

Identificación de la ostra de Portobelo, estuario del río Chone, provincia de Manabí, Ecuador

César Lodeiros¹, Lenin Cáceres², Dailos Hernández-Reyes³, Yanis Cruz-Quintana^{1,2}, Manuel Rey-Méndez^{1,4}, Nieves González-Henríquez^{1,3}

¹Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos, Dpto. de Acuicultura y Pesca, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador | ²Grupo de Investigación en Sanidad Acuicola, Inocuidad y Salud Ambiental, Escuela de Acuicultura y Pesquería, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador | ³Laboratorio BioMol, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España | ⁴Laboratorio de Sistemática Molecular e Instituto de Acuicultura, CIBUS, Campus Vida, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, España.

✉ cesarlodeiroseijos@yahoo.com

RESUMEN

La presente investigación pretende establecer una identificación taxonómica de la ostra en explotación del banco natural de Portobelo, en el estuario del río Chone, provincia de Manabí, Ecuador, mediante caracteres de identificación taxonómica básica establecida para las especies de ostreoides del Pacífico tropical y subtropical, y técnicas moleculares de identificación genética. El análisis taxonómico usando características morfológicas, no proyecta una clara identificación, aunque se focaliza en *Crassostrea aequatorialis* o *Crassostrea corteziensis*, los análisis moleculares (COI modificado y ARNr 28S), generaron diferentes grados de identidad del organismo respecto a las secuencias de las especies más próximas identificadas en el BLAST del GenBank y sugieren que no existe un registro genético de las secuencias obtenidas, por lo que es una especie de ostreido que no tiene registros de secuencias en GB, y/o es una nueva especie para el conocimiento científico. Se recomienda realizar un estudio más profundo utilizando un enfoque integrador de análisis biométricos, morfológicos, ecológicos, biogeográficos y genéticos con el fin de obtener una identificación de la especie.

Palabras clave: Ostreoides, Pacífico tropical y subtropical, *Crassostrea aequatorialis*, *Crassostrea corteziensis*.

INTRODUCCIÓN

Aunque las ostras son un recurso conspicuo y muchas de ellas soportan explotaciones incluso industriales, la taxonomía de la familia ostreidae del Pacífico tropical americano es muy complicada y muchas veces se realizan identificaciones erróneas, debido particularmente a la elevada plasticidad morfológica de las conchas en los ostreidos, por lo que se hace necesario un enfoque integrador que combine las informaciones morfológicas con referencias adicionales como datos moleculares, comportamiento, ecología y biogeografía (Padial *et al.*, 2010). Sin embargo, la tipificación de las especies se completa mejor utilizando un enfoque de validación cruzada entre diferentes métodos de identificación de los taxa, en función de los caracteres, la distancia genética y los árboles filogenéticos (Goldstein y DeSalle, 2011).

En Portobelo, una localidad costera del estuario del río Chone (Manabí, Ecuador, Fig. 1), existe una explotación ostrícola desde hace unos años, la cual permite el sustento de algunas familias del pueblo y de sus aledaños. Aunque no hay registros de producción, la información de los pobladores es que la extracción de ostras en el banco está disminuyendo, probablemente debido a la sobrexplotación del recurso, por lo cual se están realizando trabajos de caracterización poblacional y estudios biológicos que permitan un conocimiento básico para emprender acciones de administración del recurso con posibilidad del aumento de la producción mediante actividades de acuicultura. Sin embargo, hasta el momento, no existe una identificación clara de la especie (Fig. 1)



Figura 1. Localización de la zona de muestreo y ejemplar de la especie de Ostreido.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó con ostras provenientes del banco natural de Portobelo, en el estuario del río Chone, provincia de Manabí, Ecuador ($0^{\circ} 38' 21''$ S, $80^{\circ} 21' 38''$ O). Se tomaron muestras para la identificación taxonómica, siguiendo claves y descripciones de Castillo y

García-Cubas (1984), Brito y Mora 2017 y Coan y Valentich (2012). A un grupo de 10 ostras se le extrajo una porción del músculo aductor, que se preservó en alcohol etílico al 80% hasta su análisis.

La extracción total de ADN se realizó con el Kit “E.Z.N.A. Moluscos” (Omega Bio-Tek) analizándose los fragmentos de los genes ribosómicos de las subunidades mitocondriales y nucleares (gen parcial COI y 28S, respectivamente).

Los productos de PCR se obtuvieron con el conjunto de cebadores de código de barras jgLCOI490/jgHCO2198 (Geller *et al.*, 2013) y el 28S-F4-OSTRD/28S-R-OSTRD (Mazón *et al.*, 2016), siendo purificados con el kit ExoSAP-It (Affimetrix) y secuenciados con el kit BigDye v3.1 y el terminador X (Thermo Fisher Scientific).

Los productos de secuenciación se separaron y detectaron en un equipo ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) y las secuencias se editaron, alinearon y enviaron a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y BOLD (www.barcodinglife.org) para buscar secuencias similares o idénticas.

Se utilizó un alineamiento múltiple de las secuencias parciales COX1 y 28S obtenidas en el presente trabajo y *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951), *C. columbiensis* (Hanley, 1846), *C. virginica* (Gmelin, 1791), *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) y *Saccostrea palmula* (Carpenter, 1857), extraídas de GenBank para verificar el nivel de similitud con secuencias ya depositadas en NCBI y confirmar la identidad de las muestras secuenciadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica morfológica

Las ostras analizadas muestran características de ausencia de cromata, tribu Crassostreini Scarlato & Starobogatov, 1979; subfamilia Crassostreinae Scarlato & Starobogatov 1979; familia *Ostreidae* Rafinesque, 1815; Superfamilia *Otreoidea* Rafinesque, 1815; y orden *Ostreida* Férussac, 1822. Las características de concha usualmente larga pero variable, segmentada con la valva izquierda, con espacios subumbonales (Coan y Valentich 2012), determinan que los especímenes son del género *Crassostrea* (Fig. 2)

A nivel de especie, si bien muestra características de la morfología de la concha similares a *Crassostrea columbiensis* (Hanley, 1846) y particularmente a *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) y *Crassostrea aequitorialis* (d’Orbigny, 1846), descritas en Coen y Valentich, 2012 y Brito y Mora, 2017, no es posible una definición clara según las citadas claves taxonómicas.



Figura 2. Características de la concha del Ostreido.

Identificación sistemática molecular

Citocromo oxidasa subunidad I (COI)

La amplificación del gen parcial modificado COI mostró bandas definidas del tamaño esperado (~600-700pb).

Se obtuvo un conjunto de 19 secuencias parciales del gen COI, entre 550-695 pb. El BLAST de la secuencia consenso de 656 pb identificó las muestras como *Crassostrea columbiensis* con un porcentaje muy bajo de identidad (87%), por lo que no se considera esta identificación como válida.

El árbol y la matriz de distancias de las secuencias obtenidas, mostró igualmente la distancia más próxima con *C. columbiensis*, pero con distancias muy grandes (Fig. 3)

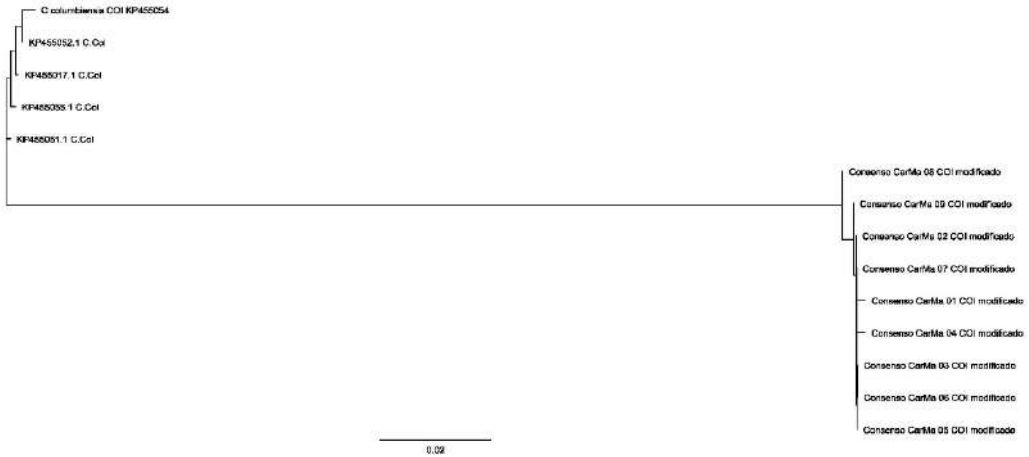


Figura 3. Árbol de distancias de secuencias COI (muestras problema CarMa y accesos GB *C. columbiensis*).

ARN 28S ribosómico

El marcador ARNr 28S permitió una rápida y simple estandarización sin mayores problemas, revelando una banda de ~800 pb.

Se obtuvieron 18 secuencias entre 537-818 pb. El BLAST de estas secuencias identificó las muestras con varias especies del género *Crassostrea* (*C. corteziensis*, *C. virginica* y *C. columbiensis*), siendo el mayor porcentaje de identidad de alguna muestra *C. columbiensis* (98%).

El árbol y la matriz de distancias realizado con las secuencias obtenidas, no muestran una distancia próxima a ninguna de las especies anteriores (Fig. 4), siendo este marcador efectivo para la identificación de varias especies de ostreidos en México (Mazón et al., 2016) (Fig. 4)

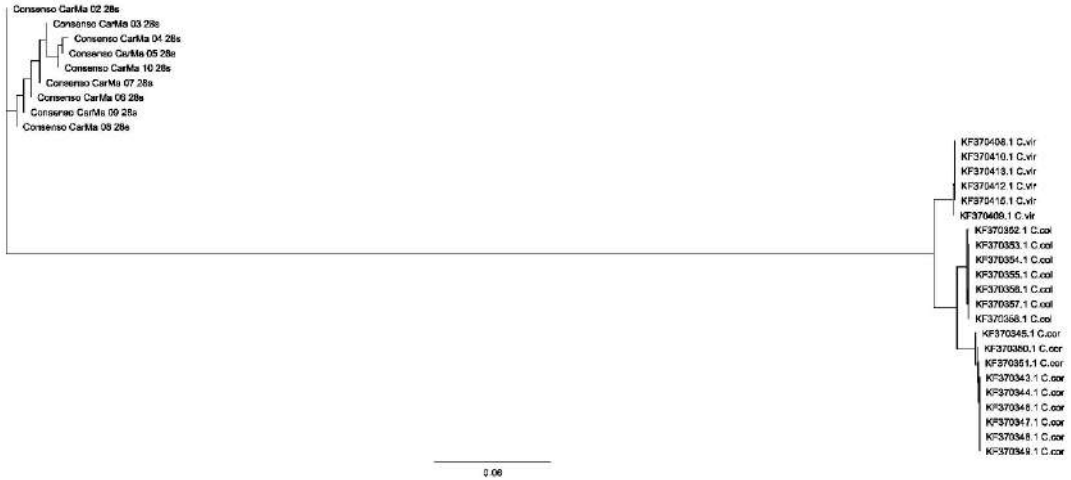


Figura 4. Árbol de distancias de secuencias ARNr 28S (muestras problema y accesos especies de *Crassostrea*, GB: *C. columbiensis*, *C. corteziensis*, *C. virginica*).

CONCLUSIONES

El análisis taxonómico usando características morfológicas, no proyecta una clara identificación, aunque se focaliza en *Crassostrea aequatorialis* o *Crassostrea corteziensis*.

Los análisis moleculares muestran que las secuencias con los dos marcadores utilizados, COI modificado y ARNr 28S, generaron diferentes grados de identidad del organismo respecto a las secuencias de las especies más próximas identificadas en el BLAST del GenBank. No se llegó a una identificación correcta de la especie estudiada.

Dada la dificultad de identificación morfológica de la especie y la baja relación genética de las especies caracterizadas, que sugieren que no existe un registro genético de las secuencias obtenidas, se generan las siguientes hipótesis:

Es una especie de ostreido que no tiene registros de secuencias en GB, y/o es una nueva especie para el conocimiento científico.

Para verificar estas hipótesis, consideramos que se debe realizar un estudio más profundo de este organismo utilizando un enfoque integrador de análisis biométricos, morfológicos, ecológicos, biogeográficos y genéticos con el fin de obtener una identificación de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa CYTED (red AquaCibus 318RT0549 "Fortalecimiento de la acuicultura en Iberoamérica: calidad, competitividad y sostenibilidad") por promover las interacciones entre los autores.

REFERENCIAS

- Brito, M.J., Mora E. 2017. *Moluscos marinos distribuidos en la primera milla de la costa ecuatoriana*. INP, Guayaquil, Ecuador. 282 pp.
- Castillo Z, García-Cubas A. 1984. Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol.* Univ. Nal. Auton. Mexico, 13(2):249-314.
- Coan, Eugene & Valentich-Scott, Paul. 2012. *Bivalve seashells of tropical west America. Marine bivalve mollusks from Baja California to Peru*. Santa Barbara Museum of Natural History.95pp.
- Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol Ecol Res*, 13: 851–861. doi:10.1111/1755-0998.12138.
- Goldstein PZ, DeSalle R. 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *BioEssays* 33:135–147.
- Mazón-Suástegui JM, Trabal-Fernández N, Leyva-Valencia I, Cruz-Hernández P, Latisnere-Barragán H. 2016. 28S rDNA as an alternative marker for commercially important oyster identification. *Food control* 66: 205-214. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.006.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:16.