

Marcadores moleculares para la identificación genética de especies comerciales en Ecuador

González-Henríquez¹ N., Quinteiro² J., Flores-Suárez³ D., Tomalá-Reyes³ S., Balón-Lainez³ K., Rodríguez-Pozo³ J., Oñate³ D., Cornejo-Rodríguez³ M.H., Chavarría-Viteri³ J., Melena-Cevallos³ J., Villón³ J., Medina-Alcaraz¹ C. & Sarmiento-Herrero¹ R.

¹Departamento de Biología, BIOMOL, Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España. nieves.gonzalez@ulpgc.es

²Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular. CIBUS, Campus Vida, Universidade de Santiago de Compostela.

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

Palabras clave

Cebadores específicos, región control, *Anadara* spp, *Opisthonema* spp., *Ucides occidentalis*, *Cardisoma crassum*, PCR-RFLP.

Introducción

Las bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN son relativamente sencillas cuando se dispone de cebadores, diseñados específicamente para amplificar la región COX1 de un grupo taxonómico relativamente próximo, un género o especie. Los códigos de barras de ADN de la biodiversidad marina han sido más difíciles de lograr que los de la biodiversidad

terrestre debido a la amplia diversidad taxonómica y la falta de cebadores eficientes. Aunque algunos de los llamados cebadores “universales” han servido para este fin y han tenido éxito aleatorio incluso entre especies dentro de cada grupo, todavía no logran amplificar regiones específicas del COX1 en muchos grupos de animales marinos.

Los cebadores universales diseñados por Folmer *et al.* (1994) LCO1490/HCO2198, para la amplificación de un fragmento de 658 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COX1), han demostrado ser efectivos en la amplificación de este fragmento de gen en una amplia gama de especies marinas. Así, la región del ADN mitocondrial COX1, delimitada por los cebadores de Folmer se convirtió en la región de código de barras de ADN establecida para la identificación del reino animal. Se están realizando cada vez más estudios que tratan de examinar los códigos de barras de ADN de diferentes taxones animales, pero es evidente que el par de cebadores LCO1490/HCO2198 no es tan “universal” como se pensaba antes, ya que no amplifican algunos taxones. Además, la utilidad de los cebadores Folmer es limitada para algunos grupos como los crustáceos decápodos porque no están optimizados, debido a la presencia de pseudogenes, por ello la amplificación del COX1 es a menudo un reto.

En este trabajo se propone el uso de cebadores específicos para cada una de las especies estudiadas: *Anadara tuberculosa* (G. B. Sowerby I, 1833), *A. similis* (C. B. Adams, 1852), *A. grandis/Larkinia grandis* (Broderip & G. B. Sowerby I, 1829), *Opisthonema bulleri* (Regan, 1904), *O. libertate* (Günther, 1867), *O. medirastre* (Berry & Barrett, 1963), *Ucides occidentalis* (Ortmann, 1897), *Cardisoma crassum* (Smith, 1870), diseñados a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores Folmer COX1, para mejorar la amplificación de esa región, en una serie de organismos marinos de interés económico, con el fin de aportar herramientas rápidas y eficaces para la gestión de los recursos pesqueros en Ecuador.

Materiales y métodos

A partir de los tejidos de los organismos (Tabla I) se ha procedido al aislamiento del ADN total mediante los Kit Omega Bio-Tech (The E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit; The E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit). La amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes mitocondriales COX1 y 16S rRNA con cebadores universales LCO1490/HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) y 16S rRNA (Palumbi *et al.*, 1996), 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). 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>).

Para el diseño *in silico* de primers y enzimas de restricción se utilizó el software en línea OligoArchitect (Sigma-Aldrich) y Bioedit (Hall, 1999), respectivamente. Los nuevos cebadores para PCR y secuenciación, fueron sintetizados por METABION (Tabla II), a una escala de síntesis de 0,04 μM (ANA-COX1-1F, OPIS-COX1-1F, CCRA-COX1-2R) y 0,025 μM (ANA-COX1-2R, OPIS-COX1-2R, UCI-COX1-1F, UCI-COX1-2R, CCRA-COX1-1F). Para validar el funcionamiento de los nuevos *primers* se realizó un test 3x3, modificando parámetros básicos de la PCR, como la concentración de MgCl_2 (1,5 – 2,5 - 3,5 mM) y de ADN (0,1 μL , 1 y 2 μL). Las condiciones de PCR fueron las mismas para todos los primers, desnaturalización inicial a 95°C, durante 3 minutos; seguidos de 40 ciclos: desnaturalización a 95°C, durante 30 segundos, ligamiento a 60°C, durante 30 segundos y extensión a 72°C, durante 40 segundos; seguida de una extensión final de 72°C, durante 10 minutos. Para la validación de la especificidad de los primers se amplificó en el test ADNmt de otras especies (*Sardina pilchardus*, Walbaum 1792; *Grapsus adscensionis*, Osbeck 1765; *Patella aspera*, Röding 1798).

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'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-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

La ausencia generalizada de secuencias de la región control para estas especies ha implicado una previa caracterización de las zonas flanqueantes y del COX1. Para ello ha sido necesaria una primera aproximación con los cebadores 16Sa-5' y 16Sb-3' (Palumbi *et al.*, 1996) y los cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994).

Anadara (*A. similis*, *A. tuberculosa*, *A. grandis*): concha negra, casco de burro

Basándonos en los haplotipos obtenidos de *A. similis* y de *A. tuberculosa*, y el haplotipo depositado en el Genbank (AF345641) para *A. grandis*, se procedió al diseño *in silico* de un sistema de PCR-RFLP que permitirá la discriminación entre las 3 especies presentes en Ecuador. El sistema incluye los cebadores específicos ANA-COX1-1F (5'-GTGCTGGRACCTGGTTGGACT-3') y ANA-COX1-2R (5'-CACCTCCACCTTGAGGACGA-3'), destinados a la amplificación de un fragmento de 318 pb en el gen COX1. La especificidad se ha testado por el tamaño, mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%) (Fig. 1), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de las tres especies del género *Anadara* (*A. similis*, *A. tuberculosa*, *A. grandis*), no apareciendo en el control negativo con la especie *Patella aspera*.

La digestión *in silico* del amplicón generado en la PCR, con la enzima de restricción AluI (AG*CT), genera un patrón de fragmentos específicos para las 3 especies consideradas

(Tabla III), 3 fragmentos en *A. tuberculosa* (183, 72 y 63 pb), sólo un punto de corte en *A. similis* originando 2 fragmentos (255 y 63 pb) y en *A. grandis* 2 fragmentos de 246 y 72 pb.

Figura 1.- PCR con los cebadores específicos ANA-COX1 en gel de agarosa 2%.

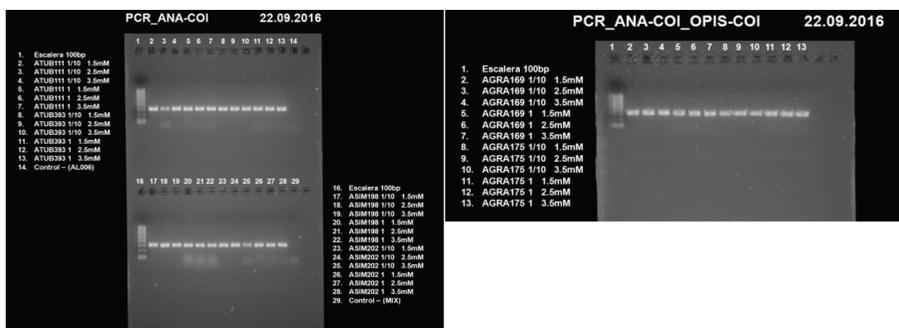
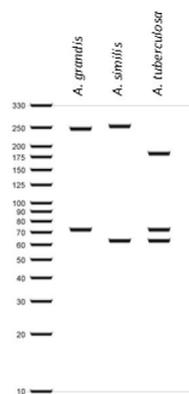


Tabla III.- Fragmentos y PCR-RFLP digestión *in silico* con AluI

Especies / Enzima AluI (AG*CT)		
<i>A. grandis</i>	<i>A. similis</i>	<i>A. tuberculosa</i>
246pb	255pb	183pb
72pb	63pb	72pb
		63pb



Este sencillo y económico protocolo evita el requerimiento de secuenciación para la discriminación entre las especies presentes en Ecuador. Su aplicación al control y gestión de las especies del género *Anadara* deberá ser evaluado en futuros estudios biológicos/ecológicos en aguas ecuatorianas.

Opisthonema (*O. bulleri*, *O. libertate*, *O. meridastre*): pinchagua, sardina crinuda

A partir de las secuencias analizadas del gen COX1 se diseñaron *in silico* los cebadores específicos OPIS-COX1-1F (5'-CCWCCTGCAATYTCACAATACCA-3') y OPIS-COX1-2R

(5'-TTCTGGGTGGCCAAAGAATCAG-3') que flanquean un corto fragmento de 210 pb. Este fragmento ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento para enzimas de restricción específicos, y además posee un tamaño amplificable a partir de ADN degradado, tal y como el extraído a partir de muestras de productos procesados, como transformados y conservas (Quinteiro *et al.* 1998), posibilitando así el análisis e identificación de tales productos comerciales. La especificidad de los cebadores se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de las tres especies del género *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. libertate*, *O. meridastre*) y en la especie de control negativo *Sardina pilchardus*, que no existe en el Pacífico (Fig. 2).

La digestión *in silico* del amplicón generado con los primers OPIS-COX1-1F y OPIS-COX1-2R con la enzima de restricción MboI (* GATC), origina patrones de restricción específicos de cada una de las 3 especies consideradas del Pacífico (Tabla IV). Para las 3 especies hay fragmentos comunes de 81 y 44 pb, sin embargo *O. bulleri* presenta un fragmento exclusivo de 93 pb, mientras que *O. medirastre*, muestra dos fragmentos específicos de 31 y 22 pb.

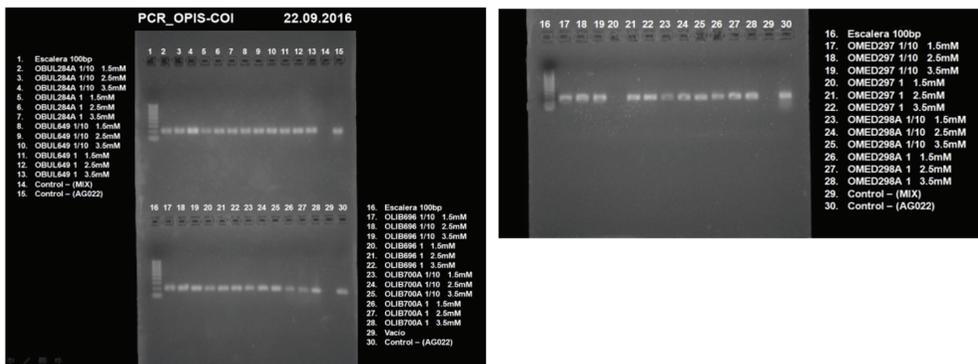
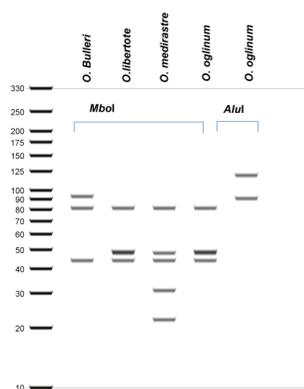


Figura 2.- PCR con los cebadores específicos OPIS-COX1 en gel de agarosa 2%.

Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para *O. berlangai* (Berry & Barrett, 1963), una especie endémica de Galapagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluidas en el presente análisis.

Tabla IV.- Fragmentos y PCR-RFLP digestión *in silico* con MboI.

Especies / Enzima Mbo I (* GATC)		
<i>O. bulleri</i>	<i>O. libertate</i>	<i>O. medirastre</i>
93 pb	81 pb	81 pb
81 pb	49 pb	48 pb
44 pb	48 pb	44 pb
	44 pb	31 pb
		22 pb



Ucides occidentalis: cangrejo rojo del manglar

Basándonos en toda la información disponible en las bases de datos genómicos y la generada en este trabajo, se ha seleccionado la secuencia parcial del COX1 para albergar un juego de cebadores UCI-COX1-1F (5'-AGTAGTTACAGCCCACGCCTT-3') y UCI-COX1-2R (5'-ACTCCGGCTAAATGAAGGGAG-3'), destinado a la amplificación de un producto de PCR de 297 pb. Esta amplificación permite la identificación y detección de ADN de *U. occidentalis*, su especificidad se ha testado y demostrado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de *U. occidentalis*. Además, es también verificable mediante PCR-RFLP, la digestión *in silico* del amplicón con la enzima BseGI (GGATG) produce dos fragmentos de 212 y 85 pb (Fig. 3).

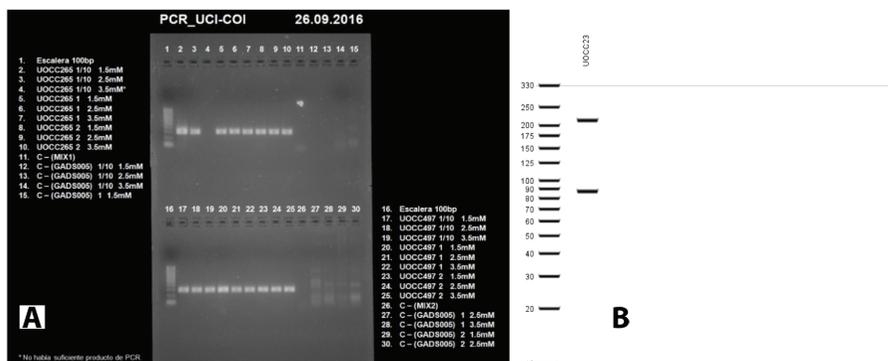


Figura 3.- A) PCR con los cebadores específicos UCI-COX1 en gel de agarosa 2%. B) PCR-RFLP digestión *in silico* con BseGI.

La disponibilidad de esta herramienta permite además la identificación de ADN de *U. occidentalis* en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), lo que permitirá la detección de etapas larvarias de esta especie en muestras zooplánctónicas. Este supuesto deberá ser evaluado en el marco de estudios biológicos/ecológicos en las poblaciones de *U. occidentalis* presentes en la costa ecuatoriana.

Cardisoma crassum: cangrejo azul del manglar

Basándonos en los alineamientos de 16S rRNA y COX1, se han evaluado las posiciones polimórficas presentes en cada juego de datos y se ha seleccionado el gen COX1 como más apropiado para el diseño de un juego de cebadores dirigidos a la detección de ADN de *Cardisoma*. Dentro de la secuencia COX1 se han diseñado *in silico* los cebadores CCRA-COX1-1F (5'-GGAAATTGGCTCGTACCCCT-3') y CCRA-COX1-2R (5'-GCTGCTARGGGTGGGTAAAC-3'), que generan un fragmento de 167 pb. La especificidad mostrada *in silico*, indica la limitación de estos cebadores para funcionar correctamente solo en las especies más próximas de *Cardisoma*. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa (2%), donde hay presencia de bandas en todas las muestras procesadas de *C. crassum* y en la especie de control negativo *Grapsus adscensionis* (Fig.4).

El sistema diseñado no posee especificidad para la especie *C. crassum*, sin embargo debido a la distribución alopátrica de las especies de este género, ello no es un requerimiento ya que es la única especie del género con una distribución que abarca la costa este del Pacífico, el resto de especies congénéricas cercanas se distribuyen exclusivamente en el Atlántico.

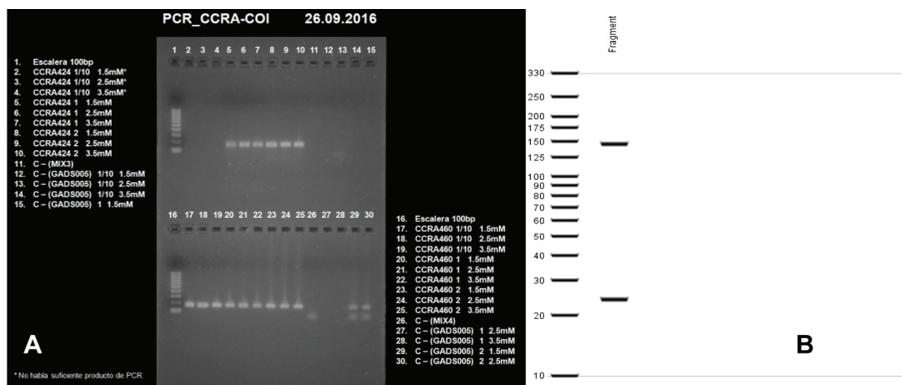


Figura 4.- A) PCR con los cebadores específicos CCRA-COX1 en gel de agarosa 2%. B) PCR-RFLP digestión *in silico* con BseGI

La especificidad de este fragmento para *C. crassum* se puede verificar *in silico*, además de por el tamaño, por PCR-RFLP mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BseGI (GGATG) que producirá dos fragmentos de 22 pb y 145 pb, confirmando así la naturaleza del fragmento obtenido (Fig. 4).

La disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de *C. crassum* en muestras zooplánctónicas, que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos/ecológicos a lo largo de todo el rango geográfico de distribución de la misma en la costa ecuatoriana.

Conclusiones

- ❖ Los *primers* específicos ANA-COX1 y la PCR-RFLP con Alu I, diseñados en este trabajo, permiten la identificación y detección de las especies comerciales de *Anadara* estudiadas, siendo recomendable su aplicación en el control y gestión de las poblaciones en las aguas ecuatorianas.
- ❖ La técnica de PCR-RFLP con la enzima de restricción Mob I origina un patrón de corte diferenciado para cada una de las tres especies comerciales de *Opisthonema* (*O. bulleri*, *O. libertate* y *O. mediraestre*), siendo esta una herramienta muy útil y rápida para la discriminación de las diferentes especies, aún en tejidos procesados como los de las conservas.
- ❖ Los *primers* específicos UCI-COX1 permitirán la detección de ADN de *U. occidentalis* en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), siendo verificable su especificidad además por digestión con la enzima BseGI mediante PCR-RFLP.
- ❖ El sistema diseñado *in silico* con los cebadores específicos CCRA para la amplificación de un fragmento del gen COX1 y la PCR-RFLP, con la enzima de restricción BseGI, no posee especificidad para la especie *C. crassum*. Sin embargo, la disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de *C. crassum* en muestras zooplánctónicas que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos/ecológicos en el futuro.

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.
- 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.
- 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.

Marcarores moleculares para a identificación genética de especies comerciais en Ecuador



González-Henríquez, N.¹, Quintero, J.¹, Flores-Suárez, D.¹, Tomalá-Reyes, Sh.¹, Balón-Lainez, K.¹, Rodríguez-Pozo, J.¹, Oñate, D.¹, Cornejo, M.H.¹, Chavarria-Viteri, J.¹, Melena-Cevallos, J.¹, Villón, J.¹, Medina-Alcaraz, C.¹, Sarmiento-Herrero, R.¹



Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena, Ecuador ¹
 Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España ¹
 Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, Universidade de Santiago de Compostela España ¹



Introducción

Las bibliotecas de referencia de códigos de barras de ADN son relativamente sencillas cuando se dispone de cebadores diseñados específicamente para amplificar la región COXI de un grupo taxonómico relativamente próximo, un género o especie. Los códigos de barras de ADN de la biodiversidad marina han sido difíciles de lograr que los de la biodiversidad terrestre debido a la amplia diversidad taxonómica y a falta de cebadores eficientes. Aunque algunos de los llamados cebadores "universales" han servido para este fin y han tenido éxito al menos en algunos grupos de animales marinos, todavía no logran amplificar regiones específicas del COXI en muchos grupos de animales marinos. Los cebadores universales diseñados por Folmer et al. (1994) (LC1490/HCO2198, para la amplificación de un fragmento de 658 pares de bases [pb] del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COXI), han demostrado ser efectivos en la amplificación de este fragmento de gen en una amplia gama de especies marinas. Así, la región del ADN mitocondrial COXI, utilizada por los cebadores de Folmer se convirtió en la región de código de barras de ADN establecida para la identificación del reino animal. Se están realizando cada vez más estudios que tratan de examinar los códigos de barras de ADN de diferentes taxones animales, pero es evidente que el par de cebadores LC1490/HCO2198 no es tan "universal" como se pensaba antes, ya que no amplifica algunos taxones. Además, la utilidad de los cebadores de Folmer en algunos grupos como los crustáceos, especialmente cangrejos, no está optimizada, debido a la presencia de pseudogenes, por ello la amplificación del COXI se a menudo un reto. En este trabajo se propone el uso de cebadores específicos para cada una de las géneros y especies estudiadas, Anadara (A. tuberculosa, A. similis, A. grandis), Opisthomena (O. bulleri, O. libertate, O. meridastri), Ucidis occidentalis, Cardisoma crinum, diseñados a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores Folmer (2010), para mejorar la amplificación de esa región, en una serie de organismos marinos de interés económico, en el fin de apoyar herramientas rápidas y eficientes para la gestión de los recursos pesqueros en Ecuador.

RESULTADOS

La ausencia generalizada de secuencias de la región codificante para estas especies ha implicado una previa caracterización de las zonas flanqueadas y del COXI. Para ello ha sido necesaria una primera aproximación con los cebadores 16Sα-5' y 16Sβ-3' (Palumbi et al., 1991) y los cebadores LC1490 y HCO2198 (Folmer et al., 1994).

Anadara (A. similis, A. tuberculosa, A. grandis)

Concha negra, Casco de burro

Basándonos en los haplotipos de A. similis y de A. tuberculosa, y el haplotipo depositado en el GenBank (AF345641) para A. grandis, se procedió al diseño in silico de un sistema de PCR-RFLP que permitiría la discriminación entre las 3 especies presentes en Ecuador. El sistema incluye los cebadores específicos ANA-COXI-1F (5'-GTGTGCGACATGCTGGTACCT-3') y ANA-COXI-2R (5'-CACCTCCACTTGAGGACGCA-3') destinados a la amplificación de un fragmento de 318pb en el gen COXI. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa al 2% (Figura 1).

La digestión in silico del amplicón generado en la PCR, con la enzima de restricción AclI (AGCT) genera un patrón de fragmentos específicos para las 3 especies consideradas (Tabla 1), 3 fragmentos en A. tuberculosa (183, 72 y 65pb), sólo un punto de corte en A. similis originando 2 fragmentos (255 y 65pb) en A. grandis 2 fragmentos de 246 y 72pb (Figura 1).

Este servicio y económico protocolo evita el requerimiento de secuenciación para la discriminación entre las especies presentes en aguas ecuatorianas. Su aplicación al control y gestión de las poblaciones del género Anadara deberá ser evaluado en futuros estudios biológicos-ecológicos en aguas ecuatorianas.



Figura 1. A y B Gels al 2% PCR con cebadores ANA-COXI. C y D Tabla y fragmentos de PCR-RFLP in silico con AclI

Ucidis occidentalis (Cangrejo rojo del manglar)

Basándonos en toda la información disponible en las bases de datos genómicas y la generada en este trabajo, se ha seleccionado la secuencia parcial del COXI para albergar un juego de cebadores UCI-COXI-1F (5'-AGATGATACAGCCAGCCCTT-3') y UCI-COXI-2R (5'-ACCTCCGCTTAGAGGAGGCA-3') destinado a la amplificación de un producto de PCR de 297pb. Esta amplificación permite la identificación y detección de ADN de U. occidentalis, su especificidad se ha testado y demostrado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa al 2% (Figura 5). Además, es también verificable mediante PCR-RFLP, la digestión in silico del amplicón con la enzima BseGI (GGATG) produce dos fragmentos de 212 y 85 pb (Figura 3).

La disponibilidad de esta herramienta permite además la identificación de ADN de U. occidentalis en muestras de agua del medio natural (muestras planctónicas), lo que permitirá la detección de etapas larvarias de U. occidentalis en muestras zooplanctónicas, este supuesto deberá ser evaluado en el marco de estudios biológicos-ecológicos en las poblaciones de esta especie presentes en la costa ecuatoriana.



Figura 2. A y B Gels al 2% PCR con cebadores OPS-COXI. C y D Tabla y fragmentos de PCR-RFLP in silico con BseGI

Cardisoma crinum (Cangrejo azul del manglar)

Basándonos en los alineamientos de 16S rRNA y COXI, se han evaluado las posiciones polimórficas presentes en cada juego de datos y se ha seleccionado el gen COXI como más apropiado para el diseño de un juego de cebadores dirigidos a la detección de ADN de Cardisoma. Dentro de la secuencia COXI se han diseñado in silico los cebadores CCR-COXI-1F (5'-GGAAATGGCTTCAGCTCCCT-3') y CCR-COXI-2R (5'-CCCTGCGATGGTGGTAAAC-3') que generan un fragmento de 167pb. La especificidad mostrada in silico, indica la limitación de estos cebadores para funcionar correctamente sólo en las especies más próximas de Cardisoma. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa 2% (Figura 4). El sistema diseñado no posee especificidad para la especie C. crinum, sin embargo debido a la distribución alopatrica de las especies de este género, ello no es un requerimiento ya que es la única especie del género con una distribución que abarca la costa este del Pacífico, el resto de especies cercanas se distribuyen exclusivamente en el Atlántico.

La especificidad de este fragmento para C. crinum se puede verificar in silico, además de por el tamaño, mediante PCR-RFLP mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BseGI (GGATG) que producirá dos fragmentos de 22pb y 145pb, confirmando así la naturaleza del fragmento obtenido (Figura 4). La disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de C. crinum en muestras zooplanctónicas que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos-ecológicos sobre las poblaciones de esta especie presentes en la costa ecuatoriana y más exhaustivamente a lo largo de todo el rango geográfico de distribución de la misma.



Figura 3. A y B Gels al 2% PCR con cebadores CCR-COXI. C y D Tabla y fragmentos de PCR-RFLP in silico con BseGI

Referencias bibliográficas
 Folmer, O. (1994). "DNA probes for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates." Molecular Marine Biology and Biotechnology, 2(4): 29-30.
 Hill, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acid Research News, 41: 91-96.
 Damiano, J., Sotelo, C.G., Rehben, J.I., Prado, L.J., Pérez-Martín, E.J., Rey-Méndez, M.L., & Macías, L.M. (1998). "Use of mtDNA D-loop Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in Species Identification of Corral Tuna, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:1992-1999.
 Damiano, J., Manceo, F., Acosta, F., Medina, C., Sarmiento, R. Guía de procesamiento y protocolos genéticos de especies marinas. ISE.
 Gonzalez N. & Rey-Mendez M. BOMOL, Invisión Nº 1 Marzo 2015.
 Palumbi, S. R. (1998). The polymerase chain reaction. Molecular systematics. D. M. Hill, C. Moritz and S. K. Mable. Sunderland, Mass. Sinauer Associates. Sinauer Associates, 205-247.

Materiales y Métodos

A partir de los tejidos de los organismos se ha procedido al aislamiento del ADN total mediante el Kit Omega Bio-Tech (Fluxus y MoBio). La amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes mitocondriales COXI y 16S rRNA con cebadores universales LC1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994) y 16S rRNA (Palumbi et al., 1991) se realizó mediante los protocolos descritos en Quintero et al., 2015. Las secuencias nucleotídicas del 16S rRNA y las del fragmento del gen COXI, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software MEGA versión 5 (Tamura et al., 2011). Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas contra la base de datos de GenBank (http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) Para el diseño in silico de primers y enzimas de restricción se utilizó el software en línea OligoArchitect (Sigma-Aldrich) & Bioedit (Hall, 1999), respectivamente. Los nuevos cebadores para PCR y secuenciación, fueron seleccionados por METASOFT, a una escala de bases de COXI (ANA-COXI-1F, OPS-COXI-1F, CCR-COXI-1F) y 16S rRNA (ANA-COXI-2R, OPS-COXI-2R, UCI-COXI-1F, UCI-COXI-2R, CCR-COXI-1F). Para validar el funcionamiento de los nuevos primers se realizó un test 3x3, modificando el tamaño del producto de la PCR, como la concentración de bases (0.1, 1, 1.5, 3, 5 mM) y del ADN (0.1, 1, 1.5, 3, 5 μg). Las reacciones de PCR fueron las mismas para todos los primers, desnaturalización inicial 95 °C, durante 3 minutos; seguidos de 40 ciclos: desnaturalización 95°C, durante 30 segundos, ligamiento 60°C, durante 30 segundos y extensión 72°C, durante 40 segundos; seguida de una extensión final de 72°C, durante 10 minutos. Para la validación de la especificidad de los primers se amplificó en el test ADN de otras especies (Squilla palustris, Grapsus aculeatus, Peltodya ussuriensis sp.nova).

Tabla 1.- Listado de organismos estudiados y cebadores primers específicos diseñados

GENERO	ESPECIE	PRIMER 5'	PRIMER 3'	SECUENCIA 5'	SECUENCIA 3'	TAMPO
ANADARA	ANADARA	ANA-COXI-1F	ANA-COXI-2R	5'-GTGTGCGACATGCTGGTACCT-3'	5'-CACCTCCACTTGAGGACGCA-3'	61
OPISTHOMENA	OPISTHOMENA	OPS-COXI-1F	OPS-COXI-2R	5'-AGATGATACAGCCAGCCCTT-3'	5'-ACCTCCGCTTAGAGGAGGCA-3'	62
UCIDIS	UCIDIS	UCI-COXI-1F	UCI-COXI-2R	5'-AGATGATACAGCCAGCCCTT-3'	5'-ACCTCCGCTTAGAGGAGGCA-3'	61
CARDISOMA	CARDISOMA	CCR-COXI-1F	CCR-COXI-2R	5'-GGAAATGGCTTCAGCTCCCT-3'	5'-CCCTGCGATGGTGGTAAAC-3'	60

Opisthomena (O. bulleri, O. libertate, O. meridastri)

Pinchagua, Sardina crinuda.

A partir de las secuencias analizadas del gen COXI se diseñaron in silico los cebadores específicos OPS-COXI-1F (5'-CCWCTCGAAYTCAACAATCA-3') y OPS-COXI-2R (5'-TCTGTGGTGGCCAAAGATGAG-3') que flanquean un corto fragmento de 210pb. Este fragmento ha sido seleccionado debido a que contiene sitios de reconocimiento para enzimas de restricción específicas, y además posee un tamaño apropiado a partir de ADN degradado, tal y como el extraído a partir de muestras de productos procesados, como transidos y conservas (Quintero et al., 1998), posibilitando así el análisis e identificación de tales productos comerciales. La especificidad de los cebadores se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa 2% (Figura 2).

La digestión in silico del amplicón generado con los primers OPS-COXI-1F y OPS-COXI-2R con la enzima de restricción Mbo I (I* GATC) origina patrones de restricción específicos de cada una de las 3 especies consideradas del Pacífico (Tabla 2). Para las 3 especies del presente trabajo hay fragmentos comunes 81 y 44 pb. Sin embargo, O. bulleri presenta un fragmento exclusivo de 93pb, mientras que O. meridastri, muestra dos fragmentos específicos de 31 y 22 pb (Figura 2).

Debe tenerse en cuenta la ausencia de datos para O. berlingoi, una especie endémica de Galápagos, que podría originar tanto patrones distintos como comunes con las especies incluidas en el presente análisis.



Figura 2. A y B Gels al 2% PCR con cebadores OPS-COXI. C y D Tabla y fragmentos de PCR-RFLP in silico con MboI

Cardisoma crinum (Cangrejo azul del manglar)

Basándonos en los alineamientos de 16S rRNA y COXI, se han evaluado las posiciones polimórficas presentes en cada juego de datos y se ha seleccionado el gen COXI como más apropiado para el diseño de un juego de cebadores dirigidos a la detección de ADN de Cardisoma. Dentro de la secuencia COXI se han diseñado in silico los cebadores CCR-COXI-1F (5'-GGAAATGGCTTCAGCTCCCT-3') y CCR-COXI-2R (5'-CCCTGCGATGGTGGTAAAC-3') que generan un fragmento de 167pb. La especificidad mostrada in silico, indica la limitación de estos cebadores para funcionar correctamente sólo en las especies más próximas de Cardisoma. La especificidad se ha testado por el tamaño mediante la amplificación y visualización en gel de agarosa 2% (Figura 4). El sistema diseñado no posee especificidad para la especie C. crinum, sin embargo debido a la distribución alopatrica de las especies de este género, ello no es un requerimiento ya que es la única especie del género con una distribución que abarca la costa este del Pacífico, el resto de especies cercanas se distribuyen exclusivamente en el Atlántico.

La especificidad de este fragmento para C. crinum se puede verificar in silico, además de por el tamaño, mediante PCR-RFLP mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BseGI (GGATG) que producirá dos fragmentos de 22pb y 145pb, confirmando así la naturaleza del fragmento obtenido (Figura 4). La disponibilidad de esta herramienta permitirá la detección de etapas larvarias de C. crinum en muestras zooplanctónicas que deberá ser evaluada en el marco de estudios biológicos-ecológicos sobre las poblaciones de esta especie presentes en la costa ecuatoriana y más exhaustivamente a lo largo de todo el rango geográfico de distribución de la misma.



Figura 3. A y B Gels al 2% PCR con cebadores CCR-COXI. C y D Tabla y fragmentos de PCR-RFLP in silico con BseGI

Agradecimientos
 Al Programa PROMETO SENSICO de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), CMA, laboratorio de biología y microbiología, y al Centro de Investigaciones Biológicas del Ecuador (CIBE) de la EPDQ (Escuela Politécnica de Ingeniería) de los Laboratorios, SIMOL de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria por el asesoramiento y análisis genético de las muestras.