

## **Banco Genético Marino de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (Barcoding RBGC)**

**C. Medina-Alcaraz<sup>1</sup>, R. Sarmiento-Herrero<sup>1</sup>, D. Benítez-Díaz<sup>2</sup>, J.A. Méndez-Rodríguez<sup>2</sup>, P. Pérez-Suárez<sup>3</sup>, A. Báez-Acosta<sup>4</sup>, M.F. Marrero-Escudero<sup>4</sup> y N. González-Henríquez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Biodiversidad Molecular (BioMol). Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. C/Camino de Salvago S/N. 35017 Las Palmas de Gran Canaria. España. E-mail: carolina.medina106@alu.ulpgc.es

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Sistemas Inteligentes y Aplicaciones Numéricas en Ingeniería. Edificio Central del Parque Científico y Tecnológico. Campus Universitario de Tafira, 35017. Las Palmas de Gran Canaria. España.

<sup>3</sup>Servicio de Medio Ambiente-Reserva de la Biosfera de Gran Canaria. C/Profesor Agustín Millares Carló, nº14, 1ª Planta. Edificio Insular I, 35003. Las Palmas de Gran Canaria. España.

<sup>4</sup>Servicio de Pesca del Cabildo de Gran Canaria. Carretera General del Norte, kilómetro 7,2. 35415. Cardones, Arucas. España.

### **RESUMEN**

La declaración de una parte de Gran Canaria como Reserva de La Biosfera (30 de Junio de 2005) ha sido una oportunidad única para apostar por el uso racional de la biodiversidad para el beneficio de las poblaciones locales tanto en el ámbito terrestre como marino.

Uno de los objetivos del Plan de Acción 2013-2020 de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC) en el medio marino, es la creación del Banco Genético Marino a través de un censo genético de la biodiversidad marina, acorde a los objetivos planteados en la iniciativa del código de barras de la vida (Barcode of Life).

Este Banco Genético pretende consolidarse como un inventario actualizado y censo genético de la Biodiversidad marina de la RBGC, con aplicaciones diversas para su conservación:

- ❖ Servir como un código de barras local de la iniciativa global del Barcode of Life, que mejorará las deficiencias detectadas en el inventario y censo de la biodiversidad marina de la RBGC.
- ❖ Detectar la relevancia de la diversidad filogeográfica y filogenética de las especies marinas residentes en la RBGC, dentro del archipiélago canario así como con otras regiones marinas.

Con estos objetivos se ha elaborado la Base de datos del Banco Genético Marino de la RBGC. Se han obtenido 368 secuencias del gen COX1 correspondientes a 69 especies. Las secuencias del gen COX1 serán incluidas en el Barcoding of Life (BOLD).

Los resultados servirán para abarcar una amplia gama de conocimientos sobre la biodiversidad marina y la gestión de la zona marina en la RBGC.

**PALABRAS CLAVE:** Biodiversidad marina, COX1, código de barras y censo genético.

## INTRODUCCIÓN

La declaración de una parte de Gran Canaria como Reserva de La Biosfera (30 de junio de 2005), ha sido una oportunidad única para apostar por el uso racional de la biodiversidad de Gran Canaria para el beneficio de las poblaciones locales tanto en el ámbito terrestre como marino.

La conservación de la Biodiversidad marina de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC) y el uso sostenible de sus recursos naturales por parte de sus habitantes, deberían ser la piedra angular del Plan de Acción de la RBGC en el medio marino. A nivel genético la biodiversidad actual ha sido resultado de procesos evolutivos que han tenido lugar a lo largo de la historia de las especies, por lo que las medidas de conservación propuestas en áreas protegidas también justifican el mantenimiento de tales procesos.

En el Plan de Acción de la RBGC 2013-2020 se propuso la creación del Banco Genético Marino de la RBGC, el cual pretende a largo plazo consolidarse como un inventario genético de la Biodiversidad marina de la RBGC, con aplicaciones diversas para su preservación: (i) servir como un código de barras local de la iniciativa global del Barcode of

Life, que mejorará las deficiencias ya detectadas en el inventario bionómico de la RBGC, mediante la generación de datos, (ii) la variación (filo)geográfica local, (iii) detectar la relevancia de la diversidad filogenética de las especies marinas residentes en la RBGC respecto a las de la isla de Gran Canaria, del archipiélago canario así como con otras regiones macaronésicas. Para ello, se utiliza una única porción concreta del gen COI del ADN mitocondrial, la cual ha sido sugerida como una herramienta eficiente con valor taxonómico en la delimitación e identificación de numerosos taxa marinos. Su uso para describir e inventariar la biodiversidad se ha convertido en una práctica relevante que ha permitido identificar organismos así como diferenciar especies crípticas, basándose solamente en la secuencia de un fragmento corto del ADN. Así, la información filogenética contenida en este gen ofrece un tipo de información exclusiva respecto a otras técnicas complementarias tradicionales usadas en la conservación de la Biodiversidad, que puede ayudar a esclarecer los procesos evolutivos y demográficos relacionados con la evolución de las especies marinas canarias, y destacar aquellas divergencias filogeográficas particulares respecto a la biota marina de otras regiones del mundo e identificar la presencia de especies invasoras (Molnar *et al.*, 2008). Además, como las secuencias nucleotídicas del gen COI obtenidas serán de obligado acceso público a través de internet, la información de esta biblioteca de datos podrá ser divulgada y utilizada por cualquier tipo de usuario, tanto en el ámbito científico como administrativo.

El objetivo de este trabajo es la creación del Banco Genético Marino a través de un censo genético de la biodiversidad marina de la RBGC, acorde con la iniciativa del código de barras de la vida (Barcode of Life).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

Se realizaron campañas de muestreo en cinco localizaciones geográficas de la isla de Gran Canaria (Agaete, Mogán, La Aldea de San Nicolás, Tasartico, Veneguera) dentro de la parte marina de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC), con un total de 415 muestras de individuos de distintas especies marinas (teleósteos, moluscos, equinodermos, artrópodos y cnidarios), de las zonas intermareal y submareal. El número de muestras procesadas en cada localización es el siguiente: Agaete, situada al noroeste de Gran Canaria (N=106), realizándose 5 tomas de muestra en la zona submareal; Mogán, situada al suroeste (N=13); La Aldea (N=110), Tasartico (N= 106) y Veneguera (N=81) situadas al oeste de la isla. (Fig. 1).



**Figura 1.-** Mapa con los puntos de muestreo trabajados en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC). Realizado con Google Map.

## **Aislamiento, amplificación y secuenciación del ADN**

Las muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su preservación. Cada individuo con su código correspondiente fue fotografiado tomando un ictiómetro de referencia. Se procedió a la extracción de una porción de tejido de cada individuo conservándolo en etanol de  $96^{\circ}$  hasta la extracción de ADN.

Para la extracción se tomaron aproximadamente 30 mg del tejido y se utilizaron dos kits comerciales, E.Z.N.A. Tissue DNA Kit (OMEGA) para la extracción de ADN a partir de tejido de peces y E.Z.N.A. Mollusc DNA Kit (OMEGA) para la extracción de ADN a partir de tejido de invertebrados. Una vez realizada la extracción, se determinó cualitativa y cuantitativamente el ADN genómico.

La amplificación de un fragmento del gen COX1 para teleósteos se realizó con los cebadores FishF2 y FishR2 (Ward *et al.*, 2005) y para invertebrados se realizó con los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

Las reacciones incluyeron  $1,25\ \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  ( $2,5\ \text{mM}$  teleósteos;  $1,5\ \text{mM}$  invertebrados),  $1\ \mu\text{L}$  de ADN ( $2\text{-}20\ \text{ng}/\mu\text{L}$ ),  $1\ \mu\text{L}$  de dNTPs ( $10\ \text{mM}$ ),  $2,50\ \mu\text{L}$  de Buffer Green 5X para GoTaq (Promega) y  $0,06\ \mu\text{L}$  de la enzima GoTaq (Promega), diluidos en agua MiliQ autoclavada, para un volumen total de  $12,5\ \mu\text{L}$ . Las condiciones térmicas de la reacción de PCR fueron las siguientes: 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$ ; 36 ciclos de 40 seg a  $94^{\circ}\text{C}$ , 50 seg a  $50^{\circ}\text{C}$  y 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 7 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para teleósteos/ 3 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 35 ciclos de 40 seg a  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 seg a  $60^{\circ}\text{C}$  y 2 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 7 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para invertebrados.

Los productos de PCR fueron purificados con ExoSAP-It (Affymetrix), para digerir los cebadores y desactivar los dNTPs libres. La reacción de secuenciación se llevó a cabo usando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Los productos de extensión se purificaron con el kit comercial BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). La secuenciación se realizó con el Analizador Genético ABI3500 (Applied Biosystems). Las secuencias brutas fueron tratadas y alineadas para su edición mediante software especializados (Genieous (Kearse *et al.*, 2012) y BioEdit (Hall 1999)).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se creó una base de registros que contiene 10.375 datos, de los cuales 415 son de muestras de tejido y 415 de extractos de ADN (peces e invertebrados), el resto se corresponden con información del procesamiento de los mismos hasta la obtención de las secuencias y su confirmación en bases de datos internacionales (Tabla 1).

**Tabla I.-** Recuento del número de muestras, especies, secuencias de especies identificadas por localidades y totales de la base de datos. \*Muestras de las Cofradías de pescadores; \*\*Muestras de campañas costeras.

LOCALIDADES	AGAETE (AG)*	LA ALDEA (AL)**	MOGAN (MO)*	TASARTE-TASARTICO (TA)**	VENEGUERAS (VE)**	TOTAL
Nº MUESTRAS	106	108	13	107	81	<b>415</b>
PECES	90	6	9	33	27	162
INVERTEBRADOS	16	102	4	74	54	253
Nº ESPECIES	28	17	3	21	23	<b>67</b>
PECES	21	2	2	5	9	32
INVERTEBRADOS	7	15	1	16	14	35
Nº SECUENCIAS	104	93	11	92	68	<b>368</b>
Nº ESPECIES IDENTIFICADAS	25	13	3	15	23	<b>65</b>

Se obtuvieron un total de 368 secuencias que pertenecían a 67 especies, de las cuales 65 fueron identificadas y cotejadas con secuencias del GenBank y Bolt. De las 67 especies el 47% son especies de peces y el 53% de invertebrados. Hay dos especies de blénidos que no fueron identificadas, pertenecientes a la clase Actinopterygii, ya que no pudieron ser cotejadas con secuencias de referencia en las bases internacionales.

De las 368 secuencias obtenidas, el 88,5% poseía una calidad media-alta ( $\geq Q30$ ), el 8,7% una calidad baja ( $\leq Q30$ ) y el 2,8% fueron secuencias fallidas (sin secuencia) debido a que la mayor parte de ellos eran invertebrados y no se pudo optimizar el proceso de extracción de ADN.

## CONCLUSIONES

Estos trabajos, basados en la iniciativa de códigos de barras de ADN, han ayudado a la confirmación taxonómica de 415 organismos marinos y ha servido como herramienta complementaria al censo bionómico de especies de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria.

Se han obtenido 368 secuencias del gen COX1 correspondientes a 69 especies cotejadas con las bases internacionales (GenBank y BOLD).

Se ha puesto en marcha el Banco Genético de la RBGC elaborando un sistema informático con 10.375 datos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. and Vrijenhoek R. 1994. ADN primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5), 294-299.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series 41*(41), 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock, S. and Buxton, S. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Molnar J.L., Gamboa, R.L., Revenga C., and Spalding M.D. (2008). Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(9), 485-492.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R. and Hebert P.D.N. 2005. Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360, 1847-1857.



**Banco Genético Marino de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (Barcoding RBGC)**



Medina-Alcázar, C.<sup>1</sup>, Sarmiento-Herrero, R.<sup>1</sup>, Benítez-Díaz, D.<sup>1</sup>, Méndez-Rodríguez, J.A.<sup>1</sup>, Pérez-Suárez, P.<sup>1</sup>, Bdeza-Acosta, A.<sup>1</sup>, Marrero-Escudero M.F.<sup>1</sup>, González-Henriquez, N.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratorio de Biodiversidad Molecular (BioMol), Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, C/Comercio de Salgado S/N, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España.  
<sup>2</sup>Instituto Universitario de Sistemas Inteligentes y Aplicaciones Numéricas en Ingeniería, Edificio Central del Parque Científico y Tecnológico, Campus Universitario de Tafira, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, España.  
<sup>3</sup>Servicio de Medio Ambiente-Agua de la Reserva de Gran Canaria, C/Peñón Aguila Millares García, s/n, 35005, Las Palmas de Gran Canaria, España.  
<sup>4</sup>Servicio de Pesca del Cabildo de Gran Canaria, Carretera General del Norte, kilómetro 7.3, 35445, Canbano, Anas, España.  
 E-mail: carolina.medina106@ulpgc.es

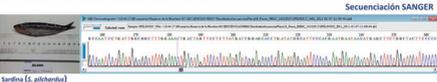
---

### INTRODUCCIÓN

Un enfoque taxonómico integrando secuencias de ADN y caracteres morfológicos logrará una mayor eficiencia en la identificación de especies. Con el desarrollo de nuevas y más rápidas técnicas, el código de barras de ADN (BARCODING) es una herramienta prometedora para la evaluación, análisis y conservación de la biodiversidad marina.

MarBOL, el código de barras marino de la vida, es una iniciativa internacional del código de barras para las especies marinas. MarBOL (<http://www.Marinebarcoding.org>)

El objetivo de este trabajo es la creación del Banco Genético Marino a través de un censo genético de la biodiversidad marina de la RBGC, acorde con la iniciativa del código de barras de la vida (Barcode of Life).



Secuenciación SANGER

### MATERIAL Y MÉTODOS



Puntos de muestreo RBGC



Procesado de las muestras en el laboratorio



Aislamiento del ADN y gel de agarosa al 1%



Amplificación por PCR

Indicador	Secuencia	Referencia
RAPE2	5'-TGCACATGACGACAAAGGACAGGACGACG-3'	Ward et al., 2005
RAPE3	5'-GATGTGAGAGGACGACAAAGGACGACG-3'	
LC0036	5'-GATGTGAGAGGACGACAAAGGACGACG-3'	
HC0036	5'-GATGTGAGAGGACGACAAAGGACGACG-3'	Palmer et al., 2004

---

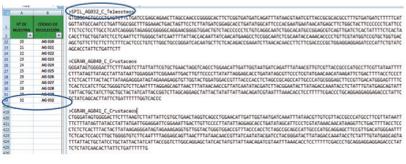
### RESULTADOS

LOCALIDADES	AGAETE (AG) <sup>1</sup>	LA ALDEA (AL) <sup>2</sup>	MOGAN (MO) <sup>3</sup>	TASARTE-TASARITICO (TA) <sup>4</sup>	VENEGUERAS (VE) <sup>5</sup>	TOTAL
<b>Nº MUESTRAS</b>	106	108	13	107	81	<b>415</b>
<b>PECES</b>	90	6	9	33	27	<b>162</b>
<b>INVERTEBRADOS</b>	16	102	4	74	54	<b>253</b>
<b>Nº ESPECIES</b>	28	17	3	21	23	<b>67</b>
<b>PECES</b>	21	2	2	5	9	<b>32</b>
<b>INVERTEBRADOS</b>	7	15	1	16	14	<b>35</b>
<b>Nº SECUENCIAS</b>	104	93	11	92	68	<b>368</b>
<b>Nº ESPECIES IDENTIFICADAS</b>	25	13	3	15	23	<b>65</b>

\*Muestras de las Cofradías de pescadores  
 \*\*Muestras de campañas costeras

- ❖ De las 415 muestras recolectadas se obtuvieron 368 secuencias.
- ❖ De las 67 especies determinadas previamente se han confirmado 65, quedando solo 2 pertenecientes (Góbidos-Bleníidos) por falta de secuencias en GenBank para confirmar.

### INVENTARIO Y CENSO DE BIODIVERSIDAD MARINA DE LA RBGC



---

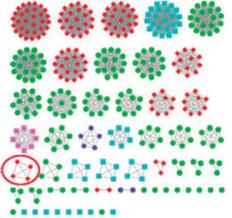
### BASE DE DATOS BARCODING RBGC

ID	LOCALIDAD	ESPECIE	GENUS	FAMILIA	ORDEN	CLASIFICACION	SECUENCIA	LONGITUD	FECHA	RECOLECTOR
1	AGAETE	...	...	...	...	...	...	...	...	...

### RELACIONES FILOGENÉTICAS Y CLUSTER

Clústers 95%  
Diagrama orgánico

- CNIDARIOS
- CRUSTÁCEOS
- EQUINODERMOS
- MOLUSCOS
- PORÍFEROS
- TELEOSTEOS

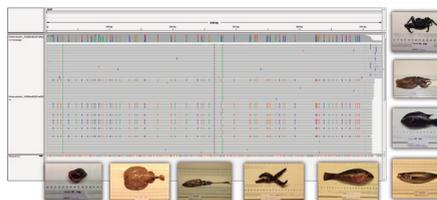


Árbol filogenético de especie ADAC con GenBank



---

### CONFIRMACIÓN DE ESPECIES Y DETECCIÓN DE POSIBLES ESPECIES FORÁNEAS



Aplysia dactylomela

### AGRADECIMIENTOS




ForoAul O Grove 10-11 octubre 2017