

# Primera cita de *Ulva torta* (Mertens) Trevisan 1842 (Chlorophyta: Ulvaceae) en la provincia de Cádiz, España

Ignacio Hernández<sup>1</sup>, Raphael L Gerich<sup>1</sup> & Leila Carmona<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área de Ecología, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, 11510 Puerto Real, Cádiz.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Investigación Marina (INMAR), Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real (Cádiz)

Recibido: 14 de diciembre de 2020. Aceptado (versión revisada): 16 de febrero de 2021. Publicado en línea: 22 de febrero de 2021.

## First record of *Ulva torta* (Mertens) Trevisan 1842 (Chlorophyta: Ulvaceae) in the province of Cadiz, Spain

**Palabras claves:** clorofitas; salina; *Ulva*.

**Keywords:** Chlorophyta; salina; *Ulva*.

### Resumen

Se cita por primera vez la presencia del alga clorofita *Ulva torta* (Mertens) Trevisan 1842 en la provincia de Cádiz, sur de España. La especie fue encontrada durante el otoño de 2020 en zonas intermareales de fondos blandos en esteros de la salina de La Esperanza en el término municipal de Puerto Real. La identificación de la especie se realizó tanto a través de una identificación morfológica como molecular mediante el marcador genético cloroplastidial *rbcl*. El material ha sido depositado en el herbario de la Universidad de Málaga (pliego MGC-Phyc 5497).

### Abstract

The presence of the Chlorophyta *Ulva torta* (Mertens) Trevisan is reported for the first time in the province of Cadiz, southern Spain. The seaweed was found in autumn 2020, thriving on soft intertidal shores of earthen ponds in a salina (La Esperanza, Puerto Real). The identification of the species was carried out by morphological and molecular techniques using the plastid encoded *rbcl* gene sequences. The biological material has been placed in the herbarium of the University of Malaga (sheet MGC-Phyc 5497).

### Introducción

El conocimiento de las macroalgas verdes de las costas de Andalucía se ha ido ampliando desde su recopilación en el catálogo de Flores-Moya *et al.* (1995) y las sucesivas adiciones de diversos autores como Báez *et al.* (2001), Bermejo *et al.* (2010) o Arjona *et al.* (2011). El género *Ulva* Linnaeus, 1753 (Chlorophyta) comprende actualmente 84 especies divididas en 2 tipos morfo-anatómicos fundamentales: uno laminar biestromática y una tubular monostromática; el antiguo género *Enteromorpha* Link, 1820 (Hayden *et al.* 2003, Guiry y Guiry 2021). En Andalucía se han descrito hasta la fecha unas 12 especies del género *Ulva* (Seoane 1965, Pérez-Lloréns *et al.* 1996), incluyendo la reciente aparición de *Ulva onhoi* M. Hiraoka & S. Shimada 2004, de reciente registro en la provincia de Cádiz (Coste 2018), una especie exótica potencialmente invasora que coloniza parte de los fondos blandos de la bahía de Cádiz.

En España, la presencia de *Ulva torta* se ha reportado en las demarcaciones marinas de Canarias, Noratlántica y Estrecho-Alborán (Gallardo *et al.* 2016). En esta última hay referencia de la especie en la provincia de Málaga (Niell y Varela 1984) además de en la costa norte de Marruecos (Mousa *et al.* 2018). Sin embargo, no existen referencias previas sobre la presencia de *U. torta* en la Demarcación Suratlántica española.



Figura 1. Caño de la salina de La Esperanza en la que se recolectó *Ulva torta* (banda verde de intermareal superior).

El objetivo de este trabajo es poner de manifiesto la presencia de una nueva especie ficológica en la provincia de Cádiz. Este estudio es parte de uno más amplio que está en desarrollo y que tiene por objeto contribuir al conocimiento de la flora ficológica de las salinas de la bahía de Cádiz.

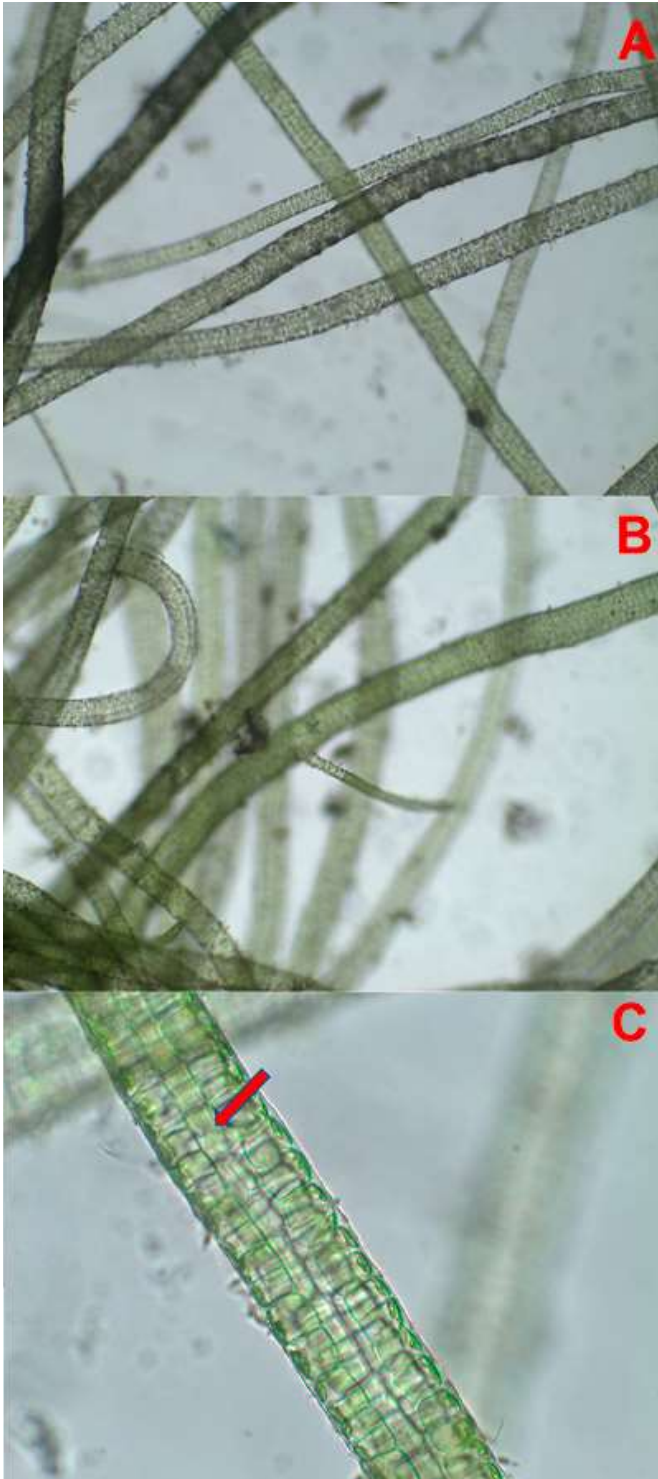


Figura 2. A: Imagen a microscopía óptica de *Ulva torta* (100 aumentos; 10x10); B: Detalle de una rámula lateral (100 aumentos; 10x10). C: Detalle del lumen central (flecha roja) y de los cloroplastos parietales (400 aumentos; 10x40).).

## Material y métodos

Las muestras fueron recogidas en octubre y noviembre de 2020 en la salina de La Esperanza (Puerto Real, Cádiz), en el punto con coordenadas 36° 30'41''N y 6° 9'28''O. Los ejemplares se encontraban creciendo abundantemente sobre fondos blandos, en el intermareal superior, junto a un caño de pendiente moderada y formando bandas patentes (Figura 1). El material recolectado se transportó en frío y oscuridad, en bolsas tipo zip con agua de mar. Una vez en el laboratorio, las muestras con las algas se lavaron cuidadosamente con agua de mar filtrada, se separaron las especies *grosso modo* con ayuda de unas pinzas y bajo una lupa binocular Nikon SMZ645 y se observaron para su determinación morfo-anatómica en un microscopio Optika equipado con una cámara y con ayuda de claves de identificación taxonómica (Brodie *et al.* 2007, Cormaci *et al.* 2014). Se realizaron 5 medidas de los caracteres morfológicos en 5 individuos distintos. Como testigos se ha preservado una submuestra, identificada como *Ulva torta*, en formol al 4% en agua de mar y se ha depositado un pliego en el herbario MGC de la Universidad de Málaga (pliego MGC-Phyc 5497). Adicionalmente se realizó la identificación molecular de una submuestra (10 g de peso seco), identificada morfológicamente como *Ulva torta*, en el Servicio de Biología Molecular del Instituto Universitario de Investigación Marina (INMAR) localizado en Puerto Real.

La identificación molecular se llevó a cabo mediante la ampliación parcial del gen cloroplastidial *rbcl* (subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este marcador ha sido ampliamente utilizado con anterioridad para confirmar o discernir entre especies del género *Ulva* (ej. Shimada *et al.* 2003, Heesch *et al.* 2009). La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) y obteniendo un volumen final de 200  $\mu$ l. La ampliación parcial del gen *rbcl* mediante la PCR se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l, que contenía Taq (Quiagen), tampón CoralLoad, dNTPS, solución Q, MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de cada *primer* o cebador, 2  $\mu$ l de la muestra de *Ulva* y agua MiliQ. Se utilizó como cebador del derecho SHF1 (CCGTTTAACTTATTACACGCC) y como cebador del revés SHR4 (TTACATCACCAC CTTC A GA TGC) creados por Heesch *et al.* (2009). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguida por 40 ciclos de 90 min a 94 °C, 2:00 h a 37 °C (temperatura de alineamiento) y 3 min a 72 °C. El producto de PCR fue comprobado en un gel de agarosa al 1% teñido con la solución de teñido para ácidos nucleicos Red Safe (INtrON). Las secuencias de ADN se editaron y ensamblaron mediante Geneious 10.0.9. La identificación de los organismos se realizó a través de BLASTn consultando toda la base de datos existente en Genbank para *Ulva torta* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

## Resultados

Las muestras analizadas morfológicamente resultaron ser una comunidad de algas clorofitas, fundamentalmente *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey, *Cladophora liniformis* Kützinger 1849 y *Ulva torta*. La figura 2A muestra una imagen de los filamentos de *U. torta*, de unos 45  $\mu\text{m}$  de anchura media ( $n=5$ ; coeficiente de variación inferior al 5%). En algunos ejemplares se observaron cortas r mulas o proliferaciones uni o bicelulares (Figura 2B). A mayor detalle se pueden apreciar los cloroplastos parietales así como el lumen o luz central (Figura 2C). Las células presentaron una morfología rectangular, con medias de 13 x 21  $\mu\text{m}$  ( $n=5$ ; coeficiente de variación inferior al 5%) y el lumen 13-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. En algunas células pudo observarse un máximo de 2 pirenoides. La presencia de *U. torta*, además de por la clave taxonómica, fue corroborada por un experto en macroalgas (I. Bárbara; Universidad de La Coruña) tras la observación de las imágenes obtenidas, así como por el análisis de la secuencia del gen cloroplastidial *rbcL* amplificado.

La muestra analizada a través de la PCR identificó en más de un 98 % la secuencia de *U. torta* depositada en Genbank (Tabla I), lo que asegura prácticamente con total probabilidad que la secuencia obtenida se corresponde con la especie devuelta por BLASTn. El número de acceso de la secuencia asignada por Genbank a la muestra analizada en este estudio es el MW582817.

## Discusión

A pesar ser primera cita, la identificación de la especie es *a priori* relativamente sencilla pues apenas existen otras especies de *Ulva* no ramificadas formando tubos tan estrechos (< 50 $\mu\text{m}$ ) y tan largos (llegan a alcanzar fácilmente en torno a medio metro). Puede existir confusión con *Ulva ralfsii* (Harvey) Le Jolis, especie muy rara y de presencia incierta en la región suratl ntica (Gallardo *et al.* 2016). De acuerdo a Cormaci *et al.* (2014) la diferencia morfológica entre las 2 especies radica en algunos caracteres concretos (tabla II), caracteres a su vez que se comparan con las muestras analizadas.

Tabla I. Listado de las primeras secuencias que devuelve Genbank tras el análisis de la muestra de *Ulva torta*.

Especie	% Cobertura	% identidad	N� acceso
<i>Ulva torta</i>	99	98,16	MT88274
<i>Ulva sp.</i>	99	98,16	JX262426
<i>Ulva sp.</i>	99	98,16	AB598811
<i>Ulva torta</i>	99	98,07	AB830519
<i>Ulva clathratioides</i>	99	98,07	KC582356

Las células de *U. torta* son más verdes mientras que las de *U. ralfsii* presentan color más traslúcido debido a la disposición del cloroplasto, carácter ciertamente muy subjetivo. Los dibujos presentados por este autor sugieren ejemplares de *U. torta* para los talos encontrados en La Esperanza, especialmente por las cortas proliferaciones laterales.

También puede existir alguna confusión con la morfología no ramificada de *Ulva intestinalis*, observada en la salina en invierno. Sin embargo, el diámetro de los tubos de esta especie (en torno a 150  $\mu\text{m}$  o más), su localización submareal, el tacto resbaladizo característico y su enorme profusión en esta época del año la diferencia netamente de los filamentos encontrados de *U. torta*. Finalmente, puede existir confusión entre *U. torta* y *U. prolifera* por la polimorf a de esta última (Brodie *et al.* 2007). Sin embargo, *U. prolifera*, también observada en la salina, presenta talos ramificados, células más pequeñas y un lumen de mayor diámetro (25  $\mu\text{m}$  o superior) lo que a nuestro juicio la diferencia claramente de *U. torta*.

En cuanto al análisis molecular de la especie, la secuencia devuelta por BLASTn corresponde casi al 100% con la secuenciación depositada en Genbank para *U. torta*. A pesar de que esto se pueda argumentar como una prueba definitiva, se ha de tener en cuenta que esta identificación es totalmente dependiente de la base de datos existente en Genbank, así como de la correcta identificación de las secuencias depositadas en dicha base de datos. Desafortunadamente no

Tabla II. Diferencia morfológica entre *Ulva torta* y *Ulva ralfsii* de acuerdo a Cormaci *et al.* (2014) y caracteres morfo-anatómicos medios de las muestras identificadas como *U. torta* en este estudio ( $n=5$ ).

	<i>Ulva torta</i>	<i>Ulva ralfsii</i>	Este estudio
Diámetro del tubo ( $\mu\text{m}$ )	25-50(-80)	35-60	45
N� de filas celulares	3-10(-12)	4-8	2-5
Diámetro del lumen ( $\mu\text{m}$ )	10-15	10-20	13-15
Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	10(-14) x 14(-19)	17-18 x 23(-32)	13 x 21
Pirenoides	0-1(2)	2-6(-8)	0-2

hay depositada en Genbank secuenciación alguna para *Ulva ralfsii*, por lo que para los más escépticos dejemos alguna duda de la correcta identificación de *U. torta* como nueva especie para la provincia de Cádiz o de si incluso *U. torta* y *U. ralfsii* corresponden en realidad a una misma especie. La correspondencia genética de la secuencia de *Ulva clathratioides* que devuelve Genbank (tabla I) ha puesto de manifiesto una variación intraespecífica entre ésta y *U. torta*, sugiriéndose que se adscriban como especies sinónimas (An y Nam 2017).

Recientemente, a través de un análisis molecular de especies de *Ulva* en sistemas de acuicultura multitrófica, *U. torta* fue descrita por primera vez en Ria Formosa; Portugal (Favot et al. 2019), en este caso a partir de cebadores de rDNA nuclear. El presente trabajo incide en la enorme dificultad para la identificación de especies de *Ulva* dada su plasticidad morfológica y la relativa subjetividad de algunos caracteres morfológicos. Sin embargo, se ha tratado de aplicar la máxima rigurosidad en la descripción de las fuentes consultadas partiendo de algaebase (algaebase.org) y el apoyo de la genética molecular, lo que sin duda ayudará a reorganizar la taxonomía de la especie, una vez que se disponga de secuencias genéticas de los distintos holotipos o lectotipos conservados.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado al amparo del proyecto europeo MedArtSalt (*Sustainable Management Model for Mediterranean Artisan Salinas*), como parte del conocimiento de la biodiversidad de la salina de La Esperanza. Los autores agradecen a Ignacio Bárbara, del Departamento de Biología de la Universidad de La Coruña la ayuda prestada en la identificación morfológica.

## Bibliografía

An JW, Nam KW 2017. First record of *Ulva torta* (Ulvales, Chlorophyta) in Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 35: 329-334.

Arjona MMF, Bañares-España E, Flores-Moya A 2011. Notas corológicas del macrofitobentos de Andalucía (España). X. *Acta Bot. Malacit.* 36: 159-209.

Báez JC, Conde F, Flores-Moya A 2001. Notas corológicas del macrofitobentos de Andalucía (España). V. *Acta Bot. Malacit.* 26: 193-196.

Bermejo R, Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ, Hernández I 2010. Notas corológicas del macrofitobentos de Andalucía (España). IX. *Acta Bot. Malacit.* 37: 162-164.

Brodie J, Maggs CA, John DM 2007. Green Seaweeds of Britain and Ireland. British Phycological Society. Dataplus Print & Design, Dunmurry, Irlanda del Norte.

Cormaci M, Furnari G, Alongi G 2014. Flora marina bentónica del Mediterraneo: Chlorophyta. *Bull. Accademia Gioenia Sci. Nat.* 47: 11-436.

Coste OBN 2018. Estudio del alga verde *Ulva* para su uso en alimentación funcional en acuicultura: Desarrollo de procesos biotecnológicos para determinar la bioactividad de polisacárido sulfatado ulván. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz 197 pp.

Favot G, Engelen AH, Cunha ME, Álvares-Serrão ME 2019. Identification of *Ulva* sp. grown in multitrophic aquaculture systems. *J. Aquac. Fisheries* 3: 024.

Flores-Moya A, Soto J, Sánchez A, Altamirano M, Reyes G, Conde F 1995. Check-list of Andalusia (S. Spain) seaweeds. II. Chlorophyceae. *Acta Bot. Malacit.* 20: 19-26.

Gallardo T, Bárbara I, Alfonso-Carrillo J, Bermejo R, Altamirano M, Gómez-Garreta A, Barceló-Martí MC, Rull-Lluch J, Ballesteros E, de la Rosa J 2016. Nueva lista crítica de las algas bentónicas marinas de España. *Algas* 51: 7-52.

Guiry MD, Guiry MD 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication. NUI Galway. <http://www.algaebase.org>; revisado el 5 de febrero de 2021.

Hamel G 1930. *Chlorophycees des cotes francaises*. *Rev. Algol.* 5: 383-430.

Hayden HS, Blomster J, Maggs CA, Silva PC, Stanhope J, Waaland JR 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.* 38: 277-294.

Heesch S, Broom JES, Neill KF, Farr TJ, Dalen JL, Nelson WA 2009. *Ulva*, *Umbraulva* and *Gemina*: Genetic survey of New Zealand taxa reveals diversity and introduced species. *Eur. J. Phycol.* 44: 143-154.

Moussa H, Hassoun M, Salhi G, Zbakh H, Riadi H 2018. Checklist of seaweeds of Al-Hoceima National Park of Morocco (Mediterranean Marine Protected Area). *Acta Bot. Malacitana* 43: 91-109.

Niell FX, Varela M 1984. Initial colonization stages on rocky coastal substrates. *Mar. Ecol.* 5: 45-56.

Peña V, Barbara I 2002. Caracterización florística y zonación de las algas bentónicas marinas del puerto de A Coruña (N. O. Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* 12: 35-66.

Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ, Pino RR, Hernández I, Peralta G, Niell FX 1996. The effect of photoacclimation on the photosynthetic physiology of *Ulva curvata* and *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 31: 349-359.

Seoane J 1965. Estudios sobre las algas bentónicas en la costa sur de la Península Ibérica (litoral de Cádiz). *Inv. Pesq.* 29: 3-216.

Shimada S, Hiraoka M, Nabata S, Lima M, Masuda M 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycol. Res.* 51: 99-108.