

ANAIIS

EICTI 2017

6° Encontro de
Iniciação Científica

2° Encontro de Iniciação
ao Desenvolvimento
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (ADN BARCODING) DE LOS PECES DE LA CUENCA DEL RIO IGUAZÚ

CHANCHAY, Jerson Rogelio.

Estudiante del Curso de Ciencias Biológicas, bolsista (IC-UNILA) - ILACVN – UNILA;
E-mail: jerson.castro@aluno.unila.edu.br;

PEREIRA, Luiz Henrique

Docente/investigador del Curso de Ciencias Biológicas - ILACVN – UNILA.
E-mail: luiz.pereira@unila.edu.br.

1 INTRODUCCIÓN

La región Neotropical posee el mayor número de especies de peces de agua dulce descritas en el mundo (ALBERT; BART; REIS, 2011 p.89), aun así, estimativas actuales predicen una riqueza superior, siendo esta mayor a 7.000 especies (ALBERT; REIS, 2011 p.3). De esta gran riqueza, Brasil abriga 3.363 especies (FROESE; PAULY, 2016), número que aumenta por año, debido a nuevas descripciones. En general el desconocimiento de esta biodiversidad se debe a la presencia de especies crípticas, diversidad morfológica y los profundos cambios fenotipos durante el desenvolvimiento de los peces, lo que conlleva a dificultades al momento de discriminar especies utilizando apenas datos morfológicos (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011, p. 3).

En la actualidad, nuevas tecnologías y técnicas permiten de mejor manera identificar especies de manera rápida y eficaz. Una de las técnicas que se ha visto prometedora es el código de barras moleculares, denominado *DNA barcoding*. Dentro de este contexto, el objetivo general del proyecto fue obtener las secuencias *barcode* del gen *Citocromo oxidase I* (COI) de las especies de peces descritas para la cuenca del Rio Iguazú.

2 METODOLOGÍA

Se realizaron colectadas en nueve riachuelos pertenecientes a la cuenca del Rio Iguazú. Estas muestras se obtuvieron mediante la utilización de equipamientos de pesca eléctrica, redes de mano, y redes de arrastro. El resto de muestras se obtuvieron del Laboratorio de Biología y Genética de Peces (LBP), de la UNESP de Botucatu (Institución colaboradora en este proyecto). El ADN total fue extraído utilizando el kit *Wizard® Genomic DNA Purification*. La amplificación del gen COI se realizó en un volumen de 25 µl con 2,5 µl de *buffer* (10mM Tris-HCl+15mM MgCl₂),

2,5 µl dNTP (200 nM de cada), 1 µl de cada *primer* (5 mM), 0,1 µl *Platinum Taq DNA polimerase* (*Life Technologies*), 1,0 µl ADN molde (50 ng) y 17,4 µl ddH₂O. Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador con un paso inicial de 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 30s y 72°C por 1 min, seguidos por un paso final a 72°C por 5 min. Los productos de la reacción fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y después purificados utilizando la enzima ExoSap-IT® (*USB Corporation*). Los productos de la reacción purificados fueron utilizados en la reacción de secuenciamiento utilizando el kit *Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (*Applied Biosystems*). Posteriormente se purificó una vez más el producto mediante precipitación en EDTA/Acetato de sodio/etanol y se lo analizó en un secuenciador de ADN automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), disponible en la institución colaboradora (UNESP-Botucatu). Los *primers* utilizados para la amplificación del gen COI fueron: Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3', Fish F2 5'- TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3', Fish R1 5'- TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA -3' y Fish R2 5'- ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA -3', descritos por Ward et al. (2005). Las secuencias se editaron en el software *Geneious v.7.1.3*, para obtener los consensos y verificar la presencia de inserciones, deleciones y codones de parada. Para verificar la presencia de ADN exógeno, las secuencias fueron sometidas en el programa *BLAST* disponible en la página web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias fueron alineadas utilizando el algoritmo *MUSCLE* (EDGAR, 2004) disponible *online* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Las unidades taxonómicas fueron determinadas con el modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*), utilizando los softwares *Beast v2.4.3*, *Tracer*, *Figtree v.1.3.1*, y *R* con los paquetes *paran*, *ape*, *rnc1* y *splits*. El método por el cual se realizó el análisis de GMYC fue *Multi threshold*. Los valores de distancia genética intra e interespecífica fueron calculados utilizando el modelo de sustitución Kimura 2 Parámetros (K2P) (KIMURA, 1980), en el software *MEGA v.7.0.14* (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2016).

3 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La cuenca del Río Iguazú presenta un alto grado de endemismo debido al aislamiento geográfico por las cataratas del río Iguazú (BAUMGARTNER et al., 2012, p. 6), motivos por los cuales se torna importante desde el punto de vista de la conservación, ya que presenta especies únicas. Por otro lado los inventarios

ictiológicos de la cuenca aún son incompletos (CHANCHAY, 2016), siendo que trabajos más recientes describen la presencia de 106 especies, de las cuales 25 poseen identificación a nivel de género (BAUMGARTNER ET AL. 2012). De esta manera se resalta el desconocimiento y la importancia de describir estas especies.

Debido a los cambios fenotípicos que presentan los peces durante su desenvolvimiento y presencia de especies crípticas, que corresponden a especies morfológicamente similares, que difícilmente son diferenciadas con la utilización exclusiva de caracteres morfológicos, se hace difícil la discriminación de especies en este grupo (BECKER; HANNER; STEINKE, 2011, p. 3; BICKFORD et al., 2006, p. 149). Por estos motivos las herramientas moleculares se han visto prometedoras como medio alternativo para amenizar trabajos de taxonomía de manera eficaz. En este sentido se han propuesto metodologías, como el código de barras moleculares, el cual de manera estandarizada identifica especies utilizando la secuencia del gen mitocondrial *Citocromo oxidase I* (COI) (HEBERT et al., 2003). Esta metodología se basa en la utilización de nucleótidos exclusivos para cada especie (HEBERT et al., 2003). En la actualidad diversos trabajos han comprobado la eficiencia de esta metodología en la determinación de especies de peces (PEREIRA et al., 2011; APRIL et al., 2011; MELO et al., 2011; HANDFIELD; HANDFIELD, 2006; SMITH et al., 2006; YASSIN et al., 2008; WITT et al., 2006; BENINE et al., 2009). Recientemente se han incorporado estadísticas más robustas para utilizar el código de barras moleculares, los cuales generan límites en las especies, mostrando de esta manera unidades de evolución independiente (COSTA-SILVA et al., 2015). El método más utilizado para discriminar especies con datos de un único locus es el GMYC c El análisis de GMYC fue ideado por Barraclough T. G. (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013) y utilizado por primera vez por PONS et al. (2006). Esta metodología delimita especies, basándose en la evolución independiente, lo que quiere decir que las mutaciones surgen en las especies y no se propagan fácilmente en otras (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013). Esta metodo optimiza la delimitación de especies, ya que efectúa soluciones de máxima verosimilitud en un modelo que combina diversificación entre especies y diversificación genealógica dentro de ellas (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013).

4 RESULTADOS

Se colecto especímenes ictiológicos en nueve riachuelos pertenecientes a la cuenca hídrica del río Iguazú. De la institución colaboradora se obtuvieron 114 muestras de peces. De las muestras obtenidas se consiguió 80 extracciones exitosas

de ADN, siendo que de estas, apenas 45 secuencias fueron de buena calidad después de la etapa de secuenciamiento. Posterior al análisis en el BLAST, se terminó utilizando apenas 36 secuencias para los análisis posteriores. Las secuencias finales correspondieron a 20 especies, distribuidas en 16 géneros, 10 familias y cuatro órdenes. El análisis de GMYC mostro la presencia de 19 *clusters*, lo que corresponde al número de unidades evolutivas independientes. Las secuencias *barcode* identificaron correctamente 18 de las 20 especies analizadas (90%). La divergencia genética dentro de las especies fue del 0%, con excepción de las especies con identificación genérica como *Corydoras sp.* (2%) y *Crenicichla sp.* (10%). La divergencia genética entre las especies vario de 2% a 31%, con excepción de *Deuterodon sp.* y *Cheirodon interruptus* que fue de 0% y entre *Corydoras sp.*, *C. ehardti* y *C. paleatus*, la cual fue de 1%. La diferencia genética en los géneros con más de dos especies varió de 1% a 4% y entre géneros de 4% y 31%, excepto en *Deuterodon* y *Cheirodon* con 0%. La diferencia dentro de las familias fue de 1% a 17% y entre ellas de 18% a 28%.

5 CONCLUSIONES

La divergencia genética intraespecífica en *Corydoras sp.* y *Crenicichla sp.* se debió a que las muestras, en realidad representaban especies diferentes, lo cual fue determinado en los *clusters* del GMYC. Las especies *Deuterodon sp.* y *C. interruptus*, precisan ser reanalizadas, ya que posiblemente presentan un error en la identificación. Por otro lado, fue evidente observar el aumento de la diferencia genética a medida que se aumenta los niveles taxonómicos. De modo general la utilización de las secuencias *barcode* acoplado al análisis GMYC, se mostró eficiente en la discriminación de especies de peces del Río Iguazú. De este modo, al igual que otros trabajos, los resultados corroboran el potencial del análisis de GMYC utilizando secuencias *barcode*, para discriminar especies de peces (COSTA-SILVA et al., 2015; ALO et al., 2013).

6 PRINCIPALES REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313–21, 2003.
- WARD, R. D. et al. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, p. 1847–1857, 2005.
- COSTA-SILVA, G. J. et al. Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex neotropical hyperdiverse group. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2015.