

# Identificación genética mediante PCR-RFLP de especies de la familia Balistidae (Pisces) en islas del Atlántico centro-oriental

K. S. Gomes dos Santos<sup>1</sup>, J. Quinteiro<sup>2</sup>, J.A. González<sup>3</sup> y N. González-Henríquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio BioMol. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Correo-e: [katia.biologa.sa@gmail.com](mailto:katia.biologa.sa@gmail.com)

<sup>2</sup>Laboratorio SISMOL. Departamento de Bioquímica e Biología Molecular. Universidade de Santiago de Compostela

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Grupo de Ecología Marina Aplicada y Pesquerías, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

## RESUMEN

Considerando las dificultades que se presentaron en la identificación morfológica durante la comercialización de las especies de la Familia Balistidae, el objetivo de este trabajo es la evaluación de la técnica PCR-RFLP, con la finalidad de obtener una herramienta de trazabilidad rápida, efectiva, económica y que garantice la identidad de las especies. Esta técnica se ha considerado importante para la identificación y detección de especies de interés pesquero. Los resultados indicaron que la identificación de especies de los géneros *Balistes* y *Canthidermis* mediante PCR-RFLP y el análisis de los polimorfismos interespecíficos ha permitido la definición de protocolos para la identificación de las especies de estos géneros en muestras problema y en un contexto de gestión pesquera y trazabilidad alimentaria.

**PALABRAS CLAVE:** Balistes, Canthidermis, trazabilidad, gestión pesquera.

## INTRODUCCIÓN

La importancia de los miembros de la familia Balistidae, conocidos como peces ballesta o pejepercos, ha crecido mucho últimamente debido al aumento de su valor económico y demanda para su uso en acuarios, consumo humano y exportación.

Los balístidos presentan una piel gruesa y muy dura, por lo que se venden sin piel, a veces sin cabeza y fileteados, especialmente en el archipiélago de Cabo Verde, lo que da lugar a confusiones taxonómicas y sustituciones de especies (González, 2014). Esto, hace imposible analizar el patrón de color que muchas veces es utilizado como herramienta de identificación en este grupo (Sahayak *et al.*, 2014; McCord & Westneat 2016). Por esto, es necesario el empleo de nuevas metodologías como la sistemática molecular, que permita certificar las identificaciones de las especies.

La técnica de PCR-RFLP se ha considerado importante para la identificación y detección de especies de interés pesquero (Nebola *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2012), por lo que, considerando las dificultades que se presentan en la identificación morfológica durante la comercialización de las especies de la Familia Balistidae, el objetivo de este trabajo es la evaluación de esta técnica con la finalidad de obtener una herramienta de trazabilidad rápida, efectiva, económica y que garantice la identidad de las especies de los géneros *Balistes* y *Canthidermis* presentes en las aguas de los archipiélagos de Madeira, Canarias y Cabo Verde (*Balistes capriscus* Gmelin, 1789; *B. punctatus* Gmelin, 1789; *B. vetula* Linnaeus, 1758; *Canthidermis sufflamen* (Mitchill, 1815) y *C. maculata* (Bloch, 1786)).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de tejido de las especies *Balistes capriscus*, *Balistes punctatus*, *Canthidermis sufflamen* y *Canthidermis maculata* provienen de tres archipiélagos del Atlántico centro-oriental: Madeira, Canarias y Cabo Verde (Proyecto MACAROFOOD MAC/2.3d/015) (Tabla I, Fig. 1).

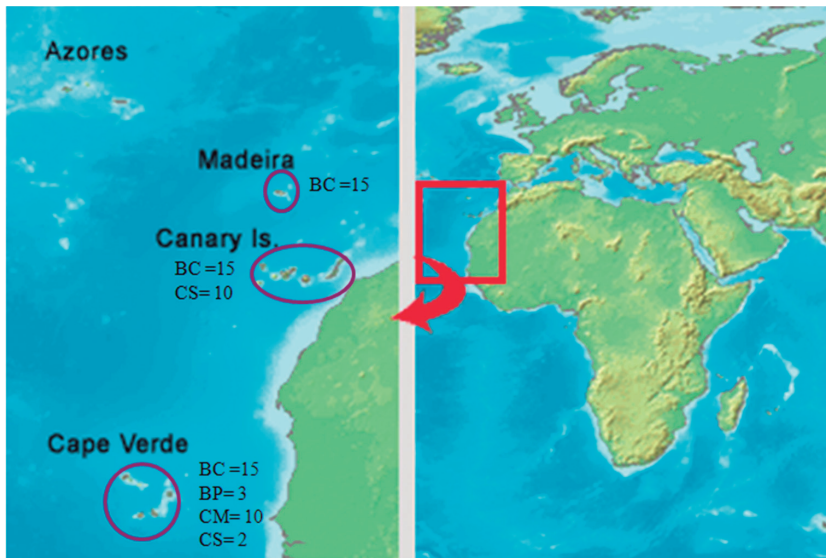
El ADN fue extraído a partir de un total de 70 muestras (45 *B. capriscus*, 3 *B. punctatus*, 12 *C. sufflamen* y 10 *C. maculata*) utilizando el kit comercial E.Z.N.A. Tissue DNA (Omega Bio-Tek) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se amplificó parcialmente el gen COI utilizando los cebadores Fish F2/Fish R2 para las especies de *Balistes* y

ASNtoCox1-1F/SERtoCox1-2R para las especies de *Canthidermis*. Para cada género, las matrices de secuencias fueron analizadas con la finalidad de identificar las regiones más conservadas entre las especies para el diseño de cebadores específicos, utilizando el software PRIMER 3 (Untergrasser *et al.*, 2012).

Se diseñaron dos juegos de cebadores, Bal-COX1-1F/ Bal-COX1-2R para el género *Balistes* y Can-COX1-1F/ Can-COX1-2R para el género *Canthidermis* Tabla II. Se realizó una búsqueda de sitios de restricción usando el NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) para el análisis de PCR-RFLP, para las especies de *Canthidermis* fue seleccionada la enzima *MboI* y para las especies de *Balistes* *HinfI* (Thermo SCIENTIFIC). El patrón de PCR-RFLP para *B. vetula* fue evaluado exclusivamente *in silico*.

**Tabla I.-** Listado de muestras analizadas.

Archipiélago	Especie (N)			
	<i>Balistes caprisus</i>	<i>Balistes punctatus</i>	<i>Canthidermis sufflamen</i>	<i>Canthidermis maculata</i>
Madeira	15	0	0	0
Canarias	15	0	10	0
Cabo Verde	15	3	2	10



**Figura 1.-** Mapa de la localización de las zonas de estudio.

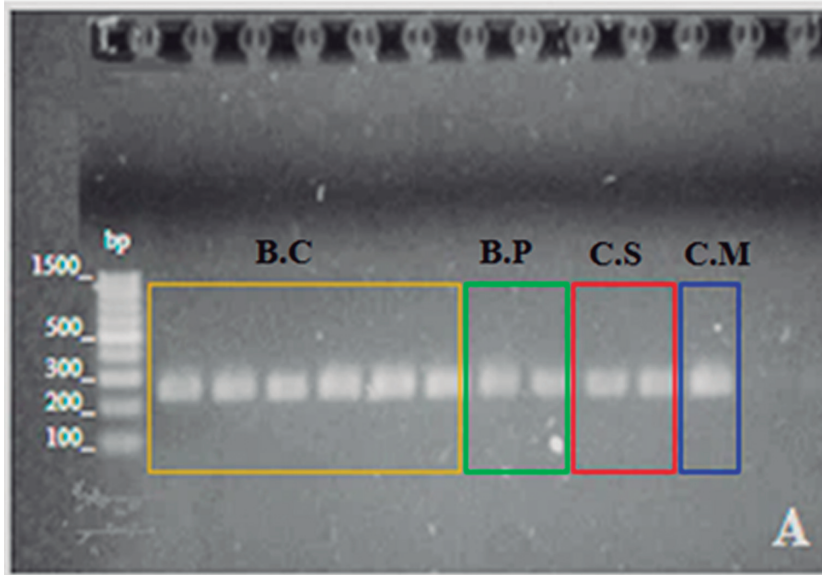
**Tabla II.-** Listado de cebadores utilizados en la amplificación del gen COI.

Designación	Tm (°C)	Secuencia	Referencia	Perfiles térmicos
ASNtoCox1-1F SERtoCox1-2R	60,12 - 64,71 57,23 - 67,07	5'-AGGCCTCGATCCYDCAAAH TCTTAGTTAACAGC-3' 5'-TTGAAACCAGYHHAYGGGG GTTC RAYTCC-3'	Quinteiro 2010	92°C, 2' (40x (95°C, 1' / 55°C, 1' / 72°C, 3' / 72°C, 5')
<b>Fish F2</b> <b>Fish R2</b>	<b>54,5</b> <b>59,6</b>	<b>5'-TCGACTAATCATAAAGATA</b> <b>TCGGCAC-3'</b> <b>5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGA</b> <b>ATCAG AA-3'</b>	<b>Ward et al.</b> <b>2005</b>	95°C, 5' (35x (95°C, 40'' / 52°C, 50'' / 72°C, 1' / 72 °C, 7')
Bal-COX1-1F Bal-COX1-2R	62 61,8-65,1	5'- CGTCACAGCACATGCTTT CGT-3' 5'-AGAGGCWCCTGCRTGGGC-3'	Este estudio	95°C, 3' (35x (94°C, 30'' / 63°C, 30'' / 72°C, 30' / 72 °C, 5')
CAN-COX1-1F CAN-COX1-2R	60 60	5'-TTCGGTGCTTGAGCTGGA AT-3' 5'-GTAGGAGGAGTGATGGG GGT-3'	Este estudio	95°C, 3' (35x (94°C, 30'' / 61°C, 30'' / 72°C, 30' / 72 °C, 5')

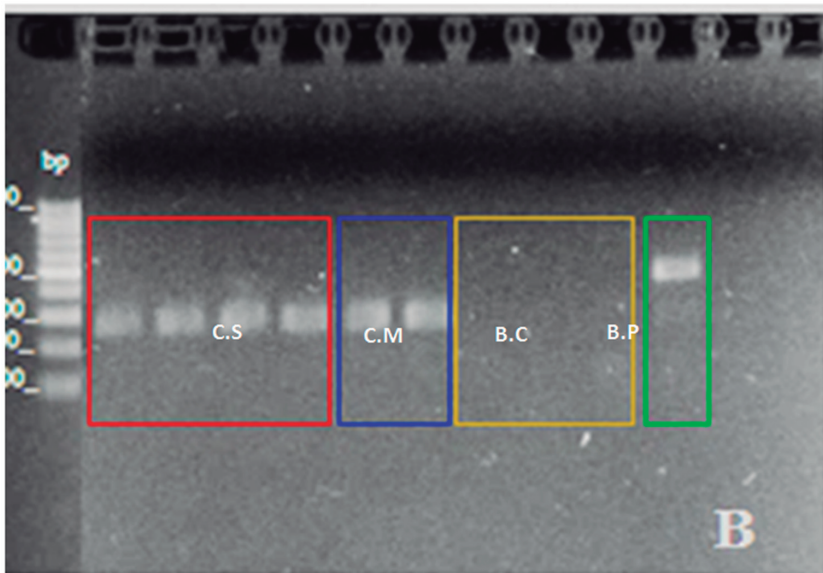
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis genético e identificación de especies de los géneros *Balistes* y *Canthidermis*: Cebadores específicos diseñados para este estudio

- ❖ Con los cebadores Bal-COX1-1F/2R (Quinteiro unpubl.), todas las muestras de *Balistes* y *Canthidermis* amplificaron 256 pb, por lo que no existe especificidad para estos cebadores (Fig. 2).
- ❖ Con los cebadores Can-COX1-1F/2R (Quinteiro unpubl.), amplificaron las muestras de *Canthidermis* (271 pb) y solo en *B. punctatus* se obtuvo una amplificación inespecífica (> 500 pb) (Fig. 3).



**Figura 2.-** PCR especie-específica para los géneros *Balistes* y *Canthidermis* con cebadores Bal-COX1-1F/2R.



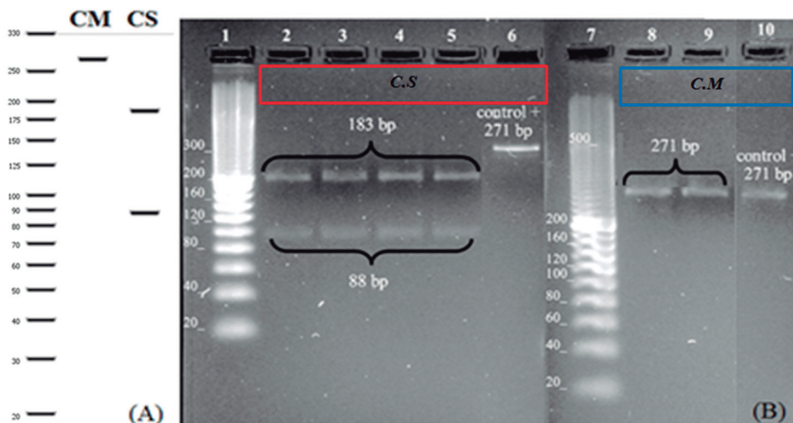
**Figura 3.-** PCR especie-específica para los géneros *Balistes* y *Canthidermis* con cebadores Can-COX1-1F/2R.

## Análisis genético e identificación de especies de los géneros *Balistes* y *Canthidermis*: PCR-RFLP

Los patrones obtenidos tras la digestión con las enzimas *MboI* y *HinfI* de los fragmentos amplificados fueron conforme a lo esperado, para las especies objetivo de *Canthidermis* y *Balistes* (Fig. 4 y Fig. 5).

### ❖ PCR-RFLP especies *Canthidermis* (*C. sufflamen* y *C. maculata*). Enzima *MboI*

Las muestras de *Canthidermis maculata* se diferencian de *C. sufflamen*, tras la digestión del fragmento de 271 pb generado con los cebadores Can-COX1-1F/2R con *MboI*. En *C. maculata* el fragmento permanece no digerido, por ausencia de diana de restricción. En *C. sufflamen*, la presencia de una diana genera el patrón de RFLP diagnóstico, presentando dos bandas de 183 y 88 pb.

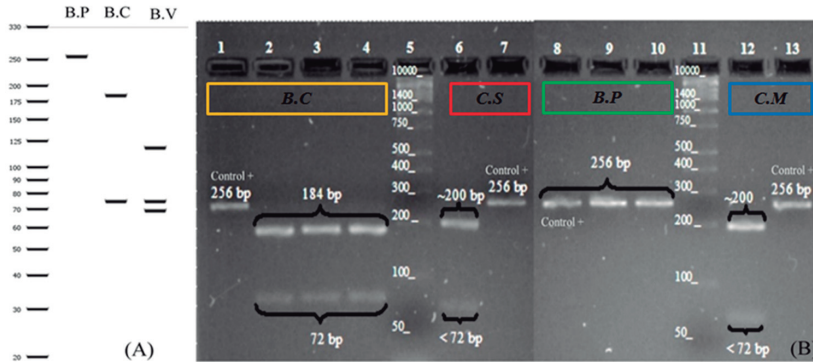


**Figura 4.-** Digestión *in silico* (A) y patrones de cortes obtenidos tras la digestión con la enzima *MboI* (B): 1 y 7\_ Escalera (20 pb); 2-6\_ *Canthidermis sufflamen* (C.S); 8-10\_ *Canthidermis maculata* (C.M).

### ❖ PCR-RFLP especies *Balistes* (*B. capriscus*, *B. punctatus* y *B. vetula*). Enzima *HinfI*

La especie *B. punctatus* presenta un fragmento no digerido con el tamaño de 256 pb. La presencia de una diana de restricción en *B. capriscus* genera un patrón de RFLP conteniendo bandas de 184 y 72 pb. En el caso de *B. vetula*, ha sido imposible obtener una muestra de dicha especie, sin embargo, el patrón de RFLP estimado en base a secuencias disponibles, es específico para esta especie, presentando un patrón distintivo de tres bandas.

Los cebadores Bal-COX1-1F/2R han mostrado falta de especificidad permitiendo la amplificación de ADN de las especies de *Canthidermis*. No obstante, la especificidad se obtiene tras la digestión con *HinfI*, produciéndose un patrón diferenciado al observado para las especies de *Balistes*.



**Figura 5.-** Digestión in silico (A) y patrones de cortes obtenidos tras la digestión con la enzima *HinfI* (B): 1-4\_ *Balistes capriscus* (B.C); 6-7\_ *Canthidermis sufflamen*; 8-10\_ *Balistes punctacus* (B.P); 12-13- *Canthidermis maculata*; 5 y 11\_ Escalera (Takara). *Balistes vetula* (B.V).

## CONCLUSIONES

La aplicabilidad y eficacia de la técnica PCR-RFLP han sido demostradas en varios estudios de trazabilidad de especies de interés pesquero, donde ha sido capaz de identificar las especies y detectar fraudes/adulteraciones, por ejemplo en escómbridos, (Menezes *et al.*, 2006; Quinteiro 2010; Aguilar *et al.*, 2012), salmónidos, anguiliformes y gádidos (Rasmussen & Morrissey 2009; Nebola *et al.*, 2010), bacalao y otros (Aranishi *et al.*, 2005; Dooley *et al.*, 2005). Se han definido los protocolos de PCR-RFLP para la identificación de la especie en muestras problema y en un contexto de trazabilidad pesquera y alimentaria. Los patrones genéticos (RFLP) en muestras de Madeira, Canarias y Cabo Verde han permitido la identificación de las especies de los géneros *Balistes* y *Canthidermis*.



## AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de Canarias por la ayuda recibida dentro del Programa de Becas Canarias África.

Al Proyecto MACAROFOOD Programa de Cooperación Territorial INTERREG V-A Madeira-Azores-Canarias (MAC) 2014-2020, Proyecto MAC/2.3d/015.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar A., Alonzo G. y Barrero M. 2012. Identificación de especies de atún (*Thunnus* spp.) en Venezuela utilizando la técnica de PCR. *Revista Científica*, 24 (4): 368-375.
- Aranishi F., Okimoto T. y Izumi S. 2005. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *Journal of Applied Genetics*, 46 (1): 69-73.
- Dooley J.J., Sage H.D., Clarke M.A., Brown H.M. y Garreti S.D. 2005. Fish Species Identification Using PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3348-3357.
- González J.A. 2014. Los peces ballesta y otros gallos y gallitos de mar. *Pellagofio*, Confusiones y sustituciones en los productos de la pesca, 26: 7-7. Santa María de Guía, Las Palmas.
- McCord C.L. y Westneat M. W. 2016. Phylogenetic relationships and the evolution of BMP4 in triggerfishes and filefishes (Balistoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94: 397-409.
- Menezes M.R., Ikeda M. y Taniguchi N. 2006. Genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (L.) using PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA D-loop region. *Journal of Fish Biology*, 68 (Supplement A): 156-161.
- Nebola M., Borilova G. y Kasalova J. 2010. PCR-RFLP analysis of DNA for the differentiation of fish species in seafood samples. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 54:49-53.
- Quinteiro J.V. 2010. Filogenia Molecular, Estructura Poblacional y Trazabilidad Genética de Escómbridos (Pisces: Scombridae). Tesis de doctorado. 328 pp.
- Rasmussen R.S. y Morrissey M.T. 2009. Application of DNA-Based Methods to Identify



Fish and Seafood Substitution on the Commercial Market. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7 (3): 280-295.

Sahayak S., Joshi K.K. y Murty V.S. 2014. Taxonomy of the Ocean triggerfish, *Canthidermis maculata* (Tetraodontiformes, Balistidae) from the Indian coast. *Journal Marine Biology Ass. India*, 56 (2): 56-61.

Untergrasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., B.C. Faircloth, Remm M. y S.G. Rozen. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 (15): e115.

Vincze T., Posfai J. y Roberts R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31: 3688-3691.