

Diversidad y distribución de *Codium* en Asturias

1º Bachillerato Ciencias. Departamento de Biología y Geología

Berlanas de Castro, Elena; Coira Castro, María; Fonseca González, Carla; García Pérez, Lucía; Gayol Rivas, Xana; González Pérez, Noemí; Jonte Sierra, María; López Fernández, Jorge; Méndez Cadenas, Carmen; Pérez-Magdalena Llanderroz, Julia; Quintana Santamarina, Lucía; Rodríguez Vijande, Mateo; Serantes Fernández, José & Solís García, Pablo.

IES Marqués de Casariego. Tapia de Casariego. Asturias.

Resumen:

El género *Codium* está representado en el litoral asturiano por varias especies de morfología dicotómica, entre las que coexisten la especie invasora *C. fragile* y las nativas *C. tomentosum* y *C. vermilara*. El objetivo del estudio fue caracterizar la diversidad morfológica de estas poblaciones, evaluar su abundancia y analizar su distribución por localidades.

Se analizaron un total de 329 muestras, procedentes de 9 playas del occidente de Asturias muestreadas entre noviembre de 2024 y julio de 2025. La identificación se realizó mediante microscopía óptica, utilizando caracteres morfológicos de los utrículos, y se complementó con un marcador molecular de tipo PCR-RFLP que distingue las tres especies, obtenido tras la digestión con el enzima de restricción *DpnII* de un fragmento del gen *rbcL* del cloroplasto amplificado mediante PCR. En términos generales, la especie más abundante fue *C. vermilara*. Sin embargo, este predominio varió según la estación: durante el muestreo de otoño-invierno, fue *C. fragile* la que presentó mayor abundancia, mientras que en primavera-verano la abundancia volvió a inclinarse hacia *C. vermilara*.

Palabras clave: *Codium*, diversidad morfológica, distribución estacional, morfología de utrículos, PCR-RFLP, gen *rbcL*, enzimas de restricción.

Abstract:

The genus *Codium* is represented along the Asturian coast by several species with a dichotomous morphology, including the invasive species *C. fragile* and the native species *C. tomentosum* and *C. vermilara*. The aim of this study was to characterize the morphological diversity of these populations, assess their abundance, and analyze their distribution across localities.

A total of 329 samples were analyzed, collected from nine beaches in western Asturias between November 2024 and July 2025. Identification was carried out using optical microscopy, based on utricle morphological traits, and complemented with a PCR-RFLP molecular marker that distinguishes the three species, obtained after *DpnII* digestion of a fragment of the *rbcL* chloroplast gene amplified by PCR. Overall, the most abundant species was *C. vermilara*. However, this abundance varied depending

on the season: during the autumn–winter sampling period, *C. fragile* was the most abundant species, whereas in spring–summer the abundance leans towards *C. vermilara*.

Keywords: *Codium*, morphological diversity, seasonal distribution, utricle morphology, PCR-RFLP, *rbcL* gene, restriction enzymes.

Introducción:

El género *Codium* Stackhouse, perteneciente al orden *Bryopsidales* y a la familia *Codiaceae*, representa uno de los grupos de algas verdes más diversos del planeta, englobando aproximadamente 125 especies distribuidas por todos los mares, con la excepción de las regiones polares. Su organización interna es característica: el talo se constituye a partir de una médula de filamentos entrelazados y una corteza formada por una empalizada de células fotosintéticas llamadas utrículos. Estas estructuras son fundamentales para la identificación taxonómica, pudiendo presentar en su ápice pelos (tricomas), cicatrices de estos o una prolongación aguda denominada mucrón. De hecho, la morfología del utrículo, la localización de los pelos y la presencia o ausencia de mucrón son los caracteres clave para diferenciar las especies dicotómicas del género (Silva, 1955).

En el litoral cantábrico destacan tres especies con ramificación dicotómica: *C. fragile* (Suringar) Hariot, *C. tomentosum* Stackhouse y *C. vermilara* (Olivi) Delle Chiaje. Mientras que *C. tomentosum* y *C. vermilara* son nativas del Atlántico europeo y el Mediterráneo respectivamente, *C. fragile* es una especie de origen japonés introducida accidentalmente en Europa a principios del siglo XX, con un primer registro en Holanda en el año 1900 (Cires Rodríguez & Rico Ordás, 2007). Desde entonces, *C. fragile* se ha expandido por las costas atlánticas y ha sido catalogada como una de las algas invasoras más problemáticas globalmente debido a su rápido crecimiento, su alta capacidad de fragmentación y regeneración, y su habilidad para colonizar diversos sustratos, incluyendo estructuras artificiales como cascos de barcos (Muha et al., 2019). En el Cantábrico están presentes dos subespecies, *C. fragile* subsp. *tomentosoides* y *C. fragile* subsp. *atlanticum*, diferenciadas por la longitud del mucrón apical, siendo este más largo y agudo en la primera (Cires Rodríguez & Rico Ordás, 2007). La subespecie tomentosoides es la más extendida y cosmopolita, aunque su identificación en campo es compleja por su similitud con las especies nativas, especialmente en estadios juveniles.

Dada la dificultad de identificar estas especies basándose únicamente en caracteres macroscópicos, resulta esencial combinar técnicas morfológicas con moleculares. El gen cloroplástico *rbcL*, que codifica la proteína RuBisCo, ha demostrado ser uno de los marcadores más informativos para este género (Muha et al., 2019). La técnica PCR-RFLP, que implica la amplificación de un fragmento de este gen y su posterior digestión con enzimas de restricción, permite obtener patrones de bandas específicos

que facilitan una discriminación rápida y fiable. Estudios previos en el litoral asturiano indicaron que *C. tomentosum* era la especie dominante entre 2003 y 2005, mostrando una alternancia estacional con *C. fragile* (máxima abundancia en verano frente a la primavera de la especie nativa). Trabajos recientes con ADN ambiental han confirmado esta dinámica y documentado la presencia de *C. vermilara* en los meses más fríos (Muha et al., 2019), si bien el conocimiento sobre su distribución actual en el occidente asturiano y los cambios en su abundancia relativa sigue siendo limitado.

Bajo este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo general caracterizar las comunidades de *Codium* en nueve localidades del litoral occidental de Asturias combinando técnicas morfológicas y moleculares. Para ello, se plantean como objetivos específicos identificar las especies dicotómicas mediante microscopía óptica, determinar su abundancia relativa analizando posibles diferencias significativas mediante la prueba de chi-cuadrado, confirmar la identificación mediante la amplificación y digestión del gen *rbcL* y finalmente, comparar estos resultados con estudios previos para detectar variaciones temporales en su distribución y abundancia.

Materiales:

Material biológico: se estudiaron un total de 329 individuos de tres especies diferentes del género *Codium*, *C. fragile*, *C. tomentosum* y *C. vermilara*. Estos individuos fueron recolectados en nueve playas del occidente asturiano; Playa de Chao, Playa de Portizuelo y Playa de Campiechos (Valdés), Bozo-Cabo Busto (Valdés), Playa de Cadavedo (Valdés), Playa de Santa Ana (Valdés), Playa de Los Molinos (Valdés), Playa Castello (El Franco) y Playa de La Ribeiria (Tapia de Casariego), Figura 1.

1. Playa de la Ribeiria (Tapia).
2. Playa de Castello (El Franco).
3. Playa de Portizuelo (Valdés).
4. Playa de Chao (Valdés).
5. Bozo, Cabo Busto (Valdés).
6. Playa de Santa Ana (Valdés).
7. Playa Campiechos (Valdés).
8. Playa de Cadavedo (Valdés).



Figura 1. Mapa de las playas estudiadas.

Material de laboratorio:

- Microscopio óptico para la observación morfológica de los individuos.
- Portaobjetos y cubreobjetos para recoger las muestras.
- Tijeras, cuchilla y lanceta para cortar y preparar la muestra para su posterior observación.
- Mortero de cerámica para disgregar los tejidos de algunos de los individuos estudiados.
- Nitrógeno líquido para disgregar los tejidos de *Codium* en los morteros.
- Tubos Eppendorf utilizados durante todo el proceso de laboratorio para preservar las muestras de ADN, las muestras de tejido disgregado...
- Micropipetas y puntas de micropipeta usadas también durante todo el proceso de laboratorio para preparar las muestras, cargar los tampones...
- Centrífuga empleada en varias ocasiones en el proceso de extracción de ADN; para separar fases (separar los restos de tejido vegetal del sobrenadante que contenía el ADN), eliminar impurezas y precipitar el ADN.
- Baño termostático utilizado durante la extracción de ADN para incubar las muestras con el tampón CTAB a 65°C y para llevar a cabo las digestiones con *DpnII* a 37°
- Cubeta de electroforesis para realizar las electroforesis y fuentes de alimentación que proporciona la corriente eléctrica necesaria para llevar a cabo las electroforesis, Figura 2.

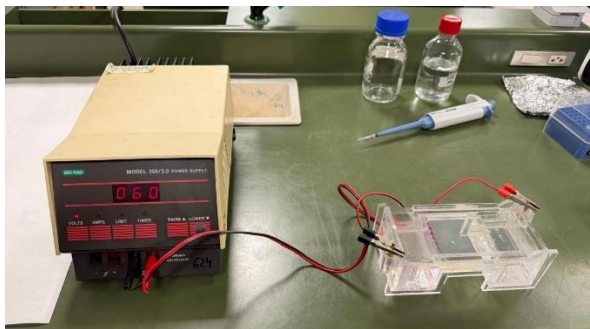


Figura 2. Cubeta y fuente de alimentación de las electroforesis.

- Termociclador para desarrollar la PCR.
- Cámara de luz LED azul para visualizar las bandas de ADN.

Método:

OBSERVACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES

El proyecto se inició con la observación de fragmentos de alga. Se tomaron muestras de las porciones terminales de las ramas de cada individuo, aproximadamente un centímetro por debajo del ápice, con ayuda de una cuchilla o de unas tijeras. Estas muestras se colocaron en un portaobjetos, y se disgregaron con una aguja enmangada en forma de lanceta de manera que se pudieran apreciar los fragmentos de alga con facilidad a través del microscopio. Tras tapar con el cubreobjetos, las muestras, se observaron al microscopio óptico para realizar un estudio de las características morfológicas microscópicas más importantes, entre las que se encuentran la presencia de mucrón, de pelos o/y cicatrices y su localización, y la forma del utrículo (claviforme, piriforme, cilíndrico). Además, se estudió una característica morfológica macroscópica, el aplanamiento de los ejes. Estos datos fueron recogidos en una tabla Excel para su posterior estudio e interpretación. Este proceso se llevó a cabo durante varias sesiones en el laboratorio, en las que se estudiaron un total de 93 individuos. La identificación se llevó a cabo a partir del estudio de las características de las especies del trabajo de Silva (1955).

DISGREGACIÓN DE TEJIDO CON N₂ LÍQUIDO

Al finalizar el estudio morfológico, se escogieron seis de los individuos estudiados, conservados secos en hojas de papel, que presentaban características de interés. En un mortero de cerámica se disgregó el tejido con N₂ líquido. Se depositó la muestra y el profesor añadió la cantidad necesaria de N₂ para disgregar el tejido. Se disgregaron las muestras hasta que quedaron con un aspecto arenoso. Se utilizaron guantes de lana para la sujeción del mortero ya que el N₂ líquido se encuentra a una temperatura que puede provocar quemaduras criogénicas (-196°C aproximadamente). Finalmente, se guardaron las muestras disgregadas a -18°C para la posterior extracción de ADN.

Los individuos sometidos a este estudio fueron recogidos en una tabla. Figura 3.

<i>C. tomentosum</i>	CtCV2
	CtRB1
<i>C. vermilara</i>	CvPM
	CvPO
	CvCT3
<i>C. fragile</i>	CfCP

Figura 3. Tabla de individuos utilizados en la disgregación. CV: Cadavedo. RB: Ribeiría. PM: Pormenande. PO: Portizuelo. CT: Castello. CP: Campiechos.

EXTRACCIÓN DE ADN

Para llevar a cabo la extracción, se utilizaron 200 mg del material disgregado. Con el fin de evitar variaciones en el pH que puedan desnaturalizar el ADN, se empleó un tampón de extracción CTAB. Este tampón está compuesto:

- **Tris-HCl 10 mM de pH 8'5**, del cual se añadió 1 mL. Amortigua el tampón evitando variaciones en el pH, manteniéndolo entre 7'5 y 8'5.
- **NaCl 10 mM**, del cual se agregó también 1 mL. Facilita la precipitación del ADN.
- **EDTA 5 mM**, del cual se echó de nuevo 1 mL. Es un agente quelante que retira del medio iones de Mg^{2+} y de Ca^{2+} . Esto es esencial, ya que, si estos iones no fuesen retirados del medio, los enzimas DNAsas actuarían destruyendo el ADN, lo que imposibilitaría su extracción y posterior estudio.
- **CTAB 0'2%**, del cual se añadieron 2 mL. Es un detergente que desorganiza las membranas de las células favoreciendo la lisis celular y liberación de ADN.
- **H₂O**, de la cual se agregaron 5 mL.

Para la extracción de ADN, se añadió 1 mL de tampón CTAB al tejido disgregado, y se incubó a 65°C en baño termostático. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm para separar los restos celulares. El sobrenadante fue tratado con cloroformo-isoamílico (24:1) para eliminar los pigmentos y otros compuestos orgánicos, y posteriormente centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos para separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante la adición de isopropanol frío y centrifugación a 12000 rpm. El precipitado obtenido en forma de pellet en el fondo del tubo fue lavado con etanol al 70% para eliminar las impurezas y, tras evaporarse el etanol, el ADN fue resuspendido en el tampón TE para conservar el ADN. Este tampón está formado por Tris-HCl (mantiene el pH estable) y por EDTA (inhibe las DNAsas retirando iones metálicos del medio).

Para eliminar el ARN presente en la muestra, se añadió RNAsas, ya que este podría interferir en los pasos posteriores de amplificación.

COMPROBACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO MEDIANTE ELECTROFORESIS

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón TBE, formado por Tris-HCl, EDTA y Borato sódico (actúa principalmente como tampón conductor, garantizando que el pH sea estable y que la corriente eléctrica fluya correctamente durante la electroforesis para que el ADN (de carga negativa) migre de forma adecuada por el gel hacia el cátodo).

El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 0'7% (0'21 g agarosa en 30 mL de TBE 1X). Para ello, las muestras fueron cargadas junto con tampón de carga formado por glicerol y colorante azul de bromofenol (sirve para facilitar la carga de las muestras en los pocillos y para controlar visualmente el progreso de la electroforesis) y un marcador de peso molecular (*Marker III*, obtenido a partir de ADN del fago λ digerido con *EcoRI*

y *HindIII*). La electroforesis se realizó a 50 V en condiciones de gel sumergido. El gel fue teñido con 2 µL de colorante GelGreen para evitar el uso de bromuro de etidio, que es cancerígeno, y visualizado bajo luz LED azul.

Con este proceso se comprobó la integridad y la cantidad del ADN extraído para la posterior amplificación de éste mediante PCR.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *rbcL*

La amplificación de un fragmento del gen *rbcL*, que codifica la proteína RuBisCo del cloroplasto, se llevó a cabo mediante PCR.

Cada reacción de amplificación se preparó en un volumen final de 20 µL, con la siguiente composición:

- 2 µL de tampón de PCR.
- 1,6 µL de mezcla de dNTPs (2,5 mM).
- 0,6 µL de $MgCl_2$ (50 mM), que aporta iones magnesio, Mg^{2+} , que son necesarios para que la Taq polimerasa funcione correctamente.
- 0,4 µL de cebadores o primers (50 pg/mL), que son fragmentos cortos de ADN de secuencia conocida que se unen a los extremos del fragmento que se quiere amplificar y sirven como punto de inicio para la Taq polimerasa.
- 0,16 µL de Taq polimerasa, que es el enzima responsable de sintetizar las nuevas cadenas de ADN durante la PCR.
- 1 µL de ADN molde.
- H_2O pura hasta completar el volumen final.

Esta composición se añadió a cada muestra.

La amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 95°C, seguida de los ciclos de amplificación correspondientes. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un termociclador PTC-100 (MJ Research) en 36 ciclos.

- El primer ciclo corresponde a la desnaturalización y fue llevado a cabo a 94°C durante un minuto.
- El segundo ciclo corresponde al anillamiento y se realizó a 50°C durante un minuto.
- El tercer ciclo corresponde a la extensión del ADN, efectuada a 72°C durante un minuto.

Los productos de PCR fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando en este caso el marcador JM (ADN plásmido pcDNA3, digerido con el enzima de restricción *HaeIII*) cuyo patrón de bandas es más adecuado para los fragmentos de ADN de tamaños menores de 572 pb.

DIGESTIÓN MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a digestión con el enzima de restricción *DpnII*, que reconoce y corta en sitios específicos de la secuencia de ADN, generando patrones de fragmentos característicos para cada especie. Cada reacción de digestión se preparó en un volumen final de 20 μ L, con la siguiente composición:

- 8 μ L de ADN producto de PCR.
- 3 μ L de tampón del enzima.
- 1 μ L de *DpnII*.
- 8 μ L de agua pura.

Los reactivos fueron añadidos en el siguiente orden: primero el tampón, después el agua y finalmente el enzima de restricción. La digestión se llevó a cabo en una estufa termostática a 37°C. Los fragmentos resultantes fueron separados mediante electroforesis a 80V en gel de agarosa al 1'5% para su visualización e interpretación.

Resultados:

ESTUDIO MICROSCÓPICO

El estudio microscópico de los 329 individuos recolectados en las nueve playas de la costa occidental asturiana permitió identificar tres especies de algas del género *Codium*: *C. fragile*, *C. tomentosum* y *C. vermilara*. La identificación de las especies se realizó siguiendo el trabajo de Silva (1955).

C. fragile presenta utrículos con una constricción mediana característica, la presencia de mucrón apical en todos los individuos de esta especie, y pelos o cicatrices de localización apical o subapical en una parte de los individuos. Esto se aprecia en la Figura 4.

C. tomentosum muestra utrículos de morfología cilíndrica o estrechamente clavada (claviforme), sin mucrón apical, con pelos o cicatrices de localización subapical en la mayoría de los individuos, y con presencia frecuente de aplanamiento de los ejes en las dicotomías, característica que no se observó en las otras dos especies. Estas características microscópicas se observan en la Figura 5.

C. vermilara presenta utrículos de morfología clavada o piriforme, sin mucrón apical y con pelos o cicatrices de localización apical cuando están presentes. En la Figura 6, se aprecian utrículos de morfología estrechamente clavada. Esta especie no presenta aplanamiento de los ejes, lo que la distingue de *Codium tomentosum*.

CARACTERÍSTICA	<i>C. fragile</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>C. vermilara</i>
MORFOLOGÍA DEL UTRÍCULO	Constricción mediana	Cilíndrico/clavado	Clavado/piriforme
MUCRÓN APICAL	Sí	No	No
PELOS Y/O CICATRICES	Variables	Frecuentes	Variables
LOCALIZACIÓN DE LOS PELOS	Apical/subapical	Subapical	Apical
APLANAMIENTO DE LOS EJES	No	Frecuente	No



Figura 4. Utrículos de la especie *C. fragile* con mucrones apicales señalados con las flechas.



Figura 5. Utrículos de la especie *C. tomentosum* de forma cilíndrica sin pelos ni cicatrices visibles. Los utrículos se indican con flechas.

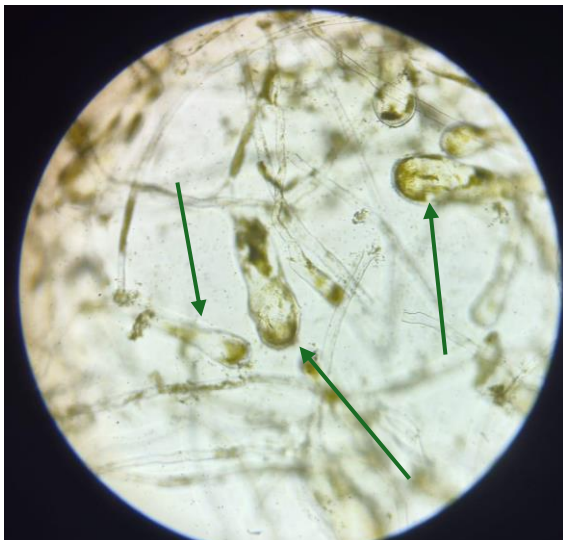


Figura 6. Utrículos de *C. vermilara* de forma estrechamente clavada marcados con flechas.

ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE LAS ESPECIES

Según la estación de recolección, la abundancia de cada especie varía dependiendo también de cada playa. Se han analizado estos datos en varias gráficas que los recogen. En números generales, la especie más abundante es *C. vermilara*, con 173 individuos (52,6%), seguida de *C. fragile* con 129 individuos (39,2%), y finalmente, *C. tomentosum*, con 27 individuos (8,2%), Figura 7.

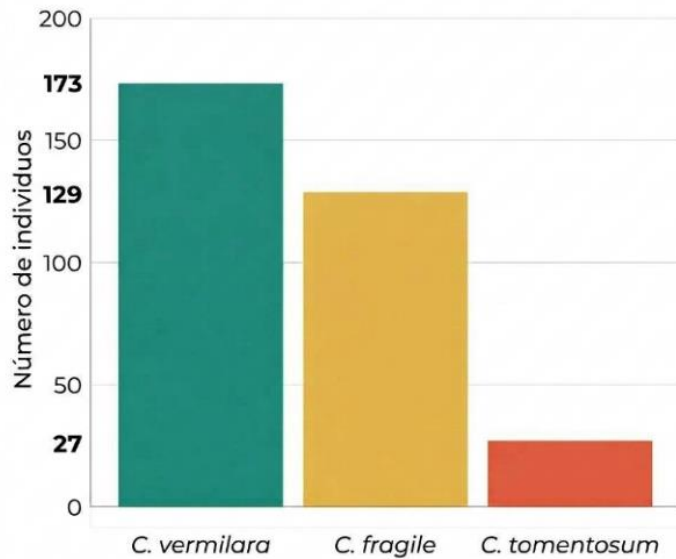


Figura 7. Gráfica que muestra la abundancia de las tres especies en el área estudiada.

Durante el otoño-invierno se recogieron y posteriormente estudiaron 198 individuos. la especie más abundante fue *C. fragile* en cinco de las playas (se recogieron un total de 116 individuos). En las otras cuatro playas la especie más abundante fue *C. vermilara* (70 individuos en total). Por consiguiente, la especie menos abundante fue *C. tomentosum*, con solamente 12 individuos recolectados. Los resultados obtenidos de la tabla de microscopía permitieron elaborar varias gráficas, Figura 8 a Figura 16.

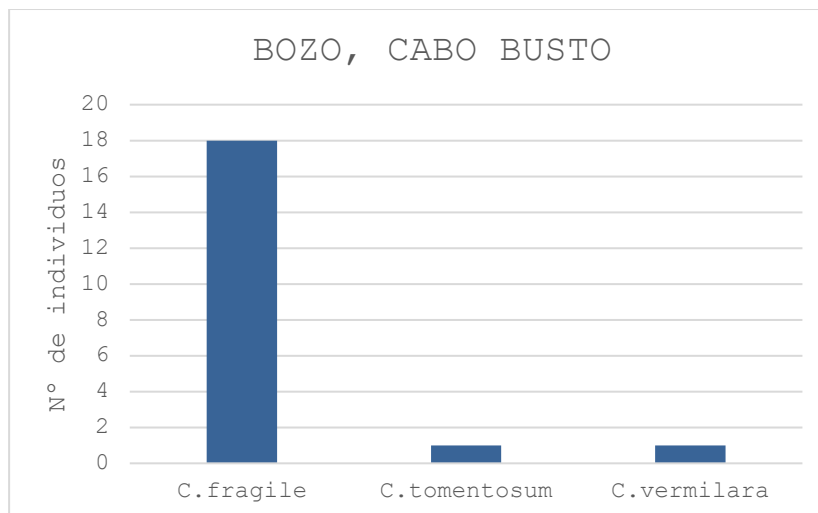


Figura 8. Abundancia de las tres especies en Bozo, Cabo Busto, durante el otoño-invierno.

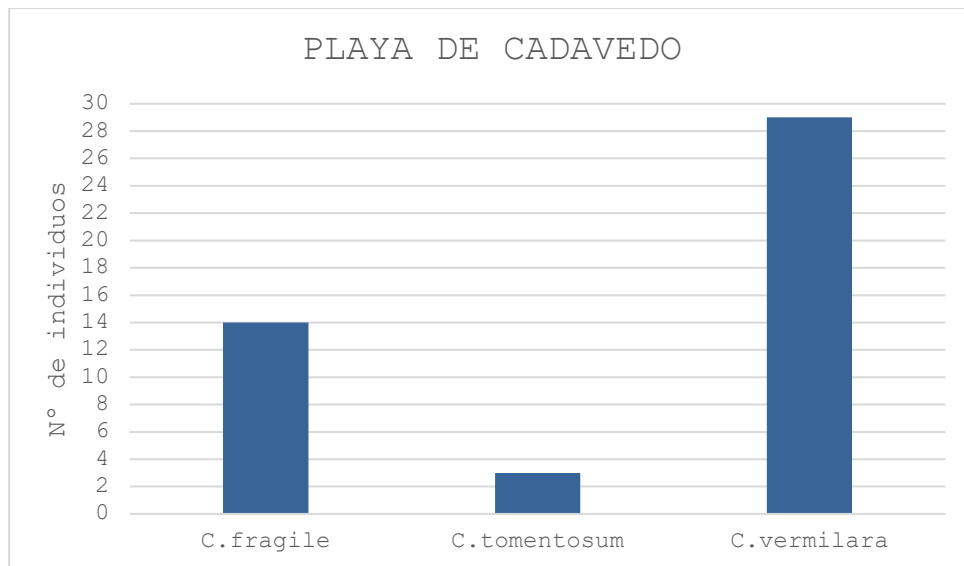


Figura 9. Abundancia de las tres especies en la playa de Cadavedo, durante el otoño-invierno.

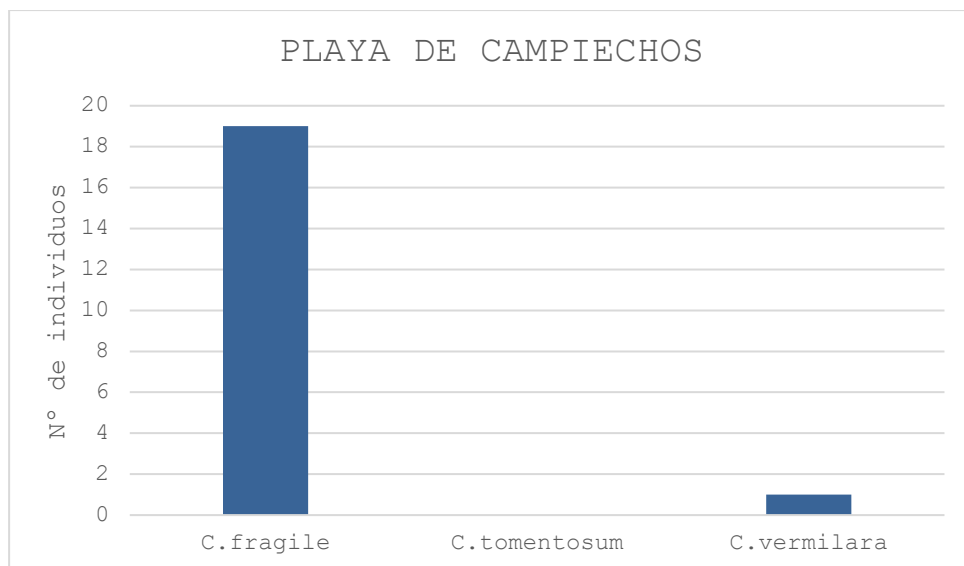


Figura 10. Abundancia de las tres especies en la playa de Campiechos, durante el otoño-invierno.

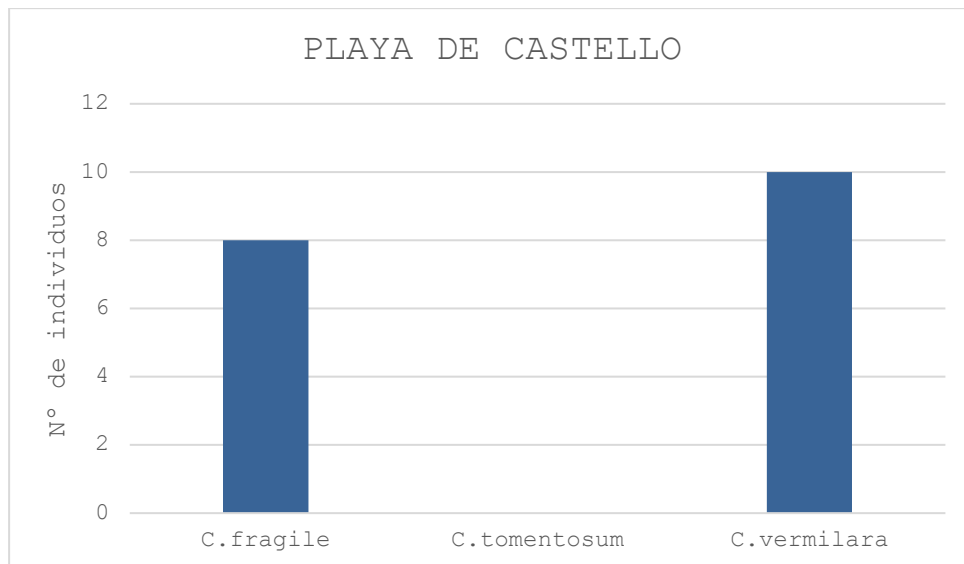


Figura 11. Abundancia de las tres especies en la playa de Castello, durante el otoño-invierno.

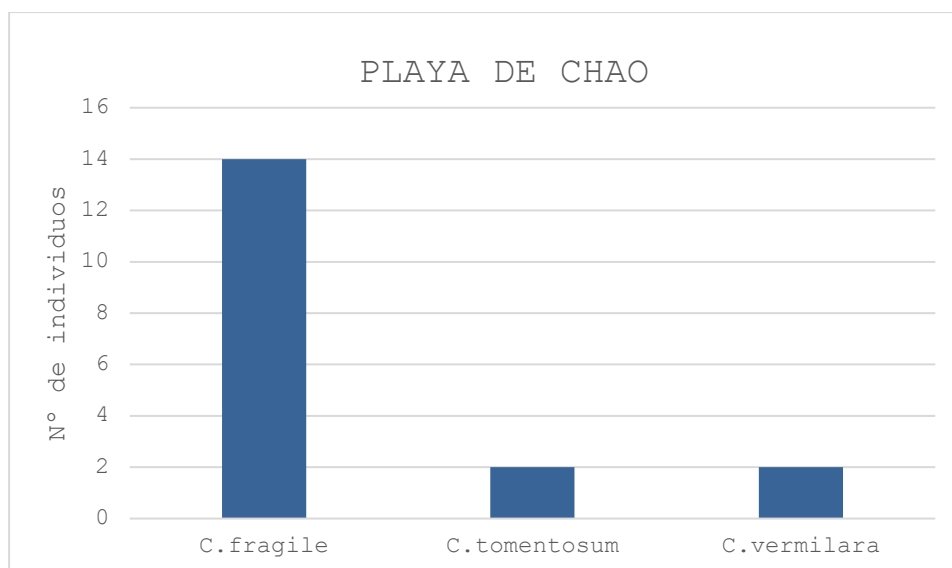


Figura 12. Abundancia de las tres especies en la playa de Chao, durante el otoño-invierno.

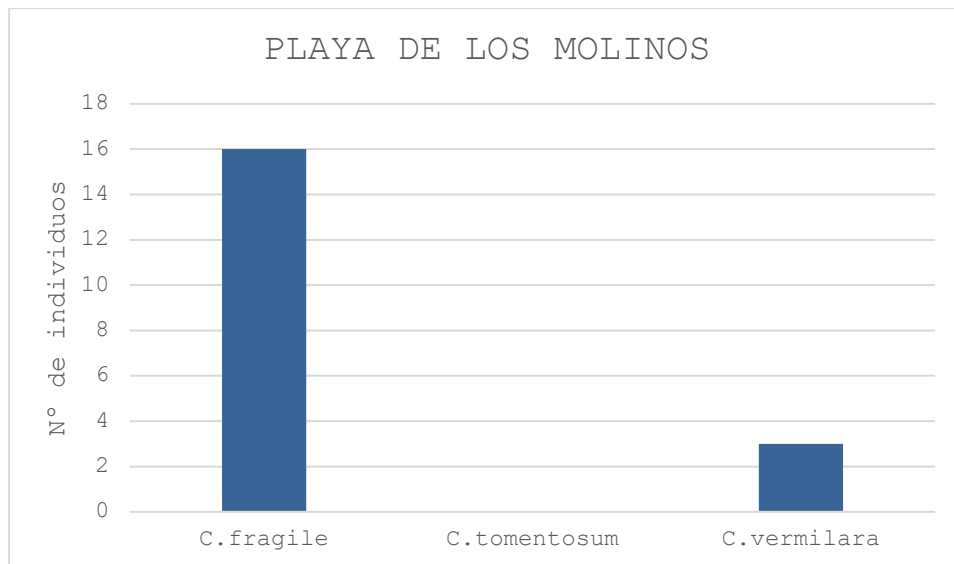


Figura 13. Abundancia de las tres especies en la playa de los Molinos, durante el otoño-invierno.

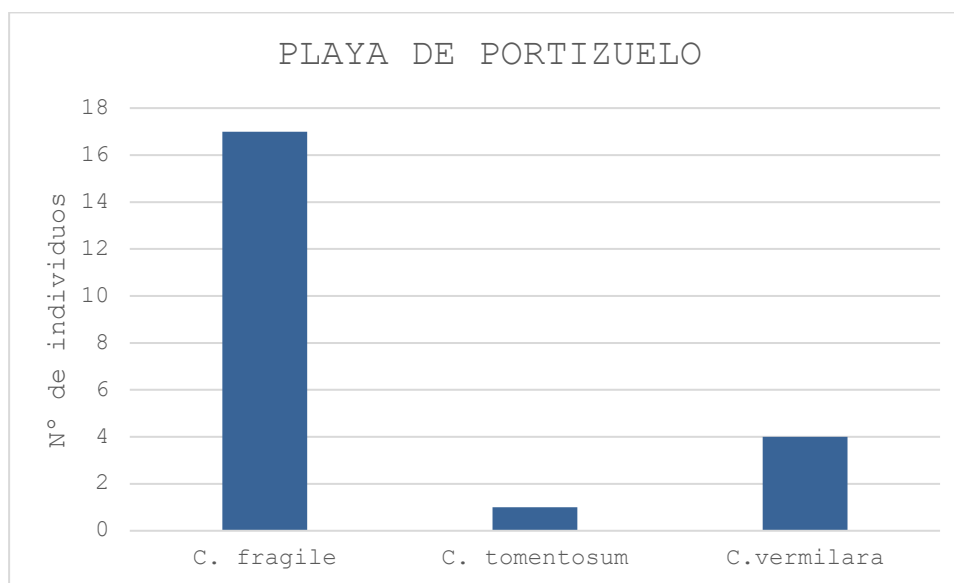


Figura 14. Abundancia de las tres especies en la playa de Portizuelo, durante el otoño-invierno.

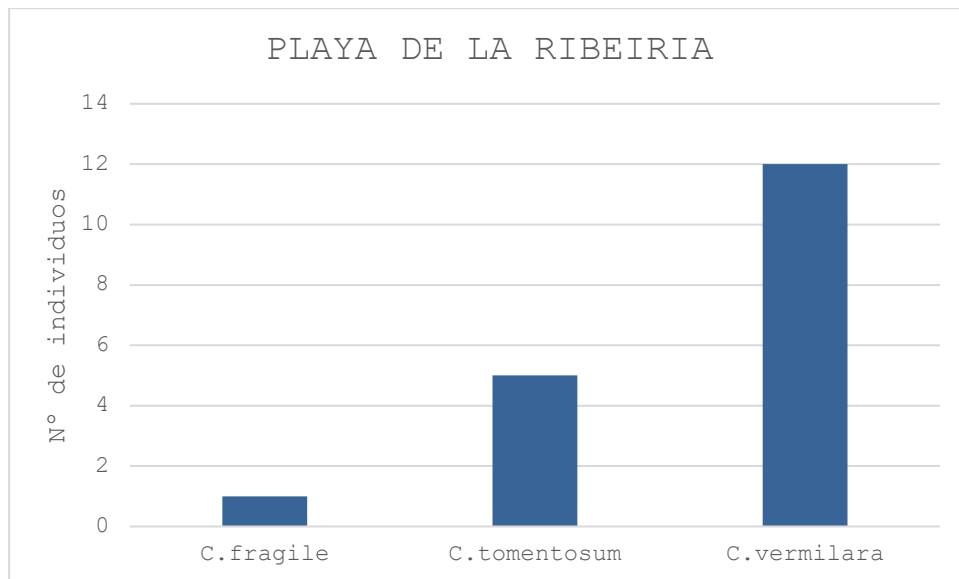


Figura 15. Abundancia de las tres especies en la playa de la Ribeiria, durante el otoño-invierno.

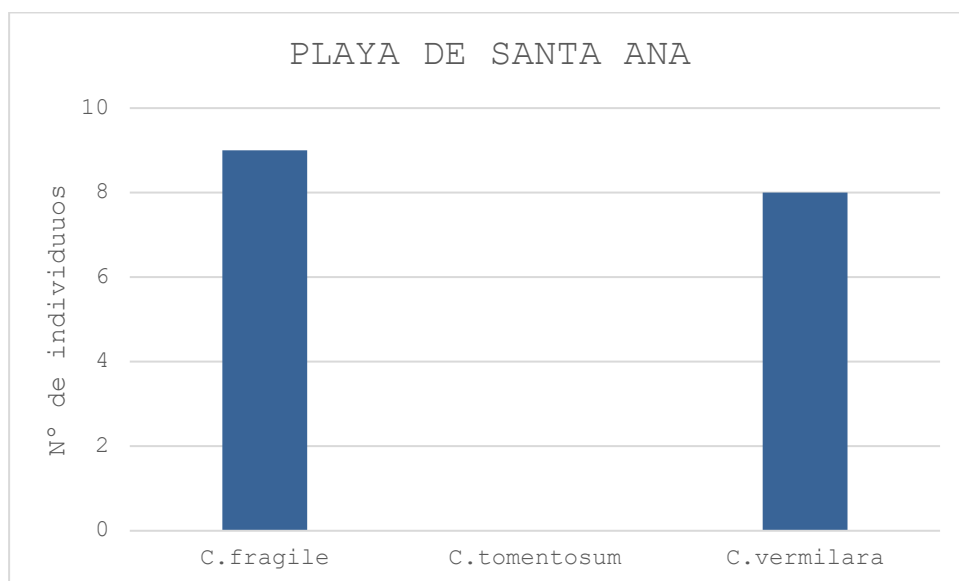


Figura 16. Abundancia de las tres especies en la playa de Santa Ana, durante el otoño-invierno.

Durante la primavera se recogieron un total de 131 individuos en seis playas. En todas ellas, la especie más abundante fue *C. vermilara* a excepción de la playa de la Ribeiria (Tapia), con mayor abundancia de *C. tomentosum*. La segunda especie predominante fue *C. tomentosum* y la menos numerosa fue *C. fragile*. Cabe destacar que estas dos especies sólo se encontraron en dos de las seis playas. Los resultados fueron recogidos en las siguientes gráficas: Figura 17 a Figura 22.

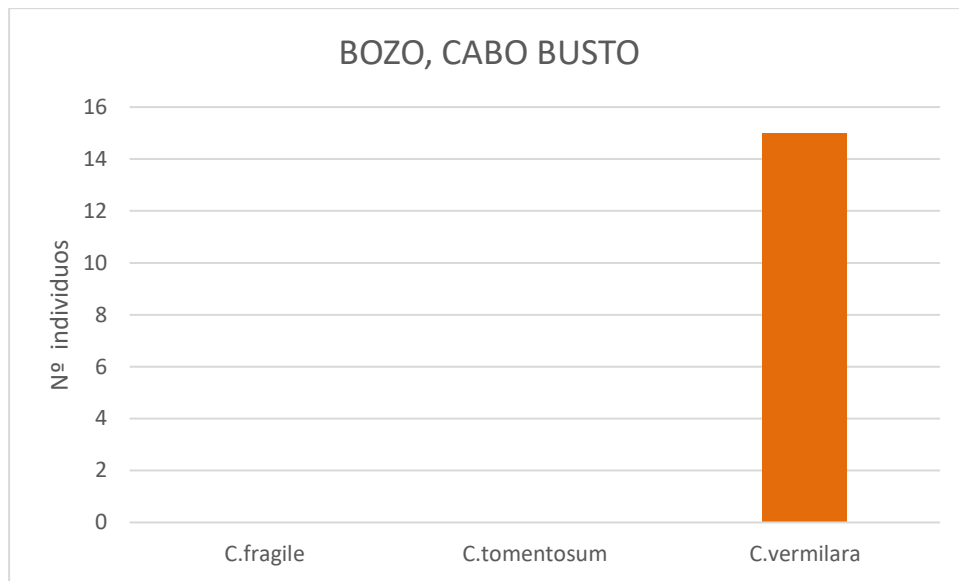


Figura 17. Abundancia de las tres especies en Bozo, Cabo Busto, durante la primavera-verano.

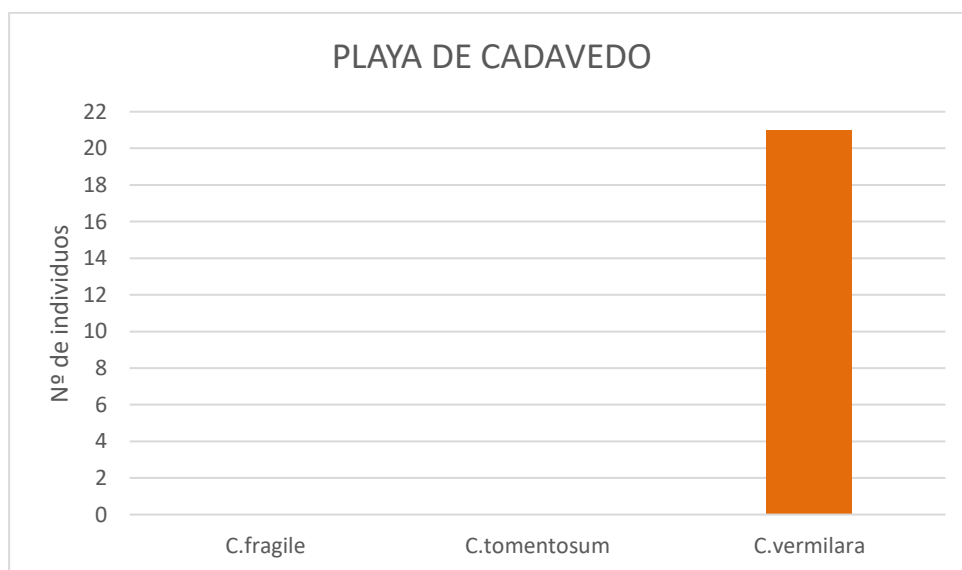


Figura 18. Abundancia de las tres especies en la playa de Cadavedo, durante la primavera-verano.



Figura 19. Abundancia de las tres especies en la playa de Castello, durante la primavera-verano.

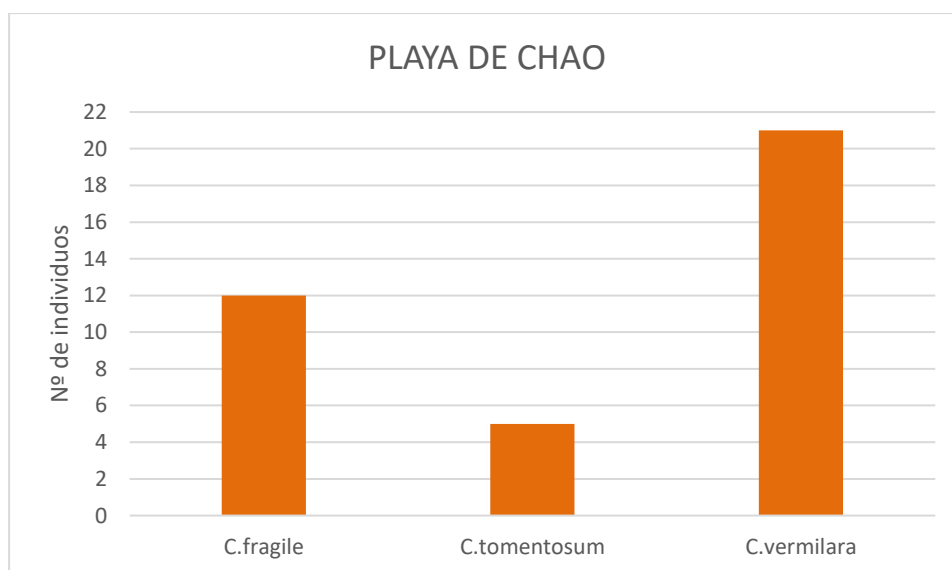


Figura 20. Abundancia de las tres especies en la playa de Chao, durante la primavera-verano.

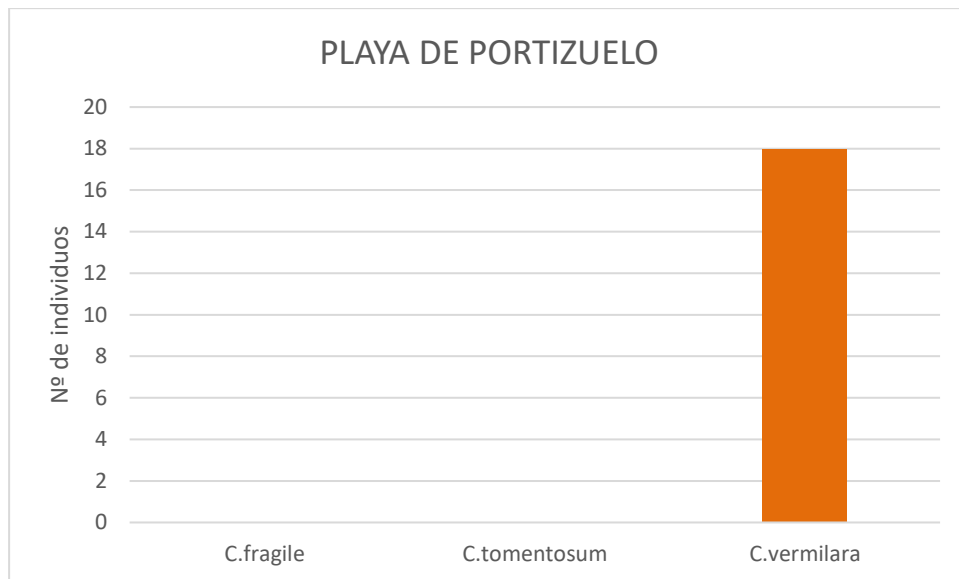


Figura 21. Abundancia de las tres especies en la playa de Portizuelo, durante la primavera-verano.

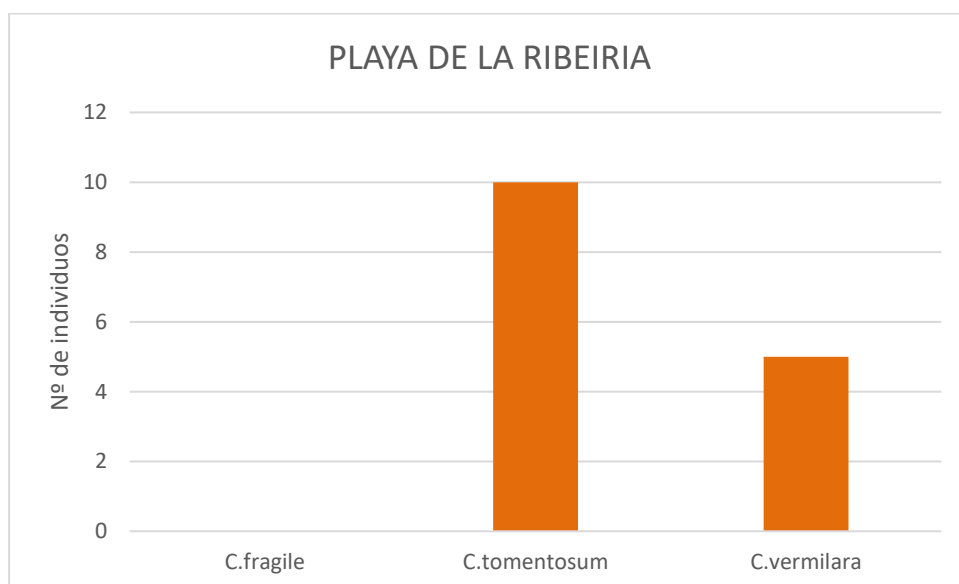


Figura 22. Abundancia de las tres especies en la playa de la Ribeiria, durante la primavera-verano.

Con el fin de determinar si las diferencias de abundancia observadas entre las tres especies son estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de χ^2 (chi-cuadrado) bajo la hipótesis nula de que las tres especies serían igualmente abundantes.

Si las tres especies fueran igual de abundantes, el total de 329 individuos se repartiría a partes iguales entre las tres: $329 / 3 = 109,67$ individuos esperados por especie.

Según los individuos obtenidos en la tabla de microscopía: *C. vermilara*; 173, *C. fragile*; 129, *C. tomentosum*; 27, se aplicó la fórmula del χ^2 ($\chi^2 = \sum (\text{observado} - \text{esperado})^2 / \text{esperado}$) para cada especie:

- *C. vermilara*: $(173 - 109,67)^2 / 109,67 = 36,59$

- *C. fragile*: $(129 - 109,67)^2 / 109,67 = 3,41$
- *C. tomentosum*: $(27 - 109,67)^2 / 109,67 = 62,30$
- Se suman los tres valores: $36,59 + 3,41 + 62,30 = 102,30 (\chi^2)$

Los grados de libertad se calculan como el número de categorías menos 1: $3 - 1 = 2$ grados de libertad

Según esta prueba, se muestra un valor de $\chi^2 = 102,30$ con 2 grados de libertad y un p-valor $< 0,001$, lo que permite rechazar la hipótesis nula y concluir que existen diferencias significativas en la abundancia relativa de las tres especies. *C. vermilara* fue la especie significativamente más abundante en el conjunto del muestreo.

Esto significa que la hipótesis nula fue rechazada concluyendo que las diferencias de abundancia entre las tres especies son estadísticamente significativas y no debidas al azar.

RESULTADOS MOLECULARES

Se extrajo el ADN de seis muestras de *Codium* (dos de cada especie), y su calidad fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0'7%. Se utilizó el marcador de peso molecular *Marker III* (ADN fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*).

Como se observa en la figura 23, para las especies *C. tomentosum* y *C. fragile* se obtuvo un ADN de alta calidad, con una banda de alto peso molecular. En el caso de *C. vermilara*, el ADN resultó degradado, pero aun así con calidad suficiente para realizar la PCR.

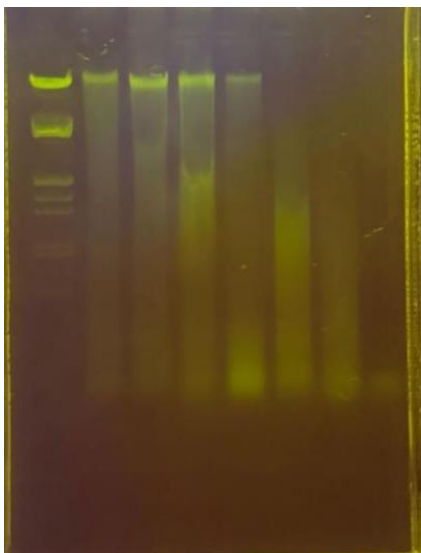


Figura 23. Resultado de la electroforesis visto bajo luz ultravioleta mostrando la calidad del ADN. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2 y 3: *C. tomentosum*. Calle 4 y 5: *C. fragile*. Calle 6 y 7: *C. vermilara*.

Tras comprobar la calidad del ADN se llevó a cabo la amplificación por PCR del fragmento de 572 pb del gen *rbcL* en las seis muestras (Figura 24). En las tres especies se obtuvo una única banda del tamaño esperado.



Figura 24. Resultado de la electroforesis visto bajo luz ultravioleta mostrando los resultados de la comprobación de la PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2 y 3: *C. tomentosum*. Calle 4 y 5: *C. fragile*. Calle 6 y 7: *C. vermilara*.

Tras esta serie de procedimientos, se enviaron las muestras al Centro Nacional de Biotecnología para su secuenciación. Esto permitió analizar el alineamiento y la distancia genética de las especies mediante los programas SnapGeneViewer, Clustalw y GeneDoc (Figura 25).

El alineamiento de las secuencias del gen *rbcL* se inspeccionó con la aplicación GeneDoc (Figura 25), revelando la existencia de 45 posiciones polimórficas en el fragmento analizado. De estas, 38 correspondieron a polimorfismos dialélicos y 7, a polimorfismos trialélicos localizados en las posiciones 15, 45, 48, 130, 175, 216 y 297 del alineamiento.

Se calculó la distancia genética entre las especies, cuantificando el número de posiciones donde cada par de especies presentaba nucleótidos diferentes. Los resultados mostraron que *C. tomentosum* y *C. fragile* presentaron la menor distancia genética con 20 posiciones diferentes, seguidas de *C. fragile* y *C. vermilara* con 36 diferencias, y finalmente *C. tomentosum* y *C. vermilara* con la mayor distancia genética, con 41 posiciones diferentes. Estos resultados son coherentes con el árbol filogenético obtenido, en el que *C. tomentosum* y *C. fragile* aparecen en ramas más próximas entre sí que con respecto a *C. vermilara*.



Figura 25. Parte del archivo Clustalw que muestra un polimorfismo trialélico en la posición 216, y tres polimorfismos dialélicos en las posiciones 225, 231 y 240.

Se estudiaron las relaciones filogenéticas de las tres especies mediante el análisis de las secuencias del gen *rbcL* de 3 individuos de cada especie. Con el programa Clustalw se obtuvo un alineamiento a partir del cual se generó un árbol filogenético (Figura 26).

Con este árbol se interpretó que las especies *C. tomentosum* y *C. fragile* están más estrechamente emparentadas, mientras que la especie *C. vermilara* es la más distante. Estos resultados son coherentes con las distancias genéticas calculadas, ya que *C. tomentosum* y *C. fragile* presentaron el menor valor de divergencia.

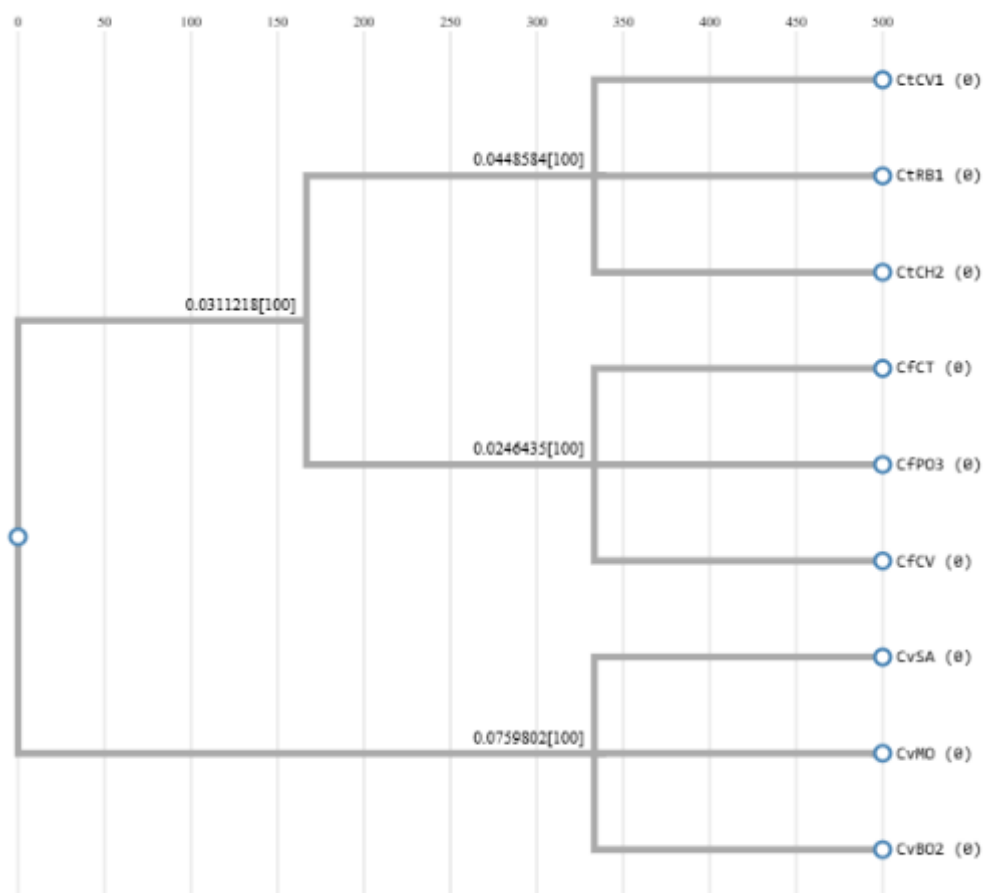


Figura 26. Árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del fragmente *rbcL* mediante el programa Clustalw que muestra el parentesco de las tres especies.

Finalmente, el análisis de las secuencias del fragmento de 572 pb del gen *rbcL*, permitió desarrollar un marcador molecular de tipo PCR-RFLP. Así la secuencia de *C. vermilara*, no presentó diana de restricción para el enzima *DpnII* (GATC), mientras que *C. tomentosum* y *C. fragile* presentaron dianas específicas y diferentes. De esta manera, la digestión con el enzima de restricción *DpnII* del fragmento de 572 pb del gen *rbcL*, permite diferenciar las tres especies, obteniéndose los siguientes fragmentos:

- *C. tomentosum*: 486+86
- *C. fragile*: 402+170
- *C. vermilara*: 572

Se realizó la digestión del producto de PCR del gen *rbcL*, y se obtuvieron los fragmentos esperados, validando así un marcador PCR-RFLP que permite diferenciar las tres especies. Figura 27.

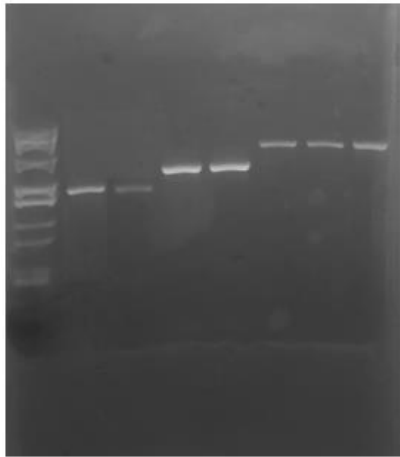


Figura 27. Resultados de la electroforesis de la comprobación de la digestión con el enzima de restricción *DpnII*. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2: *C. fragile*. Calle 3: *C. fragile*. Calle 4: *C. tomentosum*. Calle 5: *C. tomentosum*. Calle 6: *C. vermilara*. Calle 7: *C. vermilara*. Calle 8: producto PCR sin digerir.

Discusión:

Los resultados de este trabajo confirman estadísticamente que las diferencias de abundancia observadas entre las tres especies no son aleatorias, siendo *C. vermilara* la especie más abundante en el litoral occidental asturiano durante el periodo de muestreo (más de la mitad de los individuos estudiados). Este resultado contrasta con los datos publicados por Cires Rodríguez & Rico Ordás (2007), quienes describieron *C. tomentosum* como la especie dominante en el litoral asturiano entre 2003 y 2005. En ese periodo, *C. fragile* fue la segunda especie más abundante, mientras que *C. vermilara* tuvo una presencia escasa. Esta diferencia podría explicarse porque una parte importante de nuestros muestreos se realizó en primavera y verano. En esas estaciones, *C. vermilara* alcanza su máxima abundancia según Muha et al. (2019). Ambos autores documentaron una alternancia estacional entre *C. fragile*, que es más abundante en verano y otoño, y *C. vermilara*, que es más numerosa en invierno y gran parte de la primavera. Por lo tanto, el mayor número de individuos de *C. vermilara* podría deberse a la época de recogida de las muestras, que fue de noviembre de 2024 a julio de 2025, abarcando el invierno y la primavera por completo.

Por otro lado, la escasa presencia de *C. tomentosum* en la mayoría de las playas estudiadas, salvo en Playa de La Ribeiria, resulta significativa en comparación con los datos de Cires Rodríguez & Rico Ordás (2007), que la describen como especie dominante en casi todas las playas muestreadas. Esta diferencia podría reflejar un posible cambio en la composición de las comunidades de *Codium* en el litoral asturiano durante las dos últimas décadas, periodo en el que *C. vermilara* podría haber aumentado en número. El aumento de las temperaturas del agua superficial en la costa norte de la Península Ibérica durante las últimas décadas podría estar favoreciendo este cambio. *C. fragile* y posiblemente *C. vermilara* tienen preferencias térmicas distintas a las de *C. tomentosum* (Muha et al., 2019).

Los patrones observados para *C. fragile* en este estudio coinciden en gran medida con la dinámica descrita por Muha et al. (2019). Estos destacan que la especie tiende a mostrar una marcada variación estacional y una fuerte capacidad para dominar comunidades intermareales en ciertos momentos del año. En nuestro caso, su clara predominancia durante otoño e invierno refuerza esta idea. La especie parece aprovechar condiciones ambientales que favorecen su establecimiento cuando otras especies reducen su actividad. Sin embargo, la coexistencia de las tres especies en la mayoría de las localidades estudiadas demuestra que *C. fragile* no está desplazando completamente a las especies autóctonas en todo el litoral, tal como mencionaron Cires Rodríguez & Rico Ordás (2007).

Desde el punto de vista metodológico, la combinación de técnicas morfológicas y moleculares utilizadas en este trabajo ha sido adecuada para identificar las especies de *Codium* estudiadas. Los caracteres morfológicos de los utrículos descritos por Silva (1955) fueron clave. Especialmente, la presencia o ausencia de mucrón apical, la morfología general del utrículo y la ubicación de los pelos permitieron identificar claramente las tres especies en la mayoría de los individuos examinados.

C. fragile presentó utrículos con una constricción mediana característica y mucrón apical en todos los individuos identificados como esta especie. También poseía pelos o cicatrices apicales o subapicales en algunos individuos. La presencia del mucrón permitió distinguir esta especie de las otras dos. En *C. tomentosum*, el aplanamiento de los ejes permite diferenciarla a simple vista. Sin embargo, a veces un individuo no presenta esta característica, lo que dificulta la distinción con *C. vermilara*, ya que ambas especies carecen de mucrón apical y sus utrículos son similares. En cuanto a *C. vermilara*, la ubicación apical de los pelos y cicatrices podría ser una característica diferenciadora. No obstante, si ninguna de las dos especies presenta pelos o cicatrices, la distinción se complica, a menos que *C. tomentosum* presente aplanamiento de los ejes.

En este contexto, las herramientas moleculares son fundamentales para la identificación taxonómica. Concretamente, el marcador molecular PCR-RFLP desarrollado en este trabajo permite discriminar de forma inequívoca las tres especies del género *Codium*, resolviendo eficazmente posibles dudas taxonómicas.

Conclusión:

1. Se identificaron tres especies de *Codium* de morfología dicotómica en el litoral occidental asturiano: *C. fragile*, *C. tomentosum* y *C. vermilara*. La identificación se realizó mediante microscopía óptica, utilizando como principales caracteres diagnósticos la morfología del utrículo, la presencia o ausencia de mucrón apical y la localización de los pelos o cicatrices, siguiendo los criterios establecidos por Silva (1955).
2. *C. vermilara* fue la especie más abundante en el conjunto del muestreo, representando el 52,6% de los individuos estudiados, seguida de *C. fragile* (39,2%) y *C. tomentosum* (8,2%). La prueba de chi-cuadrado confirmó que estas diferencias de abundancia son estadísticamente significativas ($\chi^2 = 102,30$; gl = 2; $p < 0,001$).
3. La distribución de las especies no fue homogénea entre localidades. *C. fragile* estuvo presente en todas las localidades muestreadas siendo dominante en Playa Campiechos y Playa de Los Molinos. *C. vermilara* fue especialmente abundante en Playa de Cadavedo, Playa Castello y Playa de La Ribeiria. *C. tomentosum* mostró la distribución más restringida, con presencia relevante únicamente en Playa de La Ribeiria.
4. La mayor abundancia de *C. vermilara* respecto a los estudios previos realizados en el mismo litoral podría estar relacionada con la distribución temporal de los muestreos, ya que esta especie alcanza su máxima representación en primavera y verano, estaciones en las que se concentró una parte importante del trabajo.
5. La especie invasora *C. fragile* está sólidamente fundamentada en el litoral occidental asturiano y coexiste con las dos especies nativas en la mayoría de las localidades estudiadas, sin que se haya detectado un desplazamiento completo de estas en el conjunto del área de estudio.
6. La combinación de técnicas morfológicas y moleculares empleada en este trabajo, concretamente la microscopía óptica y la técnica PCR-RFLP sobre el gen *rbcL* del cloroplasto, ha demostrado ser un enfoque adecuado y fiable para la identificación de las especies de *Codium* presentes en el litoral cantábrico.

Agradecimientos

Queremos agradecer la ayuda prestada por el Dr. Carlos Alonso Blanco y la Dra. Belén Méndez de Vigo del Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), sin la cual, este proyecto no habría podido llevarse a cabo.

Bibliografía:

Cires Rodríguez, E. & Rico Ordás, J. M. (2007). Distribución, crecimiento y fenología del alga invasora *Codium fragile* y su congénere nativa *Codium tomentosum*. En: *I Congreso de Estudios Asturianos*, vol. 6. Real Instituto de Estudios Asturianos, Oviedo. pp. 145-161.

Muha, T. P., Skukan, R., Borrell, Y. J., Rico, J. M., Garcia de Leaniz, C., Garcia-Vazquez, E. & Consuegra, S. (2019). Contrasting seasonal and spatial distribution of native and invasive *Codium* seaweed revealed by targeting species-specific eDNA. *Ecology and Evolution*, 9, 8567-8579.

Silva, P. C. (1955). The dichotomous species of *Codium* in Britain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 34, 565-577.