos, como BOLD o Genbank, para realizar un screening que pueda identificar la especie, usando genes previamente descritos, como el COI (citocromo oxidasa I), que es el gen bioidentificador más usado para animales (Hebert *et al.* 2003). Esta técnica es muy usada para la detección de especies crípticas, así como para detectar múltiples invasiones, incluso de especies vegetales (McIvor *et al.* 2001).

Las algas, y en especial las algas rojas, pueden ser muy difíciles de identificar debido a la relativa simplicidad de su morfología y anatomía así como a la convergencia y plasticidad fenotípica que presentan y la alternancia de generaciones heteromórficas. Por lo tanto, se ha llegado a depender, en gran medida, de herramientas genéticas para realizar taxonomía molecular, aunque impera la necesidad de un gen común y fiable para realizar barcoding, en el caso de las algas se han usado los espacios del *cox 2 y 3*, *rbcl* y *LCU* (variable portions of the large subunit of the ribosomal cistron).

No obstante, parece que el uso de COI, al igual que en animales, puede ser más útil que otros genes debido a que éste revela, generalmente, secuencias de mayor divergencia interespecífica con respecto a *rbcl* y, por lo tanto, puede proporcionar una mejor evidencia de la separación de especies estrechamente relacionadas en macroalgas (Yang *et al.* 2008). El uso de COI presenta mayores ventajas porque también es usado en el resto de reinos, lo que lo haría muy útil al encontrar nuevas especies, especialmente en el caso de algas rojas y pardas, donde se ha sugerido como marcador principal debido a estas y otras características del gen COI como sus regiones más cortas y la cantidad de primers que existen (Saunders y McDevit 2012).

El uso de COI como marcador principal para macroalgas es novedoso, al contrario que el uso de técnicas de barcoding para diferenciar algas, un ejemplo perfecto sería el caso de las algas rojas foliosas en Europa. Se consideraba que *G. lanceola* no era más que un sinónimo taxonómico de *G. doryphora*, dada la gran variabilidad morfológica que pudieron observar entre los numerosos especímenes foliosos de *G. doryphora*. Así, *G. doryphora* se tomó por todas las grateloupias foliosas encontradas en las costas atlántica y mediterránea, citándose en Europa como especie alóctona en 1969, probablemente introducida desde el Océano

Pacífico (Farnham e Irvine 1973). La utilización de métodos de barcoding con rbcL permitieron demostrar que los ejemplares de *G. doryphora* encontrados en la costa atlántica en el norte de España eran en realidad *G. turuturu* yamada en 2002.

Los mismos autores cuestionan, por ello, este criterio taxonómico reduccionista, tendente a reagrupar por su variabilidad morfológica y falta de caracteres diagnósticos definidos muchas de las especies foliosas descritas en el género *Grateloupia*, entre ellas *G. lanceola* (Bárbara y Cremades 2004). A raíz de esto, podemos considerar que el género *Grateloupia* es un género que todavía no ha sido totalmente esclarecido debido a la similitud y la convergencia morfológica existente entre distintas especies.

1.1. Planteamiento y objetivos

La presencia de algas rojas foliosas en las costas asturianas ya ha sido catalogada anteriormente (Cires y Moliner 2010). No obstante, este estudio permite llevar a cabo una nueva aproximación a la identificación de especies y a la comparación de bases de datos (Genbank y BOLD) en el uso de barcoding mediante COI, un marcador que, aun siendo fiable, no tiene una gran universalidad para todas las algas, por lo que se utilizarán primers recomendados por anteriores publicaciones (Saunders y McDevit 2012). En este trabajo se analizan algas rojas foliosas pues suponen un buen ejemplo para demostrar la efectividad de métodos de barcoding para detectar especies crípticas difíciles de identificar por otro tipo de métodos, ya que las características morfológicas no están perfectamente definidas y se ha demostrado anteriormente la gran variación morfológica que presentan.

Los objetivos que se plantean son:

- 1. Detección específica de posibles algas invasoras entre la selección de algas rojas foliosas recogidas en las costas asturianas, la mayoría de ellas crípticas.**
- 2. Comparación de bases de datos (Genbank y BOLD) para la identificación de algas mediante el uso de COI como marcador.**

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio

Este estudio se basa en la detección de posibles especies crípticas introducidas entre las algas rojas foliosas presentes en la costa asturiana. Especímenes de algas rojas fueron recolectadas en los pantalanes del puerto deportivo de Candás y de Gijón, durante la marea baja, separándolas del sustrato al que estaban fijadas con una pala.

El puerto deportivo de Candás, situado en el centro de la costa asturiana, da cobijo a pequeñas embarcaciones y otro tipo de actividades acuáticas. El puerto en sí se podría dividir en dos zonas: la zona antigua más cercana al pueblo, donde puede llegar a haber un calado de 0 metros durante la bajamar; y una zona más exterior en la que eso no ocurre y de cuyos pantalanes se extrajeron las muestras. En cambio, el puerto deportivo de Gijón es un puerto deportivo de mayor tamaño, siendo éste uno de los más importantes de la costa Cantábrica. Es un puerto de construcción relativamente reciente, en el que existe mucho tráfico marítimo de todo tipo, en especial entre puertos regionales, incluyendo el importante puerto comercial de Gijón a 2 km de distancia (El Musel) y que cobija pequeñas y medianas embarcaciones, dependiendo de cuál de sus 4 dársenas se trate.

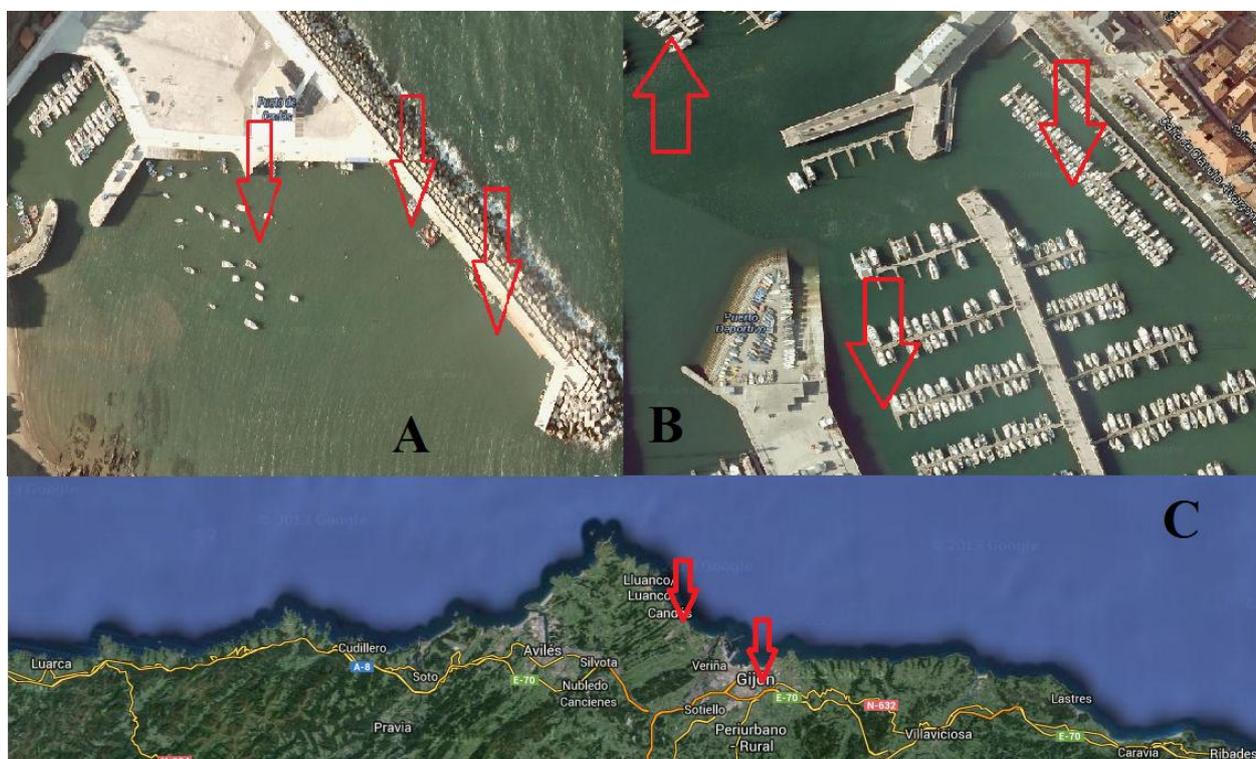


Figura 1. Imagen del puerto de Candás (A) y Gijón (B), marcado con una flecha roja están los pantalanes de donde se recogieron las muestras, y un mapa de Asturias (C) con la posición de los puertos (en la foto A, en Candás estaban los pantalanes cuando se tomó la misma)

Por un comunicado personal se nos informó en autoridad portuaria que una dársena acogía yates y otro tipo de embarcaciones privadas que hacían rutas internacionales, una zona de interés de la que se extrajeron muestras, junto a los pantalanes de las dársenas contiguas.

Tabla 1: Especímenes extraídos, lugar de extracción e identificación que se sospechó *a priori*, junto a muestras obtenidas del herbario

| Identificación a priori | Espécimen | Lugar | Identificación a priori | Espécimen | Lugar |
|------------------------------|-----------|-----------------|---------------------------------|-----------|--------------|
| <i>Kallymenia</i> | K?1 | Gijón | <i>Delesseriaceae</i> | RD | Candás |
| <i>Nyctophilum</i> | NY2 | Gijón | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | Rho 1 | Candás |
| <i>Squizimena</i> | SPI | Gijón | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | Rho 2 | Candás |
| <i>Phylophora</i> | P? | Gijón | <i>Grateloupia lanceola</i> | LAN 3 | Candás |
| <i>Grateloupia turuturu.</i> | GTU | Gijón | <i>Dilsea</i> | DIL 2 | Candás |
| <i>Grateloupia lanceola</i> | G?2 | Gijón | <i>Grateloupia turuturu.</i> | TURU 1 | Candás |
| <i>Kallymenia</i> | KP | Gijón | <i>Phylophora</i> | PH1 | Candás |
| <i>Kallymenia</i> | K?2 | Gijón | <i>Phylophora</i> | PH2 | Candás |
| <i>Grateloupia lanceola</i> | G?1 | Gijón | <i>Grateloupia lanceola</i> | LAN 2 | Candás |
| <i>Nyctophilum</i> | NY 1 | Gijón | <i>Grateloupia turuturu.</i> | TURU 3 | Candás |
| <i>Polyneura</i> | PN | Gijón | <i>Grateloupia turuturu.</i> | TURU 4 | Candás |
| <i>Phylophora</i> | PY 1 | Gijón | <i>Squizimena/G turuturu</i> | EST | Candás |
| <i>Phylophora</i> | PY 2 | Gijón | <i>Grateloupia turuturu.</i> | TURU 2 | Candás |
| <i>Grateloupia</i> | GX? | Santander | <i>Dilsea</i> | DIL 1 | Candás |
| <i>Grateloupia turuturu.</i> | FCO 2078 | Tapia, 2010 | <i>Grateloupia lanceola</i> | LAN 1 | Candás |
| <i>Grateloupia filicina</i> | FCO 498 | Valdes, 1996 | <i>Grateloupia turuturu.</i> | FCO 2077 | Candás, 2010 |
| <i>Grateloupia doryphora</i> | FCO 1583 | La Coruña, 2001 | <i>Grateloupia turuturu.</i> | FCO 2076 | Candás, 2010 |
| <i>Grateloupia doryphora</i> | FCO 1584 | La Coruña, 2001 | <i>Grateloupia filicina</i> | FCO 470 | Gozon |
| | | | <i>Grateloupia turuturu.</i> | FCO 2133 | Valdés |

2.2. Recolección de muestras

Las algas se recogieron en los pantalanes señalados en las fotos (Fig. 1A) y, siguiendo criterios morfológicos, solo se tomaron algas rojas foliosas. Las muestras se clasificaron morfológicamente *a priori* y se preservaron, a continuación, a -20 °C hasta su extracción. Además se recolectaron secuencias de COI de otros trabajos para el análisis filogénico. (Tabla 2)

Tabla 2. Especies utilizadas para el análisis genético, incluyendo algas obtenidas del herbario con su taxón obtenido, *a priori*, por métodos de identificación morfológica, además de especímenes obtenidos de otras publicaciones. Se incluyen los autores de la recolección y los códigos de la secuencia.

| Taxón | Código | Lugar de recogida | Fecha de recogida y colector | Código genbank/id secuencia |
|---------------------------|-------------------|--------------------------|--|------------------------------------|
| <i>G. turuturu</i> | FCO 2076 | | J M Rico | |
| <i>G. turuturu</i> | FCO 2077 | | J M Rico | |
| <i>G. turuturu</i> | FCO 2078 | | J M Rico | |
| <i>G. filicinia</i> | FCO 496 | | J M Rico | |
| <i>G. doryphora</i> | FCO 1583 | La Coruña | J M Rico | |
| <i>G. doryphora</i> | FCO 1584 | La Coruña | J M Rico | |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | ABMMC1123 8-10 | Cheju-do, Sur corea | Gary W. Saunders, Han-Gu Choi, 2010- 05-18 | HQ919268/ |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | ABMMC1189 7-10 | Cheju-do, Sur corea | Gary W. Saunders, Han-Gu Choi, 2010- 05-19 | HQ919283 |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | ABMMC1192 6-10 | Cheju-do, Sur corea | Gary W. Saunders, Han-Gu Choi, 2010- 05-20 | HQ919284 |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | OZSEA952-10 | Australia oeste | Saunders, K Dixon, 2010-11-13 | /4042538 |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | OZSEA953-10 | Australia oeste | Saunders, K Dixon, 2010-11-13 | /3797516 |
| <i>Prionitis sp 2jeju</i> | OZSEA958-10 | Australia oeste | Saunders, K Dixon, 2010-11-13 | /3797552 |
| <i>Prionitis sp 3jeju</i> | ABMMC1172 2-10 | Cheju-do, Sur corea | Saunders, 2010- 05-20 | |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1024 6-10 | Connectic ut | B. Clarkston, D. McDevit, M. Bruce, A. Savoie, C. Longtin, 2010-04-15 | /4010367 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1043 9-10 | New South Gales | J. Carey, 2010-03-28 | HM915221/3529954 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1044 0-10 | New South Gales | J. Carey, 2010-03-29 | HM915222/3529955 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1044 1-10 | New South Gales | J. Carey, 2010-03-30 | HM915223/3529956 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1302 0-10 | Tasmania | F. Scott, 2010-05-14 | HQ919329/3648858 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1302 1-10 | Tasmania | F. Scott, 2010-05-15 | HQ919330/3648859 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1360- 07 | Tasmania | Gary Saunders, 2005-01-25 | /3002928 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1477 7-11 | Tasmania | F. Scott, 2010-05-17 | /3952885 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC1645 2-11 | China | M.H. Hommersand, 25-06-1994 | /4505067 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC4968- 09 | Tasmania | G.W. Saunders, 2002-11-25 | HM915909/3427486 |
| <i>G. turuturu</i> | ABMMC7808- 10 | Tasmania Hokkaido, | G.W. Saunders & K. Dixon, 2010 – 01 - 23 | HM917916/3488584 |
| <i>G. turuturu</i> | HOKUP012-10 | Japon | N.Yotsukura & T.Abe, 2009-11-30 | HQ566782/3633036 |

| | | | | |
|---|-------------------|---------------------------------------|---|------------------|
| <i>G. turuturu</i> | HOKUP013-10 | Hokkaido, Japon | N.Yotsukura & T.Abe, 2009-11-31 | HQ566783/3633037 |
| <i>G. turuturu</i> | HOKUP014-10 | Hokkaido, Japon | N.Yotsukura & T.Abe, 2009-11-32 | HQ566784/3633038 |
| <i>G. turuturu</i> | REDEU342-11 | Bretaña, Francia | Line Le Gall, Jose Maria Utge, Florence Rousseau, L-E Hochart , 2008-07-16 | /3878161 |
| <i>Grateloupia sp 2LLG</i> | REDEU254-11 | Bretaña, Francia | Line Le Gall, Florence Rousseau, L-E Hochart , 2008-07-07 | LLG1462/3878154 |
| <i>Grateloupia sp 2LLG</i> | REDEU296-11 | Bretaña, Francia | Line Le Gall, Jose Maria Utge, Florence Rousseau, L-E Hochart , 2008-07-15 | LLG158/3878252 |
| <i>Grateloupia sp 2LLG</i> | REDEU343-11 | Bretaña, Francia | Line Le Gall, Jose Maria Utge, Florence Rousseau, L-E Hochart , 2008-07-16 | LLG1774/3878209 |
| <i>Grateloupia phuquocensis</i> | ARS02442 | Hawaii | Sherwood,A.R., Kurihara,A., Conklin,K.Y., Sauvage,T. Presting,G.G., (2010) | |
| <i>Grateloupia californica</i> | ABMMC114- 06 | Columbia britanica, Canada | Bamfield, Dixon I., 2004-06-22 | |
| <i>Grateloupia americana</i> | | Columbia britanica, Canada | Gary Saunders, 19-09-2005 | |
| <i>Prionitis Stenbergi</i> | ABMMC1199 9-9 | British Columbia | G.W. Saunders, K. Hind & B. Clarkston, 2011-05-05 | /4050604 |
| <i>Prionitis Stenbergi</i> | ABMMC1199 9-10 | California | B. Clarkston, K. Hind, 2010-05-18 | /3617871 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | MANC001-12 | North Carolina | DW Freshwater, B Deagan, 2009-06-24 | KC567671/4894426 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | MANC002-12 | North Carolina | DW Freshwater, B Deagan, 2009-06-24 | KC567674/4894427 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | ABMMC1568- 07 | Texas, EE UU | R. Withall, 2007-02-17 | HM033146/2641584 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | ABMMC1569- 07 | Texas, EE UU | R. Withall, 2007-02-17 | HM033147/2641585 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | MANC009-12 | North Carolina | DW Freshwater, B Deagan, 2009-06-24 | KC567677/4894434 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | MANC028-13 | North Carolina | DW Freshwater, 2013-02-18 | KF367754/5123891 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | MANC062-12 | North Carolina | DW Freshwater, K. D. Turner, 2013-10- 05 | KJ202084/5815410 |
| <i>Phyllophora pseudoceranoides</i> | ABMMC1580- 07 | New Broomstic k, Canada | GWS, D. Saunders, L. LeGall & D. McDevit, 2006-12-03 | GQ380364/2816953 |
| <i>Phyllophora pseudoceranoides</i> | ABMMC1585- 07 | Rhode Island, EE UU | GWS, B. Clarkston, D. McDevit, S. Clayden & S. Hamsher, 2007-04-23 | GQ380362/2816954 |
| <i>Phyllophora pseudoceranoides</i> | ABMMC194- 06 | Nueva Escocia, Canada | Gary W. Saunders, 2004-9-01 | GQ380363/2816957 |
| <i>Phyllophora pseudoceranoides</i> | ABMMC3117- 08 | Prince Edward Island, Canada | B. Clarkston, K. Dixon & K. Roy, 2007-08- 19 | GQ380370/2816950 |
| <i>Phyllophora</i> | ABMMC620- | Maine, EE | Gary Saunders, L. LeGall, D. McDevit, S. | GQ380367/2816955 |

| | | | | |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|---|------------------|
| <i>pseudoceranooides</i> | 06 | UU | Clayden & C. Lane, 2006-04-25 | |
| <i>Helmintocladia hudsonii</i> | CNEM003-10 | Finisterre, Francia | Line Le Gall, Jose-Maria Utge, Yannis Turpin, 2009-08-12 | HQ603219/3710091 |
| <i>Grateloupia filicinia</i> | HQ422590 | Hawaii | Sherwood,A.R., Kurihara,A., Conklin,K.Y., Sauvage,T. and Presting,G.G., 2010-10-19 | HQ422590 / |
| <i>Grateloupia eliptica</i> | G014 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475023/ |
| <i>Grateloupia eliptica</i> | G122 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475021/ |
| <i>Grateloupia eliptica</i> | GM03 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475015/ |
| <i>Grateloupia lanceolata</i> | G021 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475005/ |
| <i>Grateloupia lanceolata</i> | G122 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475010/ |
| <i>Grateloupia lanceolata</i> | MI06 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475007/ |
| <i>Grateloupia lanceolata</i> | JH100130 | Jeju, Corea del Sur | Yang,M.Y., Han,E.G. and Kim,M.S., 2012-8-10 | JX475008 |
| <i>Grateloupia catena</i> | ARS02443 | Hawaii | Sherwood,A.R., Kurihara,A., Conklin,K.Y., Sauvage,T. and Presting,G.G., 2010-10-19 | HQ422588 |
| <i>Grateloupia catena</i> | ARS02444 | Hawaii | Sherwood,A.R., Kurihara,A., Conklin,K.Y., Sauvage,T. and Presting,G.G., 2010-10-20 | HQ422589 |
| <i>Grateloupia sp</i> | GWS003281 | British Columbia | Verbruggen,H., Maggs,C.A., Saunders,G.W., Le Gall,L., Yoon,H.S. and De Clerck,O., 2009-7-31 | GQ497308 |
| <i>Grateloupia angusta</i> | ABMMC1172-5-10 | Cheju-do, Corea del Sur | Gary W. Saunders, Han-Gu Choi, 2010-05-20 | /3618705 |
| <i>Grateloupia angusta</i> | ABMMC1174-2-10 | Cheju-do, Corea del Sur | Gary W. Saunders, Han-Gu Choi, 2010-05-20 | 3618717 |
| <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | RDW502 | Texas, South Jetty | Saunders,G.W. and McDonald,B., 2010-05-25 | HM033145 |
| <i>Grateloupia hawaiiiana</i> | ARS02004 | Hawaii | Sherwood,A.R., Kurihara,A., Conklin,K.Y., Sauvage,T. and Presting,G.G. 2010-10-19 | HQ422635 |

2.3. Análisis molecular

2.3.1. Extracción de ADN.

Se extrajeron entre 20 mg y 70 mg de muestra tanto de las procedentes de herbario como de las muestras frescas obtenidas en el puerto. La cantidad óptima de tejido para la extracción de ADN varió dependiendo de la muestra, su estado de conservación y el tejido en cuestión. Se trituró el tejido en mortero utilizando nitrógeno líquido y, a continuación, se transfirió el material pulverizado a un eppendorf de 1,5 ml para la extracción de ADN que se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit de extracción de ADN de EURX. El ADN extraído se conservó a -20 °C.

2.3.2. PCR

Se llevó a cabo una PCR dirigida a la amplificación del gen mitocondrial COI (citocromo oxidasa I) del ADN extraído en el apartado anterior. Los primers utilizados en la PCR fueron Gaz F1 (TCAACAAATCATAAAGATATTGG) y Gaz R4 (AAAATCAAATAAATGCTG) descritos en Saunders (2012) bajo estas condiciones: 3 mM de MgCl₂; 1x de Buffer PCR; 2,4 mM de dNTPs; 0,3 µM de ambos primers y 1u de Taq Polimerasa en un volumen de 20 µl, 2 de ellos son extracto.

La PCR se realizó perfil de amplificación descrito en Saunders y Moore (2013): 2' a 94 °C, 5 ciclos de 30" a 94 °C, 30" de 42 °C para annealing y 1' a 72 °C para la extensión; seguido de 35 ciclos de 30" a 94 °C, 30" a 46,5 °C para annealing y 1' a 72 °C para extensión; y, a continuación, una extensión final a 72 °C durante 7'.

2.3.3. Secuenciación.

Tras completarse la PCR se cortó la banda observada para aislarla y fue sometida a una extracción de banda en agarosa, siguiendo el protocolo marcado por el kit de extracción de agarosa de EURX. A continuación se procedió al cálculo aproximado de la cantidad de ADN puro obtenido, mediante el uso de un marcador y se envió a Macrogen para su secuenciación.

2.3.4. *Barcodingen BOLD y Genbank.*

Las secuencias de COI obtenidas en el apartado anterior se procesaron en el programa Bioedit. Se eliminaron aquellas secuencias poco fiables y se utilizaron únicamente las partes de la lectura que no tenían ningún tipo de interferencia. Una vez hecho esto se procedió a la comparación de cada una de las secuencias con las bases de datos de Ncbi y de BOLD, la identificación de especímenes se obtuvo por similitud entre las secuencias mayor al 97 %.

2.3.5. *Análisis filogenético.*

Usando el software Bioedit se alinearon mediante clustalW y se eliminaron gaps de todas las secuencias de COI, que no contenían deleciones, inserciones o sin sentidos, pero presentaba variaciones en el tamaño de la secuencia fiable dependiendo de la muestra. Se usaron las muestras extraídas del puerto junto a las que aparecen en la Tabla 1, entre las que se encuentran aquellas a las que el Barcode en BOLD y Genbank otorgó máxima similitud. Tras esto, se utilizó el software MEGA v6 para realizar el análisis filogenético. Se consideró que el mejor método posible para realizar este análisis era el de Tanamura Nei con el uso de la distribución Gamma y asumiendo sitios invariables (TN93+G+I), se combinó este método con un bootstrap de 1000 réplicas.

3. RESULTADOS

En este estudio se realizó un análisis de barcoding, comparando el resultado de cada secuenciación de COI con dos bases de datos: Genbank y BOLD. Ésta última es la que más posibilidades de proporcionar identificaciones tiene (similitud >97 %) ya que cuenta con mayor número de aportaciones de secuencias COI extraídas de algas rojas, ya que apostaban activamente que el marcador principal para algas rojas debía ser COI (Saunders 2005; Saunders 2008; Freshwater *et al.* 2010).

De 38 muestras analizadas, 36 muestras fueron identificadas (gracias a BOLD en 36 casos y a Genbank en 4 casos) mediante el uso de secuencias de 600 pb de la región COI, aproximadamente en todos los casos, cortadas mediante el programa Bioedit.

Esas secuencias se usaron junto a las mostradas en la Tabla 2 para crear un árbol filogenético, con la intención de aclarar las relaciones entre las especies recolectadas (Fig. 6). Usando el programa MEGA v6 se eliminaron los gaps para poder alinear todas las secuencias, utilizando 530 pb para el árbol filogenético.

Se puede observar que la mayor cantidad de identificaciones positivas se corresponde con la base de datos de BOLD (Tabla 2), mientras que usando Genbank las identificaciones positivas son menos frecuentes, solo para *Grateloupia hawaiiina* ocurren 2 positivos, pero aun así la correlación es mayor con BOLD para *Prionitis sp 2jeju*. En general la media de identificaciones positivas de BOLD es muy superior a la de Genbank usando el gen COI como marcador molecular. En base a esto se puede concluir que BOLD es mejor herramienta para el barcoding.

Se puede observar como una gran cantidad de muestras son *Prionitis sp 3jeju* (Tabla 2), un alga descrita por Saunders en Cheju-do (una provincia de Corea del Sur), seguida en abundancia se encuentra *Prionitis sp 2jeju* encontrado en el oeste de Australia y en Cheju-do. Por otra parte, *Rhodymenia pseudopalmata* tiene una similitud de 99,6 % o superior con las muestras PH1, PH2 y Rho, esta especie ya ha sido descrita en Europa, una especie autóctona. También se encontró *Grateloupia sp 2LLG* con una similitud del 100 % en Valdés, especie que corresponde a la muestra FCO 498; *Helminthocladia hudsonii*, en Santander, con una similitud del 99,8 % corresponde a la muestra Gx; y *Delesseriaceae sp. MAR1* en Candás, correspondiendo a las muestras RD, y en Gijón con NY2, NY1, con unas similitudes del 99,2 % en Candás y del 100 % en Gijón. Todas estas especies al ser reportadas en Europa, y ser muy probablemente alóctonas no son de interés, a diferencia de las *Grateloupias* y *Prionitis*, de origen asiático.

Tabla 2. Resultados de los análisis genéticos mediante técnicas de barcoding utilizando el marcador COI, comparando el uso de las bases de datos de BOLD y Genbank, del ncbi. Se muestran en color grisáceo aquellas que no consiguieron suficiente similitud como para ser identificadas.

| Lugar | Espécimen | Identificación BOLD | Pct(%) | Máxima similitud en Ncbi (Genbank) | Pct.(%) |
|-----------------|-----------|---------------------------------|--------|--|---------|
| Candás | RD | <i>Delesseriaceae sp. MAR1</i> | 100 | <i>Glaphyrymenia sp. 1WA</i> | 86 |
| Gijón | NY2 | <i>Delesseriaceae sp. MAR1</i> | 100 | <i>Glaphyrymenia sp. 1WA</i> | 86 |
| Valdes, 1996 | FCO 498 | <i>Grateloupia sp. 2LLG</i> | 100 | <i>Grateloupia angusta</i> | 90 |
| Candás | Rho1 | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | 100 | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | 93 |
| Gijón | P? | <i>Prionitis sp. 2Jeju</i> | 99,8 | <i>Grateloupia hawaiiiana voucher ARS02004</i> | 99 |
| Santander | GX? | <i>Helminthocladia hudsonii</i> | 99,8 | <i>Helminthocladia hudsonii voucher LLG3000</i> | 99 |
| Candás | LAN 1 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Candás | Rho 2 | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | 99,7 | <i>Rhodymenia pseudopalmata voucher NCWeed-065</i> | 94 |
| Candás | LAN 3 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Candás | DIL 2 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Tapia, 2010 | FCO 2078 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | GTU | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Candás, 2010 | FCO 2076 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | G?2 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Candás | TURU 1 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | SPI | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Candás | TURU 2 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | KP | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Candás | DIL 1 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Candás | PH1 | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | 99,7 | <i>Rhodymenia pseudopalmata voucher NCWeed-065</i> | 93 |
| Candás | PH2 | <i>Rhodymenia pseudopalmata</i> | 99,6 | <i>Rhodymenia pseudopalmata voucher NCWeed-065</i> | 93 |
| Candás | LAN 2 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,6 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | K?1 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,6 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Gijón | K?2 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Candás | TURU 3 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Candás | TURU 4 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | G?1 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Candás, 2010 | FCO 2077 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| La Coruña, 2001 | FCO 1584 | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99,5 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | NY 1 | <i>Delesseriaceae sp. MAR1</i> | 99,2 | <i>Glaphyrymenia sp. 1WA</i> | 86 |
| Candás | EST | <i>Prionitis sp. 3Jeju</i> | 99 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 95 |
| Gijón | PY 1 | <i>Prionitis sp. 2Jeju</i> | 99,8 | <i>Grateloupia hawaiiiana voucher ARS02004</i> | 99 |
| Gijón | PY 2 | <i>Prionitis sp. 2Jeju</i> | 100 | <i>Grateloupia hawaiiiana voucher ARS02004</i> | 99 |
| La Coruña, 2001 | FCO 1583 | <i>Grateloupia Turuturu.</i> | 100 | <i>Grateloupia phuquocensis voucher ARS02441</i> | 93 |
| Valdés | FCO 2133 | <i>Prionitis sp 3jeju</i> | 99,7 | <i>Grateloupia lanceolata voucher HAL036</i> | 96 |
| Gozon | FCO 470 | No match | | <i>Phycodrys rubens voucher GWS013862</i> | 92 |
| Gijón | PN | No match | | <i>Phycodrys rubens voucher GWS013863</i> | 92 |

3.1. *Prionitis sp 3jeju*

Prionitis sp. 3jeju es un espécimen aislado en Corea del Sur, siendo la única identificación posible en el Barcoding por BOLD (alcanzando un 99% de correlación o incluso más con la gran mayoría de los especímenes encontrados en Gijón y Candás). En las imágenes se puede observar una cierta variabilidad morfológica, pero todas compartían elementos morfológicos comunes, como las láminas largas lanceoladas, de textura lubricosa, un color rojo o amarronado, lo cual concuerda con la descripción hecha por Okamura en 1935, que afirmaba que *G. lanceolata* era un alga con hojas superiores de entre 10 y 70 cm, de un color rosáceo, rojo o marrón y con una textura lubricosa y con forma lanceolada, de 3 a 15 cm de ancho, lo cual es una descripción parecida a la de *Prionitis sp 3jeju*.



Figura 3. **A)** FCO 2077, recogida en Candás, identificada *a priori* como *Grateloupia turuturu*. **B)** FCO 2078: recogida en Candás e identificada como *G. turuturu*. **C)** TURU, muestra extraída en Candás, **D)** FCO 1584 y recogida en La Coruña, identificada como *G. doryphora*. **E)** FCO 2078. Identificada como *G.turuturu*. **F)** *Prionitis sp 3jeju* extraída por Saunders, foto extraída de BOLD.

3.2. *Prionitis sp 2jeju*

Prionitis sp 2jeju es un alga ramificada dicotómicamente, de color rojizo, y con unas láminas relativamente gruesas que se unen en un centro cilíndrico; más allá de esta descripción, se pueden observar claramente parecidos entre la morfología de *G hawaiiiana* y *Prionitis sp 2jeju*, ya que Dawson en 1958 describía a *G. hawaiiiana* como un alga con talos de 16 cm de altura y de entre 7 - 25 mm de ancho, una mata redondeada de hojas planas, dicotómicamente ramificadas, cuneadas en la base de una muy delgada, cilíndrica estípote de 5-6 mm (Fig. 4).



Figura 4. A) Muestra P, recogida en Gijón. B) *Prionitis sp 2 jeju*, identificada por Saunders, imagen recogida de BOLD. C) PY1 recogida en Gijón. D) *Grateloupia Hawaiiiana*, imagen recogida de Algae Base.

3.3. *Grateloupia turuturu*

Según Yamada (1941) es un alga cuyas hojas superiores miden de 10 a 70 cm, de color que varía del rosa al rojo oscuro, tienen una forma lanceolada y son simples o están irregularmente divididas en un plano (Fig. 5).

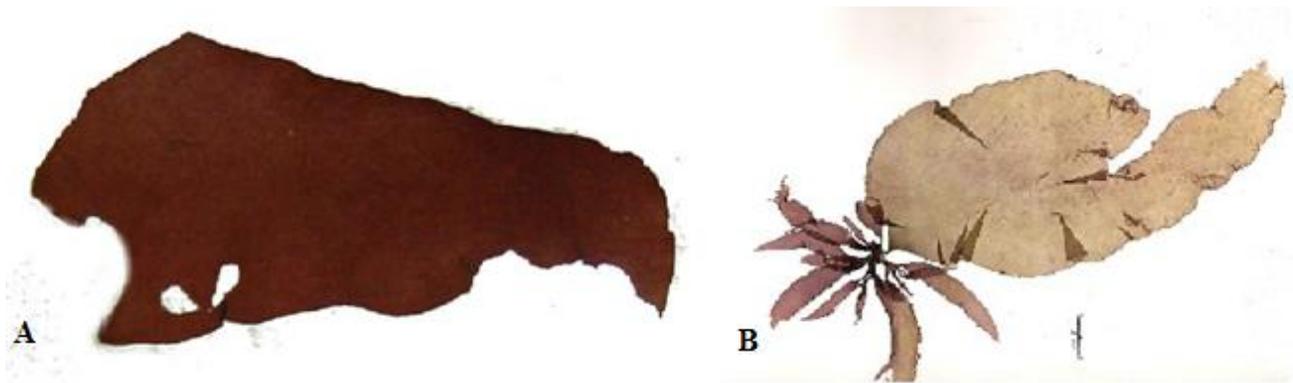


Figura 5. A) FCO 1583, recogida en La Coruña, identificada como *G. doryphora*. B) *Grateloupia turuturu*; Imagen extraída de BOLD.

Originalmente comentada como *Grateloupia doryphora*, esta alga tenía unas características morfológicas muy variadas, pero aquí se pueden apreciar claras similitudes, pues tanto *G. lanceola* como *G. turuturu* y *G. doryphora* presentan caracteres muy generales que pueden llevar a confusión, como mínimo, en la caracterización de morfología externa.

3.4. Relaciones filogenéticas

En el esquema filogenético (figura 6) se distinguen claramente 3 bloques. Uno distinguiendo *G. turuturu* y algunas *Grateloupias*; otro distingue a *G. lanceolata* y *Prionitis sp 3jeju*, paralelo a esos 2 grupos, se distingue el tercer grupo que representa *G. hawaiiiana* o *Prionitis sp 2jeju*, lo que sugiere que pudiesen tener un ancestro común que divergió en *G. turuturu* y luego otro que dio lugar a *Prionitis sp 2jeju* y *G. lanceolata* y *Prionitis sp 3jeju*. También se incluyeron *Rhodomenias pseudopalmata*, *Philophoras sp.* y *Helmintocladia sp.* como grupos externos para poder enraizar el árbol.

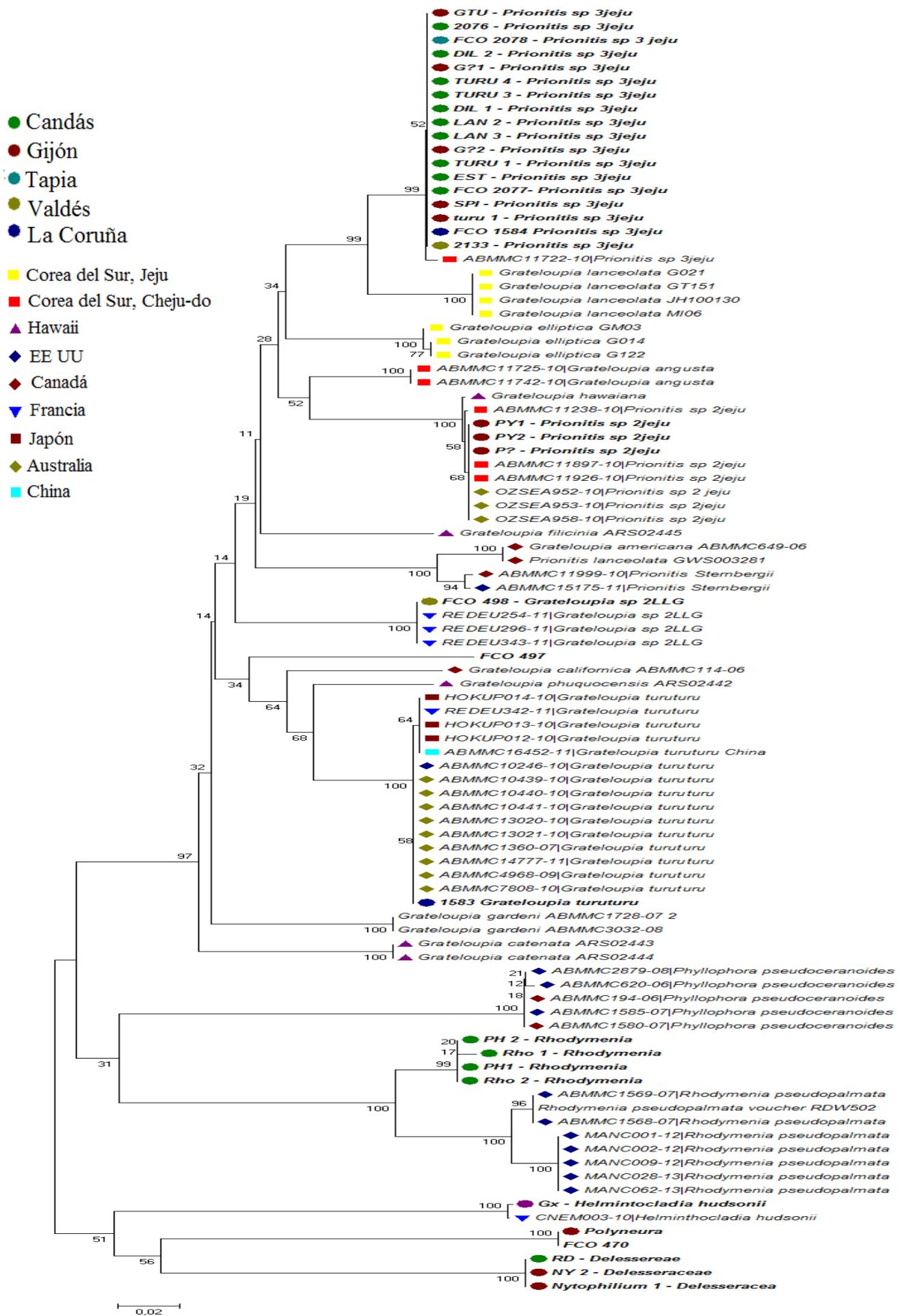


Figura 6: Árbol filogenético tipo Neighbour-Joining mediante el uso de COI de 530 pb, y un modelo Tamura nei asumiendo distribución gamma y sitios invariables. Se muestra el árbol consenso, tras aplicar 1000 réplicas de bootstrap

4. DISCUSIÓN

El uso de técnicas de barcoding con COI para la identificación de algas rojas es, tal y como se ha demostrado en este estudio, muy eficiente, llegando a detectarse hasta 7 especies distintas, la gran mayoría muy diferentes a lo que se pensó que era a priori, con excepción de *Rhodymenia*.

Genbank vs bold

De todas las especies identificadas, tres son, con cierta seguridad, introducciones. Una de ellas, *G. turuturu*, ya fue descrita anteriormente en Galicia como especie introducida (Bárbara *et al.* 2002) siendo recolectado también en Galicia, a su vez, el espécimen que hemos identificado en este trabajo. En la costa asturiana, no obstante, se han detectado dos especies que no han sido reportadas en Europa anteriormente. Se trata de las algas *Prionitis sp 3jeju* y *Prionitis sp 2jeju*. *Rhodymenia pseudopalmata* es, en cambio, una alga común en Golfo de Vizcaya y fue descrita anteriormente en las costas españolas (Miranda *et al.* 1936). *Helminthocladia hudsoni*, fue descrita en Francia por Le Gall y Saunders (2010) y cuyo género ha sido reportado en Asturias al menos una vez. *Grateloupia sp 2LLG* que ha sido recolectada en las costas atlánticas de Francia; y *Delesseriaceae sp. MAR1*, detectada también en las costas europeas. La identificación de estos especímenes, a pesar de ayudarnos a demostrar la gran eficacia del barcoding con COI como método de identificación fiable de algas marinas, no son de especial interés al no tratarse de especies introducidas o no reportadas previamente.

Durante este estudio comparamos dos bases de datos, BOLD y Genbank, en la identificación por barcoding. A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que la base de datos más fiable para la identificación de algas rojas (usando el marcador COI) es BOLD, pues dio identificación positiva en todas las búsquedas y se demostró, a su vez, que COI es un marcador molecular con numerosas ventajas, ya que la reducida universalidad de los primers para realizar amplificaciones se compensa con la existencia de una gran cantidad de primers disponibles que se usan en todos los reinos (por ejemplo, el primer Gaz F1 que utilizamos se usa, normalmente, en animales). Además, destaca la amplia fiabilidad que ofrece el uso de COI en el barcoding en sí (reportada previamente por varios autores, Saunders 2005; Freshwater *et al.* 2010), así como su mayor conveniencia al ser mucho más corto que el otro gran gen utilizado en barcoding, el *rbcl* (que mide 1200 pb en comparación

con 600 de COI), por lo que es más fácil de secuenciar (probablemente más barato también), siendo especialmente útil para estudios en los que se necesite una rápida identificación de algas rojas. No obstante, ya se comentó anteriormente que COI es un mejor marcador para distinguir especies dentro del mismo género y especies muy correlacionadas, lo cual lo hace más útil para detectar especies crípticas, pero puede dar problemas entre géneros distintos al intentar hacer grandes filogenias (Sherwood *et al.* 2010).

En lo que respecta a la calidad de las bases de datos de Genbank y BOLD, cabe mencionar que en solo 4 casos, con *Grateloupia hawaiiiana* el Genbank consiguió una identificación al 99 % para 3 muestras, a pesar de ser aun así superada por la BOLD con *Prionitis sp 2jeju* en los 3 casos y con *Helmintocladia hudsonii* con la que BOLD y Genbank coincidieron en la identificación. Pero la inequidad de poder identificador entre BOLD y Genbank para comparar algas rodófitas foliosas, queda patente al pasar secuencias de COI extraídas de Genbank (con el propósito de realizar el árbol filogenético) por el sistema BOLD, pues en el caso de *Grateloupia americana* y *Grateloupia sp.* el BOLD les otorga un 100% de similitud con *Prionitis lanceolata*, además para si observamos el esquema filogenético, vemos como ambas, *G. americana*, *Prionitis lanceolata*, *Grateloupia sp.*, y *Prionitis stembergensis* (obtenido de Globalmirror) anidan juntos en el esquema.

Tras esto parece razonable concluir que BOLD es mejor base de datos para uso de barcoding, al menos en lo que respecta a halymeniales, y que es posible que Genbank no esté tan actualizado como BOLD.

Análisis filogenético

Este análisis nos permite ver la distribución filogenética de las especies. Se vislumbra tras el mismo que la mayoría de las especies analizadas están emparentadas de forma cercana con el orden *Halymeniales* y al género *Grateloupia*, para ser más concretos, estas además están más emparentadas con algas analizadas en costas asiáticas, así que podría decir con bastante seguridad que *Prionitis sp 3jeju* y *Prionitis sp 2jeju* son especies introducidas, descritas en costas asiáticas principalmente y solo en zonas del Pacífico, no en costas Europeas.

Por otra parte se ve en la distribución del cuadro que las muestras de *Prionitis* están anidadas dentro de las *grateloupias*, lo cual es extraño debido a que al ser un género distinto

esto no debería ocurrir así, en teoría debería enraizar fuera, tal y como ocurre con *G. catena* y *G. elíptica*.

Esto no es una hipótesis exclusiva de este estudio, puesto que ya ha sido documentado anteriormente que el género *Prionitis* y *Grateloupia* comparten características morfológicas y anatómicas y, aunque estos géneros pertenecen a subclados distintos dentro del gran clado *Grateloupia/Prionitis*, la mayoría de estos subclados son, en realidad, una mezcla de ambos géneros, por lo que ya se ha propuesto que todas las especies que forman *Grateloupia* y *Prionitis* sean asignadas a un solo género (Wang *et al.* 2001) y, a pesar de que el gen COI de problemas para distinguir géneros en grandes filogenias, sigue siendo fiable para distinguir tanto especies distintas como géneros distintos (Sherwood *et al.* 2010)

Prionitis sp 3jeju

En lo que respecta a la detección de *Prionitis sp 3jeju*, el hecho de que se identificase en la muestra de *Grateloupia doryphora* de Galicia de 1996 sugiere que esta introducción no es muy reciente, probablemente. Llama la atención que solo haya sido descrita en Corea del Sur, pero observando el esquema filogenético, *a priori*, no sería muy ambicioso decir que es en realidad *G. lanceolata* o, como mínimo, un pariente muy cercano o una especiación de *G. lanceolata* quizás. *Grateloupia lanceolata* es un alga roja descrita por primera vez por Okurama (1935) en las costas del Pacífico (Japón) y que ha llegado a ser descrita en Norte América, China y en la costa mediterránea de Francia como una especie alóctona (Verlaque *et al.* 2005) y que, como se observó anteriormente, presenta una morfología similar a la *Prionitis sp. 3jeju*.

No obstante, cuando pasamos las secuencias Genbank de *G. lanceolata* por el BOLD se puede observar una identidad del 99 % o más con todas las *Grateloupias lanceolata* presentes en BOLD, seguido de *Prionitis sp 3jeju* con un 95 % de identidad. Esto parece indicar cierta similitud, pero no que sean la misma especie, ya que compartiendo la misma área de distribución (Corea del Sur) tendrían que tener una mayor similitud.

Si miramos, en cambio, el esquema filogenético que se nos presenta en BOLD (Fig. 7) al usar un código cualquiera de los recolectados se nos revela que, a pesar de estar cercano a la *G. lanceolata*, hay una clara separación entre ellas, lo que revela que muy probablemente sea una especie distinta, pero con un ancestro común cercano.

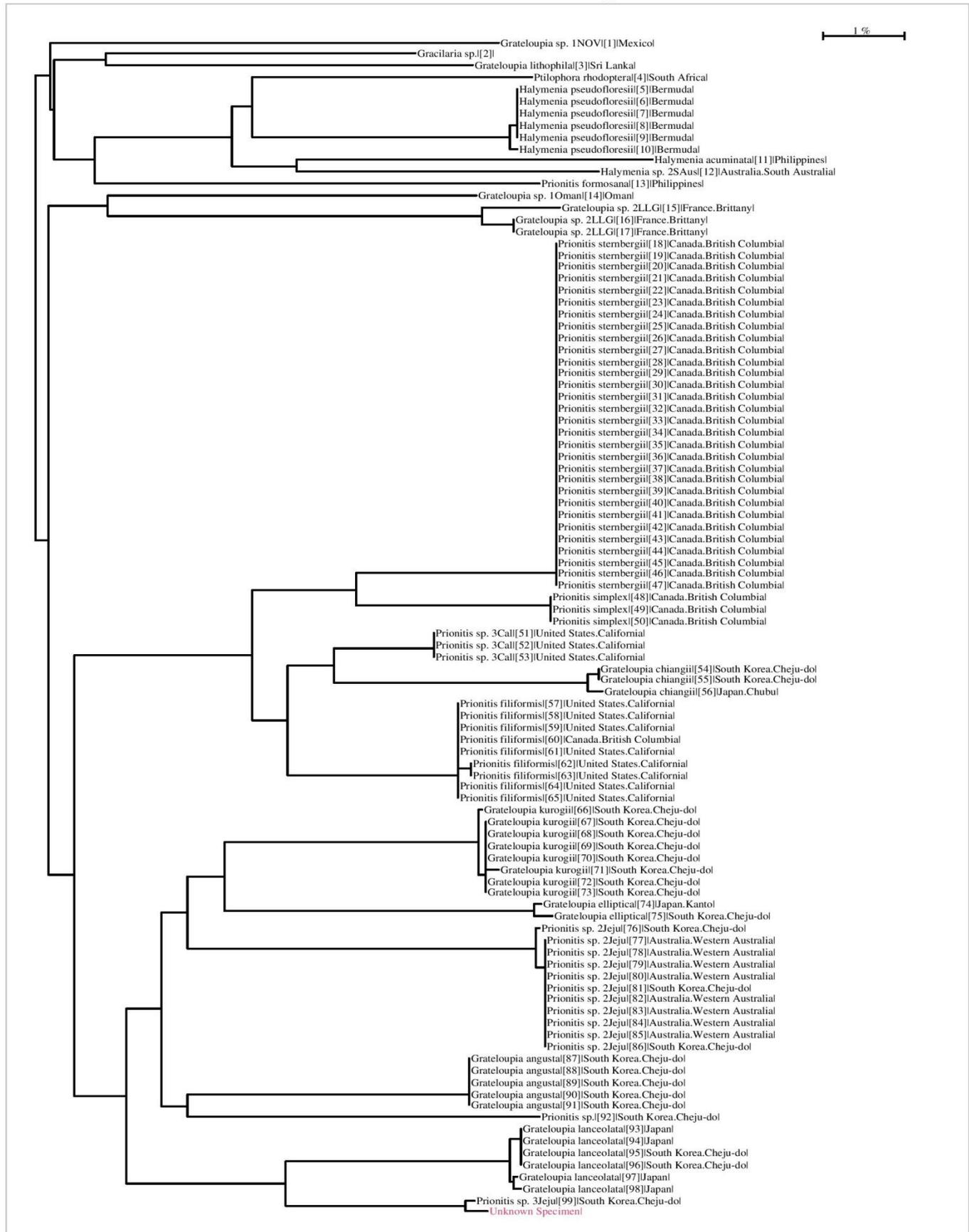


Figura 7: Esquema filogenético extraído de BOLD para la un espécimen identificado como *Prionitis sp 3jeju*, y usando datos privados a los que no se pueden acceder. Se usó el modelo Kimura 2 parameter, asumiendo que no hay codones no codificantes y usando secuencias de más de 200 pb.

Prionitis sp 2jeju

En el caso de las identificaciones positivas de *Prionitis sp 2jeju*, únicamente ha sido detectada en Gijón. Éstas están más emparentadas, según el esquema filogenético, a las algas detectadas en Australia pero, por otro lado, dos de esas *Prionitis sp 2jeju* también fueron identificadas como *Grateloupia hawaiiiana* y, en el esquema filogenético, *G. hawaiiiana* está muy emparentada con *Prionitis sp 2jeju* de Corea, por lo que no sería muy desproporcionado decir que *G. hawaiiiana* es en realidad *Prionitis sp 2jeju* y viceversa. Es más, si se realiza un BOLD a la secuencia COI de Genbank de *G. hawaiiiana*, éste le otorga un 99,87 % de similitud, por lo que se puede decir casi con total seguridad que *G. hawaiiiana* ha sido introducida en Europa.

Si hacemos una examen más intensivo del esquema filogenético (Figura 6) se pueden ver 2 grupos claros: uno en el que está la *Grateloupia hawaiiiana* y otro en el que están *Grateloupia turuturu*, *Prionitis sp 3jeju* y *Grateloupia lanceolata*. Esto daría a entender la existencia de un ancestro común a partir del cual se separaron ambos grupos. Esto tiene bastante sentido dado que tanto *G. turuturu*, *G. lanceolata* y *Prionitis sp 3jeju* comparten prácticamente su área de distribución, mientras que *G. hawaiiiana* está parcialmente restringida a Hawái posiblemente, aunque ya se ha descubierto también en Corea y en Australia, por lo que puede que esta hipótesis no sea del todo definitiva.

Grateloupia turuturu

Respecto a la detección de *Grateloupia turuturu*, se puede argumentar que los análisis morfológicos han resultado ser más bien poco fiables en lo que se puede comparar con lo que se había identificado previamente en el herbario. De todas formas ya se sabía que la identificación de las especies de algas rojas foliosas era algo complicada. Se puede observar una abundancia de *Prionitis sp 3jeju* en las muestras de herbario identificadas como *G. turuturu*, y también como la FCO 1583 obtenida en Galicia, que se la identifico como *G. doryphora* ha acabado siendo *G. turuturu*.

Estos resultados encajan con estudios anteriores que ponían de manifiesto la dificultad de distinguir *G. doryphora* de *G. turuturu* detectadas en Galicia (Gavio y Frederick 2002), donde ya se avisaba junto a Bárbara y Cremades (2004) de la dificultad que supone usar criterios morfológicos para identificar estas dos especies en particular y de todas las *Grateloupias* foliosas en general.

En 2002 se recolectaron conjuntamente *G. lanceola* y *G. turuturu* en Cala Bens, localidad situada a 1 km al oeste de Isla Redonda. Hacia el este se encontró *G. turuturu* en Punta Liseiro (2001) y San Amaro (2003), dos localidades situadas a 3 y 6 km de Punta Redonda, respectivamente, y en las cuales había registros de *G. lanceola* previos a la introducción de *G. turuturu*, poniendo en evidencia una introducción críptica que los métodos morfológicos no fueron capaces de detectar.

Transcurridos cinco años desde la primera recolección de *G. turuturu*, se ha podido verificar que las dos especies conviven en la localidad donde fue observada por primera vez al desarrollarse en entornos ligeramente distintos *G. lanceola*. Por lo que parece no se prevé que ejerza un desplazamiento de las grateloupias nativas y, por tanto, sería difícil de tomar como especie invasiva, aunque si introducida.

Gracias a las técnicas de barcoding, hemos podido detectar en Asturias la introducción de *Prionitis sp 3jeju* y *Grateloupia hawaiiiana*, siendo *Prionitis sp 3jeju* una invasión críptica ya que, comparando los resultados con el herbario, se puede observar la identificación morfológica como *G. doryphora* tanto de una *G. turuturu* como *Prionitis sp 3jeju*. En la costa asturiana solo se tenía registro de *G. dichotoma* y *G. filicina* (Cires y Moliner 2010), pero en este estudio ninguna de ellas fue encontrada, aunque eso puede deberse a que el muestreo se realizó en puertos, es decir zonas muy degradadas y por lo tanto distintas a los ecosistemas en los que *G. filicina* y *G. dichotoma* se suelen distribuir habitualmente y en donde hay una alta competencia con estas algas introducidas.

En lo que se refiere a la naturaleza de las *Prionitis*, ya hemos discutido que *Prionitis sp 2jeju* es *G. hawaiiiana*, no obstante *Prionitis sp 3jeju* a pesar de no ser *G. lanceolata* sí que sería razonable afirmar que pertenece al género de las grateloupias, por lo que se han detectado 3 introducciones, dos de ellas novedosas, de *Grateloupia* en Europa.

Generalmente, las algas marítimas exóticas son introducidas por medio de los crustáceos, más específicamente los crustáceos que se pegan a cascos de barcos, en el agua de lastre, mediante el intercambio de acuarios o bien en redes de caza para peces a los que las algas se quedan adheridos (Verlaque 2005). El comercio de ostras, comparado con los otros vectores, es por mucha diferencia el mayor vector de introducción de macroalgas en el Atlántico Norte (Verlaque *et al.* 2007). Las esporas y propágulos de macroalgas se adhieren a los caparazones de los moluscos y bivalvos provocando el 44% de las introducciones de

macroalgas, tanto dentro de Europa como entre el Atlántico y el Pacífico (Wallentinus, 2002).

Posiblemente estas algas de muy probable origen asiático debieron llegar a las costas europeas mediante transporte marítimo transnacional, probablemente de ámbito comercial, luego probablemente se ha extendido a estos pequeños puertos deportivos mediante tráfico marítimo regional.

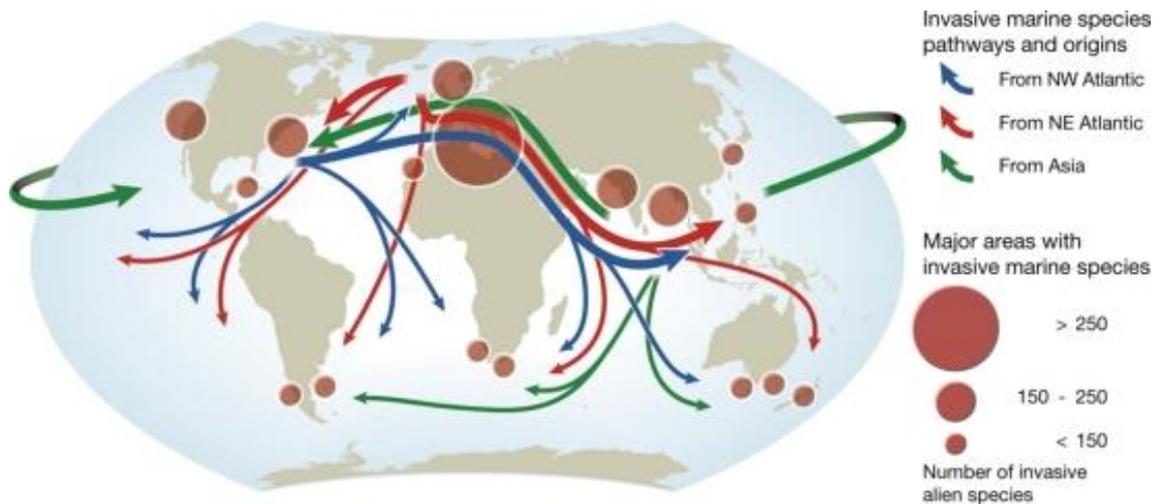


Figura 8. Orígenes y rutas principales de las especies exóticas marinas. Estos patrones están asociados a las rutas marítimas más (Hugo Ahlenius, UNEP/GRID-Arendal: http://www.grida.no/graphicslib/detail/major-pathways-and-origins-of-invasive-species-infestations-in-themarine-environment_7eb0)

Como se puede observar la principal ruta hasta Europa de las costas asiáticas pasa obligatoriamente por el Canal de Suez o por el Canal de Panamá. Teniendo en cuenta que estas algas, como *G. turuturu* se encuentran en las costas atlánticas, es más probable que pasasen a través del Canal de Panamá hasta llegar aquí.

El hecho de que *Grateloupia hawaiiiana* se encontrase en Gijón y no en el puerto de Candás nos hace pensar que existe un vector de introducción más cercano a Gijón que a Candás, y teniendo en cuenta la información proporcionada por autoridad portuaria del puerto de Gijón sobre pantalanes en los que había yates privados con rutas transnacionales de Gran Bretaña, Francia y muchos otros países, planteamos la posibilidad de que estas algas ya estén establecidas en otros puertos europeos y que han llegado aquí desde esos puertos mediante el transporte comercial hasta el puerto comercial de Gijón y de ahí al deportivo, o directamente al deportivo, usando los susodichos yates privados como vector, o ambas

posibilidades a la vez. También existe la posibilidad que haya llegado a Asturias a través de las introducciones iniciales de 1996 en Galicia.

Una introducción de esta naturaleza debería ser motivo de cierta alarma, a pesar de que se esperaba encontrar una especie introducida, en lugares antropizados, deteriorados y con mucho movimiento como son los puertos, no deja de ser preocupante, puesto que la costa del norte de España es una importante zona geográfica donde chocan corrientes oceánicas frías y calientes (García *et al.* 2011), lo que convierte a Asturias en una zona de alta diversidad de algas y de amplia riqueza. Estas poblaciones algareas ya se han visto comprometidas debido a un aumento de la temperatura media del mar en 1 grado centígrado, lo que ha causado un declive en las poblaciones de algas marinas y de los bosques de algas en Asturias (Voerman *et al.* 2013), este declive aumenta el peligro de un posible establecimiento de algas invasoras que puedan producir aún más daños en el ecosistema marino y en este estudio se ha determinado su naturaleza exótica pero no se puede demostrar si se trata de especies invasoras o no.

Estas particularidades hacen que la detección de especies exóticas sea algo más primordial de lo que ya es de por sí, pues ya múltiples veces se ha puesto de manifiesto la necesidad de necesita un programa para la vigilancia de introducciones de especies exóticas, detectar los vectores y actuar rápidamente contra las especies detectadas (Lodge *et al.* 2006)

Muchos autores ya han hecho hincapié en lo necesarias que son las medidas de vigilancia para la detección temprana de especies introducidas. Un estudio con más puertos, uno comercial y una zona control, para averiguar de dónde salen los vectores de introducción y actuar erradicando las poblaciones que se establezcan. (Vander Zanden *et al.* 2009)

5. CONCLUSIONES

En base a lo expuesto anteriormente se puede concluir lo siguiente:

1. Se ha detectado 2 especies introducidas no detectadas en Europa anteriormente, siendo la *Prionitis sp 3jeju* mas probablemente la invasora criptica debido a que se encontró en Galicia en el 96, confundida con una *G.turuturu*
2. Se ha demostrado que COI es una eficiente herramienta para hacer barcoding, especialmente usando la base de datos BOLD, mucho más actualizados que Genbank.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bárbara I., Cremades J. (1997) *Grateloupia lanceola* versus *Grateloupia doryphora* (Gigartinales, Rhodophyta) en las costas de la Península Ibérica. XII Simposio de Botánica Criptogámica, Valencia, España pp. 53-54.
- Bridgette E. Clarkston and Gary W. Saunders.(2010) A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* Vol. 88,
- Cabioch J ,Castric-Fey A., L'Hardy-Halos M.T. & Rio A.(1997).*Grateloupia doryphora* et *Grateloupia licinavar.luxurians* (Rhodophyta, Halymeniaceae) sur les cotes de la Bretagne. *Cryptogamie Algol.*, 18: 117±137
- Cires R.E., Moliner C.C. (2010). Checklist of benthic algae from the Asturias coast (North of Spain). *Bol. Cien. Nat. R.I.D.E.A.* 51: 135-212.
- Dawson E. Y. (1958). A new gjgartinoid *Grateloupia* (red alga) from Hawaii. *Pacific Naturalist*. Vol 1 No 1.
- Farnham W.F., Irvine L.M. (1973) The addition of a foliose species of *Grateloupia* to the British marine flora. *British Phycological Journal* 8: 208-209.
- Freshwater D.W., Tudor K., O'Shaugnessy K., Wysor B. (2010) DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: comparison of COI with rbcL and verification of the "barcoding gap". *Cryptogamie Algologie* 31:435-449.
- Gavio B., Fredericq S. (2002). *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct neme of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *European Journal of Phycology* 37: 349-359.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 313–321.
- ICES (1992). Report of the Working Group on Introductions and Transfers of Marine Organisms.
- Manghisi A, Morabito M, Bertuccio C, Le Gall I, Couloux A, Cruaud C & Genovese G (2010) Is routine DNA barcoding an efficient tool to reveal introductions of alien macroalgae? A case study of *Agardhiella subulata* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Cape Peloro lagoon (Sicily, Italy). *Cryptogamie, Algologie*, 31 (4): 423-433

- Mclvor L., Maggs C.A., Provan J., Stanhope M.J. (2001) *rbcl* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Molecular Ecology* 10: 911-919.
- Mi Yeon Yang , Eun Gyu Han, Myung Sook Kim. (2013). Molecular identification of *Grateloupia elliptica* and *G. lanceolata* (Rhodophyta) inferred from plastid *rbcl* and mitochondrial COI genes sequence data. *Genes Genom* ,35 :239–246
- Moore WS (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.
- Nunes A.L. Katsanevakis S., Zenetos A., Cardoso A.C. (2014) Gateways to alien invasions in the European seas. *Aquatic Invasions* 9: 133–144.
- Nunes, P. A. L. D., and Markandya, A. (2008). Economic value of damage caused by marine bio-invasions: lessons from two European case studies. – *ICES Journal of Marine Science*, 65: 775–780.
- Nunnes P.A.L.D, Markandya A. (2008). Economic value of damage caused by marine bio-invasions: lessons from two European case studies. *ICES Journal of Marine Science*, 65: 775–780
- Okamura K. (1935). *Icones of Japanese algae*. Vol. VII (5),pp. 39–48 (English), 35–43 (Japanese), pls 321–325. Kazamashobo Publisher, Tokyo, Japan
- Pérez-Cirera J.L., Cremades, J., Bárbara I. (1989). *Grateloupia lanceola* (Cryptonemiales, Rhodophyta) en las costas de la Península Ibérica: estudio morfológico y anatómico. *Lazaroa* 11: 123-134.
- Saunders G.W . (2008) A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*–*Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86: 773-789.
- Saunders G.W. (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.3601879-1888.
- Saunders G.W. and Moore T.E. (2013) Refinements for the amplification and sequencing of red algal DNA barcode and RedToL phylogenetic makers: a summary of current primers, profiles and strategies. *Algae* 28: 31–43.

- Saunders G.W., Mcdevit D.C. (2012) Methods for DNA barcoding photosynthetic protists emphasizing the macroalgae and diatoms. *Methods Mol Biol* 858: 207-22.
- Verlaque M., Boudouresque C.F., Mineur F, (2007) Oyster transfers as a vector for marine species introductions: arealistic approach based on macrophytes. In: Briand F. & Moschella P. (eds), *Impact of mariculture on coastal ecosystems*. Lisboa, CIESM Workshop Monographs 32: 39-47
- Verlaque M., Brannock P.M., Komatsu T, Villalard-Bohnsack M and Marston M. (2005). The genus *Grateloupia* C. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Thau Lagoon (France, Mediterranean): a case study of marine pluri specific introductions. *Phycologia* 44: 477–496.
- Voerman S E, Llera E, Rico J M (2013) Climate driven changes in subtidal kelp forest communities in NW Spain. *Marine Environmental Research* 90 119-127
- Walker, B., and Steffen W. (1997). An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystems. *Conservation Ecology* [online]1(2): 2. Available from the Internet. URL: <http://www.consecol.org/vol1/iss2/art2>
- Wallentinus I., (2002). Introduced marine algae and vascular plants in European aquatic environments. In: Leppäkoski E., Gollasch S. & Olenin S. (eds), *Invasive Aquatic Species of Europe –Distribution, Impacts and Management*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 27-52.
- Wang H W, Kawaguchi S, Horiguch T and Masuda M (2001). A morphological and molecular assessment of the genus *Prionitis* S.Agardh (Halymeniaceae,Rhodophyta). *Phycological Research* ; 49: 251-26
- Yamada Y. (1941). Notes on some Japanese algae IX. *Scientific Papers of the Institute of Algological Research Faculty of Science Hokkaido University*2: 195–234.
- Yang E.C., Kim M.S., Geraldino P.J.L., Sahoo D., Shin J.A., Boo S.M. (2008) Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcl* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae,Rhodophyta). *Journal of applied phycology* 20: 161-168.