

Caracterización molecular de recursos marinos de interés comercial en Ecuador: estudios preliminares

Quinteiro¹ J., González-Henríquez² N., Tomalá-Reyes³ S., Flores-Suárez³ D., Balón-Lainez³ K., Rodríguez-Pozo³ J., Cornejo³ M.H., Chavarría-Viteri³ J., Melena-Cevallos³ J. & Villón³ J.J.

¹Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. CIBUS, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela, 15706, Santiago de Compostela, A Coruña, España.

javier.quinteiro@usc.es

²Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España.

³Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena. Ecuador

Palabras clave

Anadara spp., *Ucides occidentalis*, *Cardisoma crassum*, *Opisthonema* spp., filogenia, COX1, 16S rRNA, Ecuador

Introducción

La identificación de especies marinas utilizando métodos taxonómicos tradicionales está a menudo entorpecida por controversias taxonómicas. El concepto relativamente nuevo del código de barras genético en la perspectiva marina es de interés, ya que esta técnica molecular puede ser útil en la evaluación de especies crípticas muy extendidas en el medio marino. Otras ventajas incluyen estudios de la diversidad biológica, genética de la conservación y la detección de especies exóticas u organismos no nativos en el medio marino. La

caracterización genética es uno de los puntos de partida para lograr objetivos de conservación de las especies, mantener la máxima cantidad de diversidad genética, así como una herramienta útil para la gestión de los recursos explotados, para ayudar a establecer los sistemas de uso y manejo de las especies. La utilización de secuencias de ADNmt específicas para la identificación rápida de especímenes no es nueva, sin embargo lo que es innovador del Código de Barras de ADN es que propone usar información dentro de una misma región génica, el gen COX1 del ADNmt, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación estandarizadas. Los esfuerzos mundiales de códigos de barras de ADN en el hábitat marino incluyen Marbol, FishBol, CeDAMar, CMarZ, Tiburón-BOL, PeBOL, etc. Este trabajo es un estudio preliminar para la caracterización de las especies de interés comercial de Ecuador, se diseñaron primers específicos para cada grupo y se realizó una primera inferencia de las relaciones filogenéticas, en cada una de las especies estudiadas, mediante las secuencias parciales de los genes COX1 y 16SrRNA.

Materiales y métodos

A partir de tejidos de los organismos se ha procedido al aislamiento del ADN total (Tabla I) mediante los Kit Omega Bio-Tech (The E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit; The de los genes mitocondriales COX1 y 16S rRNA, con cebadores universales LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) y 16S rRNA (Palumbi *et al.*, 1991), se realizó mediante los protocolos descritos en Quinteiro *et al.* (2015). Las secuencias nucleotídicas del 16S rRNA y las del fragmento del gen COX1, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011) y estimadas las relaciones filogenéticas mediante el cálculo de distancias y reconstrucción filogenética con el algoritmo de Neighbor-Joining con el software MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas con la base de datos de GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), utilizando el software en línea Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Se diseñaron cebadores específicos usando las secuencias del gen COX1 en cada una de los géneros y/o especies estudiadas (Tabla II). Las secuencias consenso parciales amplificadas con los cebadores específicos diseñados en el gen COX1 del ADNmt, se han utilizado para reconstruir las relaciones filogenéticas de las especies de los géneros *Anadara* y *Opisthonema*. En el caso de *Cardisoma crassum* y *Ucides occidentalis*, se han utilizado las secuencias consenso de 16S rRNA debido a la falta de secuencias del COX1 disponibles en las bases de datos de las especies congénicas, lo que impide su aplicación a la inferencia de las relaciones filogenéticas.

Tabla I.- Listado de organismos estudiados.

ANADARA			OPISTHONEMA			UCIDES	CARDISOMA
ASIM M197	ATUB - GMO111	AGRA M169	OLIBM 695 M	OBULSELS 284 A	OMEDSELS 297	UOCC-GMO258	CCRA EEL 424
ASIM M198	ATUB - MACH181	AGRA M175	OLIBM 696 M	OBULSELS 287	OMEDSELS 298 A	UOCC -GMO274	CCRA EEL 433
ASIM M199	ATUB - MACH191		OLIBM 700 A	OBULMSA 649	OMEDSELS 358	UOCC-GBA488	CCRA EEL 439
ASIM GMO251	ATUB - ESME393				OMEDSELS 368	UOCC-GBA496	CCRA EEL 453
	ATUB - ESME412				OMEDSELS 383	UOCC-GBA497	CCRA EEL 460
						UOCC-GBA508	CCRA SEPA 639
							CCRA SEPA 642
							CCRA SEPA 646

Tabla II.- Nuevos cebadores/*primers* específicos diseñados.

ESPECIES	PRIMERS ESP.	SECUENCIAS 5''	TM T ^a
<i>Anadara</i> spp.	ANA-COX1-1F	5' GTGCTGGRACCTGGTTGGACT-3'	61
	ANA-COX1-2R	5'-CACCTCCACCTTGAGGACGA-3'	63
<i>Opisthonema</i> spp.	OPIS-COX1-1F	5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3'	62
	OPIS-COX1-2R	5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3'	62
<i>Ucides occidentalis</i>	UCI-COX1-1F	5'-AGTAGTTACAGCCACGCCTT-3'	61
	UCI-COX1-2R	5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3'	61
<i>Cardisoma crassum</i>	CCRA-COX1-1F	5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3'	60
	CCRA-COX1-2R	5'-GCTGCTARGGGTGGGTAAAC-3'	61

Resultados y discusión

Opisthonema spp.

La amplificación con los primers COX1F/COX2R (Quinteiro, unpubl.), generó un fragmento de, aproximadamente, 1800 pb conteniendo la secuencia completa del gen mitocondrial COX1. A partir de este fragmento se elaboró un alineamiento de 462 nucleótidos de longitud, incluyendo secuencias propias de *O. bulleri* (N=2), *O. medirastre* (N=4) y *O. libertate* (N=2). Además, se incluyeron un total de 23 secuencias parciales disponibles

en el Genbank para estas especies, conteniendo la única especie congénérica atlántica, *O. oglinum*. No ha sido posible considerar en este análisis a la especie endémica de Galápagos, *O. berlangai*.

Las tres especies congénéricas analizadas con distribución pacífica, se agrupan monofiléticamente con un elevado soporte de replicación (98%) (Fig. 1). Sin embargo, no se obtiene una clarificación de las relaciones entre estas especies, pudiendo deberse a una rápida y simultánea especiación de ellas y a la no inclusión de *O. berlangai* en el análisis. Como especie hermana de este grupo pacífico se sitúa *O. oglinum*, con distribución atlántica y mostrando una divergencia esperable para la separación interoceánica.

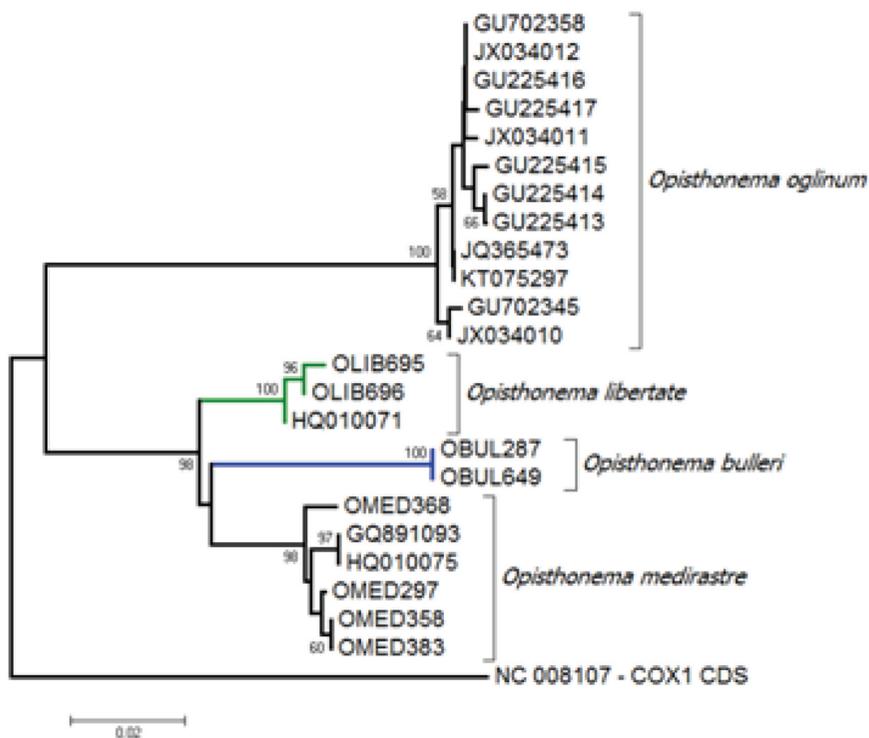


Figura 1.- Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *Dorosoma cepedianum* (NC 008107-COX1 CDS). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Anadara spp.

La secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer et al., 1994), ha permitido obtener un alineamiento de 661 pb de secuencias parciales de gen mitocondrial COX1 en 3 individuos de *A. similis* y 5 de *A. tuberculosa*. Se han incluido datos homólogos disponibles en el Genbank para *A. grandis* y *A. similis*, tomando a *A. notabilis* como especie externa (*outgroup*).

La divergencia entre las especies *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* es elevada, superior al 10%. Los individuos de ambas especies se agrupan monofiléticamente en sendos clados divergentes y bien soportados con valores de replicación del 100% (Fig. 2). *Anadara grandis* se sitúa como especie hermana de ambos taxa, utilizándose *A. notabilis* como grupo externo más próximo a las especies consideradas. La clasificación actual de *A. grandis* (Huber, 2015) como *Larkinia grandis* (Broderip & Sowerby, 1829) es incongruente con su posición en el árbol, donde se encuentra incluida entre las especies del género *Anadara*.

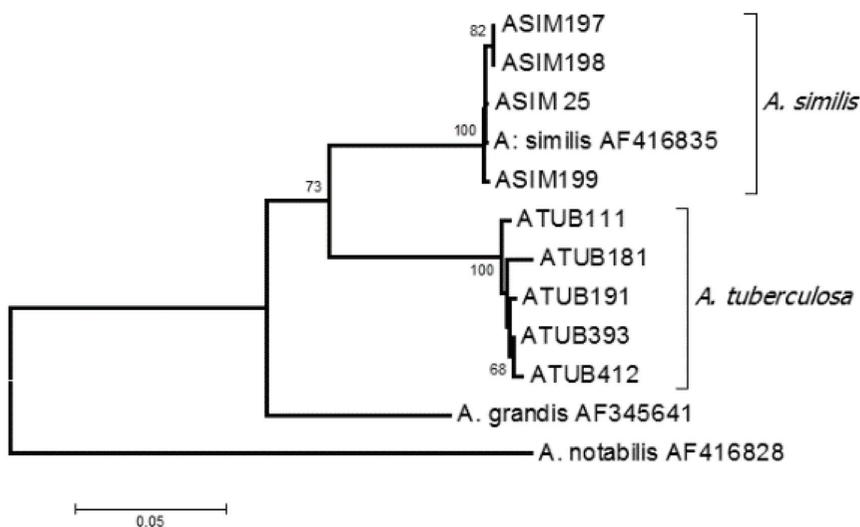


Figura 2.- Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial COX1. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *A. notabilis*. El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Ucides occidentalis (Ortmann, 1897)

La amplificación con los cebadores 16Sar-5' y 16Sbr-3' (Palumbi *et al.*, 1996), ha permitido la obtención de un alineamiento de 530 pb de longitud incluyendo 6 individuos de dos localidades en *Ucides occidentalis* (UOCCGMO258; UOCCGMO274; UOCCGBA488; UOCCGBA496; UOCCGBA497; UOCCGBA508).

Se han obtenido 5 haplotipos diferentes que se agrupan con otros haplotipos previamente descritos (Ordinola, 2012) para Tumbes (Perú). Como clado hermano se sitúan los haplotipos de la única especie congénérica, *Ucides cordatus*, mostrando la relación de especies hermanas con distribuciones aisladas por el Istmo de Panamá (Fig. 4).

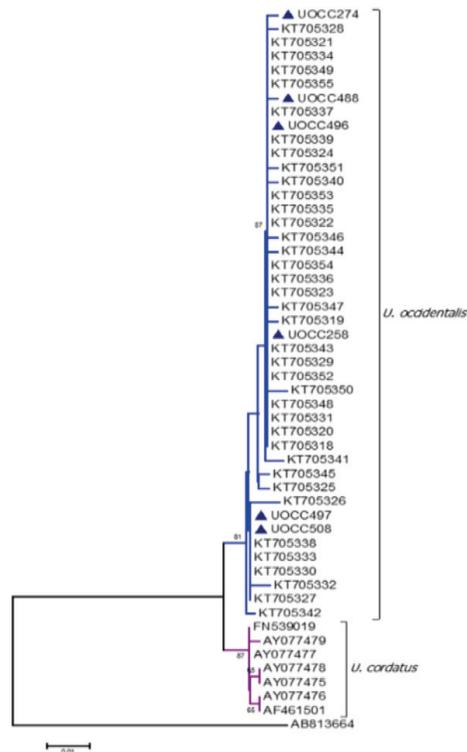


Figura 4.- Árbol filogenético obtenido del programa MEGA mediante el método de Neighbor-Joining y basado en secuencias parciales del gen mitocondrial 16SrRNA. Las distancias fueron calculadas según Tamura-Nei (1993), siendo eliminadas las posiciones ambiguas en las comparaciones entre pares. Como grupo externo fue incluido *Uca herradurensis* (AB813664). El soporte de las ramas fue obtenido por replicación (2000), ocultándose los valores inferiores al 50%.

Conclusiones

- ❖ Las tres especies congénéricas de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. libertate*, *O. medirastre*) se agrupan monofiléticamente, pero no se observa una clarificación en la relaciones filogenéticas entre éstas tres especies, pudiendo deberse a una rápida y simultánea especiación de ellas o a la no inclusión de la especie endémica de Galapagos, por lo que es necesario incluir muestras de la especie *O. berlangai* en próximos trabajos para poder hacer los análisis.
- ❖ La divergencia entre las especies *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* es elevada, se agrupan monofiléticamente en clados divergentes con valores de replicación del 100%. *Anadara grandis* se sitúa como especie hermana de ambos taxa, por lo que resulta incongruente su clasificación actual como *Larkinia grandis*.
- ❖ Se comprobó la dificultad de la secuencia 16S rRNA para definir relaciones filogenéticas recientes entre las especies próximas (monofileticas) de *Cardisoma*. La ausencia de secuencias homólogas del gen COX1 para las especies congénéricas, impidió su aplicación para hacer la inferencia filogenética en este trabajo.
- ❖ Se obtuvieron 5 haplotipos diferentes para *Ucides occidentalis*, que se agruparon con otros previamente descritos para Tumbes (Perú). Como clado hermano se sitúan los haplotipos de la única especie congénérica, *Ucides cordatus*, mostrando la relación de especies hermanas con distribuciones aisladas por el Istmo de Panamá.

Agradecimientos

Al Programa PROMETEO (SENESCYT, Gobierno de Ecuador). A la Universidad Estatal Península de Santa Elena (CIBPA, CIAP, laboratorios de biología y microbiología), y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL (Escuela Politécnica del Litoral). A los Laboratorios, SISMOL de la Universidad de Santiago de Compostela y BIOMOL de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Bibliografía

- Folmer O. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 249-299.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, Series 41: 95-98.
- Huber M. 2015. *Compendium of bivalves 2*. Harxheim: ConchBooks. 907 pp.
- Ordinola, A. 2012. Diversity and population genetic structure of mangrove crab (*Ucides occidentalis*) in the Tumbes region. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Palumbi S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*, 2nd ed., Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds.) Pp. 205-247. Sinauer Associates Inc.
- Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Pérez-Martín R.I., Rey-Méndez M. & Mackie I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in species Identification of Canned Tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:1662-1669.
- Quinteiro J., Manent P., Assunção P., Medina C. & Sarmiento R. 2015. *Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas*. Edit. González N. & Rey-Méndez M. BIOMOL Revisión N° 1. Marzo 2015.
- Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10:512-526.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731-2739.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A. & Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725–2729.

