

ADN barcoding de peces venenosos y tóxicos del manglar de Tumbes (Perú)

DNA barcoding of venomous and poisonous fish of the mangrove of Tumbes (Peru)

Alberto Ordinola-Zapata^{1,*} ; Zoila Raquel Siccha R.² ; Pedro S. Castillo -Carrillo³ ; Carlos Luque S.²

Resumen

Los peces venenosos y tóxicos forman parte de la riqueza en biodiversidad del Perú, sus venenos y toxinas contienen metabolitos que pueden emplearse para producir sustancias farmacológicas. La investigación tuvo como objetivo identificar, mediante ADN *barcoding*, las especies de peces venenosos y tóxicos en el manglar de Tumbes. Se recolectaron 46 ejemplares de estos peces que fueron identificados morfológicamente. Para el análisis de ADN *barcoding*, se obtuvo sus secuencias de un fragmento del gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), con las cuales se realizó su identificación en Blast y Bold. Se realizó el análisis filogenético mediante *Neighbor joining* (NJ), *automatic barcode gap discovery* (ABGD) y modelo generalizado mixto de Yule y coalescencia (GMYC), que confirmaron la asignación de especies. Mediante ADN *barcoding* se identificó las especies: *Daector dowi*, *Diodon holocanthus*, *Sphoeroides andersonianus*, *S. annulatus*, *S. kendalli*, *S. sechurae*, *Gymnura marmorata*, *Urotrygon asterias* y *U. peruanus*. En algunos ejemplares la identificación mediante ADN *barcoding*, caracteres morfológicos y análisis filogenético fueron disimiles como en los géneros *Sphoeroides* y *Urotrygon*, por lo que deberían realizarse más estudios para confirmar la presencia de complejos de especies altamente emparentadas en ellos.

Palabras clave: Peces venenosos y tóxicos; biodiversidad; análisis filogenético; manglar.

Abstract

Venomous and poisonous fish are part of Peru's biodiversity richness, its venoms and toxins contain metabolites that can be used to produce pharmacological substances. The research aimed to identify, through DNA barcoding, species of venomous and poisonous fish in the mangrove of Tumbes. 46 specimens of these fish were collected, these were morphologically identified. For DNA barcoding analysis, its sequences were obtained from a fragment of the subunit I gene of cytochrome oxidase (COI), with which its identification was made in Blast and Bold. Phylogenetic analysis was performed using Neighbor joining (NJ), automatic barcode gap discovery (ABGD) and generalized mixed Yule and coalescence model (GMYC), which confirmed species assignment. By DNA barcoding, species were identified: *Daector dowi*, *Diodon holocanthus*, *Sphoeroides andersonianus*, *S. annulatus*, *S. kendalli*, *S. sechurae*, *Gymnura marmorata*, *Urotrygon asterias* and *U. peruanus*. in some specimens the identification by barcoding DNA, morphological characters and phylogenetic analysis were dissimilar as in the genera *Sphoeroides* and *Urotrygon*, so more studies should be performed to confirm the presence of complexes of highly related species in them.

Keywords: venomous and Poisonous fish; biodiversity; phylogenetic analysis; mangrove swamp.


¹ Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, Calle Los Ceibos S/N, Puerto Pizarro, Tumbes, Perú.


² Laboratorio Costero Tumbes del Instituto del Mar del Perú, Calle José Olaya S/N, Nueva Esperanza, Tumbes, Perú.

³ Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, La Cruz, Tumbes, Perú.

* Autor correspondiente: aordinolaz@untumbes.edu.pe (A. Ordinola-Zapata).

A. Ordinola-Zapata  <https://orcid.org/0000-0002-9644-0531>

Z.R. Siccha R.  <https://orcid.org/0000-0002-5597-3948>

P.S. Castillo Carrillo  <https://orcid.org/0000-0002-0255-1047>

Recibido: 11-06-2019.

Aceptado: 28-08-2019.

Introducción

La amplia diversidad biológica existente en el Perú lo ha colocado en un honroso lugar entre los 10 países más megadiversos del mundo (**Shanee *et al.*, 2017**); como parte de dicha diversidad existe cierto número de animales que pueden producir daño al ser humano a través de la producción de toxinas, algunos de los cuales son peces que se hallan frecuentemente en ecosistemas de manglares, incluyendo el de Tumbes (Luque, 2008). La producción de venenos es una estrategia adaptativa que utilizan algunos animales para competir por los recursos, estos pueden clasificarse como venenosos o tóxicos, siendo los primeros, aquellos que producen toxinas y cuentan con estructuras especializadas para inocularlas tal como espinas, colmillos o púas, mientras que los segundos pueden producir toxinas o adquirirlas a través de su alimentación, sin embargo no cuentan estructuras especializadas para inocularlas pero al almacenar las mismas en su cuerpo son capaces de envenenar al organismo que los devoren (**Saraiva *et al.*, 2017**).

En el mundo existen más de 220 mil animales venenosos o ponzoñosos, que representan alrededor del 15% de todas las especies animales registradas a la fecha, a pesar de esto, son pocas las especies que se han investigado a profundidad las propiedades de sus venenos (**Holford *et al.*, 2018**).

A pesar de su peligrosidad, los animales venenosos y ponzoñosos son recursos importantes que, a través del estudio de sus venenos (denominado venómica), pueden ayudar a mejorar la comprensión de procesos fisiológicos vitales, así como descubrir sustancias bioactivas de interés farmacéutico, tal como ya ha ocurrido con la exenatida, que es un péptido antidiabético sintético cuya estructura se basa en un componente del veneno del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) y la ziconotide, un analgésico obtenido del veneno del caracol cono (*Conus magus*) (**Dutertre, 2014; Ziegman y Alewood, 2015; Holford *et al.*, 2018; Pérez, 2018**).

En los ecosistemas de manglar americanos se ha registrado la presencia de peces venenosos y ponzoñosos tales como pez sapo brujo (*Daector dowi*), rayas venenosas (*Urotrygon* spp., *Urolophus* spp.), peces globo y erizos (*Sphoeroides* spp., *Diodon* sp.) (**Xavier *et al.*, 2012**); también de un pez venenoso e invasor, el pez león (*Pterois volitans*) (**Arbeláez y Acero, 2011; Pimiento *et al.*, 2015**).

En el manglar de Tumbes, hay presencia de peces venenosos y tóxicos de los géneros: *Daector*, *Diodon*, *Gymnura*, *Urolophus*, *Urotrygon* y *Sphoeroides* (**Luque, 2008**), sin embargo, su identificación se ha realizado por caracteres morfológicos, técnica limitada por factores como la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética adicionalmente a la existencia de especies crípticas que son morfológicamente muy similares entre sí (**Zhang y Hanner, 2011**). Para superar estas limitaciones, se puede utilizar identificación molecular mediante ADN *barcoding*, técnica que usa marcadores moleculares existentes en el genoma mitocondrial, siendo el más utilizado en peces y la mayoría de animales, un fragmento del gen que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) (**Ward *et al.*, 2005**).

Las secuencias genómicas obtenidas en el ADN *barcoding*, permiten construir árboles filogenéticos que a través de técnicas como las de *Neighbor-Joining* (NJ), *automatic barcode gap discovery* (ABGD) y *General Mixed Yule and Coalescent Model* (GMYC), permiten incluso predecir la existencia de especies crípticas o nuevas, permitiendo direccionar la investigación para descubrirlas, tal como ya ha ocurrido con el descubrimiento de especies crípticas dentro del género *Neotrygon* (**Borsa *et al.*, 2016**).

En la presente investigación se realizó la identificación de las especies de peces venenosos y tóxicos en el manglar de Tumbes utilizando la técnica de ADN *barcoding*, complementada con identificación morfológica y análisis filogenético

Material y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Laboratorio Costero del Instituto del Mar del Perú (La Cruz, Tumbes, Perú), entre junio de 2016 y agosto

de 2018. La población en estudio fue la de los peces del manglar de Tumbes, de la cual se obtuvo una muestra de 362 peces recolectados en 18 estaciones. Las muestras se

enviaron en baldes plásticos conteniendo hielo hasta el Laboratorio Costero Tumbes de Imarpe donde los ejemplares fueron identificados por taxónomos usando claves de identificación.

De cada ejemplar se obtuvo un fragmento de tejido del que se extrajo ADN para realizar la amplificación de un fragmento del gen COI, que fue realizada en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo 16,1 µl de agua ultrapura, 2,5 µl de desoxirribo-nucleótidos trifosfato (dNTPs, 8 mM), 2,5 µl de buffer 10X, 1,2 µl de cada *primer* (10 µM) y 0,5 µl de Taq polimerasa.

Los *primers* para la amplificación fueron los utilizados por **Ward *et al.* (2005)**:

Pareja 1:

Fish F1: 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTG
GCAC -3'

Fish R1: 5'- TAGACTTCT GGGTGGCCAAAGA
ATCA -3'

Pareja 2:

Fish F2: 5'- TCGACTAATCATAAAGATATC
GGCAC -3'

Fish R2: 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATC
AGAA -3'

Éstos permitieron obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 648 pb.

La reacción de cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador programado con desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación por 1 min a 50 - 65 °C y extensión por 2 min a 72 °C; posteriormente a dichos 35 ciclos, se dio un

paso de extensión final a 72 °C por 5 min. Los amplicones obtenidos fueron observados al migrar en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, posteriormente los amplicones fueron enviados a secuenciar por duplicado (cadenas *forward* y *reverse*) a una empresa especializada en el extranjero.

Las secuencias de ADN fueron ensambladas utilizando el programa Geneious 5.6 y alineadas en Mega 7. Las secuencias depuradas fueron buscadas en las bases de datos Blast y Bold a fin de poder identificar mediante ADN *barcode* a que especie correspondieron.

De los ejemplares identificados, se seleccionaron para el análisis posterior sólo las secuencias nucleotídicas de aquellos que fueron determinados como pertenecientes a especies venenosas o tóxicas.

Se calculó las distancias genéticas intra e interespecíficas de las secuencias de COI de los ejemplares seleccionados construyéndose un árbol *Neighbor joining* (NJ) con el modelo de sustitución de Kimura 2-parámetros (K2P) implementados en Mega 7. Por último se construyeron árboles filogenéticos mediante análisis de descubrimiento automático de brecha de barcode (ABDG) implementado en el website de ABGD (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>) (**Puillandre *et al.*, 2012**) y del modelo generalizado mixto de Yule y coalescencia (GMYC), ejecutado a través de los programas BEAST 2.5.2 y R 3.5.2.

Resultados y discusión

De los 362 ejemplares de peces identificados, 39 correspondieron a especies venenosas o tóxicas de los géneros *Daector*, *Diodon*, *Sphoeroides* y *Urotrygon*. En la **tabla 1** se muestra la identificación de cada ejemplar basada en sus características morfológicas, así como por ADN *barcode*.

Según sus características morfológicas se identificaron 7 especies, de cinco familias y tres órdenes; mientras que con la identificación mediante ADN *barcoding*, hubieron varias especies que no se encontraron en la base de datos de Bold y se etiquetaron como sin coincidencia, tales como *Daector dowi*, *Sphoeroides andersonianus*, así como un ejemplar de *S. kendalli*; por otra parte también hubo discrepancias respecto a la identificación de ciertas especies como en el

caso de *S. kendalli*, el cual fue identificado en Bold como *S. annulatus* así como *S. sechurae* y *S. trichocephalus* los cuales fueron identificados como *S. annulatus*, así como *U. asterias* y *U. peruanus* los cuales fueron identificados como *U. chilensis*.

Por otra parte, si bien la identificación mediante la base de datos de Blast, no produjo ningún caso sin coincidencia, hubo discrepancia en la identificación de especies de los géneros *Sphoeroides* y *Urotrygon* los cuales fueron identificados parcial o totalmente como especies distintas a las de su identificación morfológica.

Sin embargo, hubo una identificación coincidente en el caso de *D. holocanthus* y *G. marmorata*.

Tabla 1. Especies de peces identificadas morfológicamente y mediante ADN *barcoding*

Identificación morfológica	Identificación por ADN <i>barcoding</i> *		Número de ejemplares
	Bold	Blast	
Batrachoidiformes			
Batrachoididae			
<i>Daector dowi</i>	Sin coincidencia	<i>D. dowi</i>	5
Tetraodontiformes			
Diodontidae			
<i>Diodon holocanthus</i>	<i>D. holocanthus</i>	<i>D. holocanthus</i>	3
Tetraodontidae			
<i>Sphoeroides andersonianus</i>	Sin coincidencia	<i>S. trichocephalus</i> / <i>S. andersonianus</i> / <i>S. annulatus</i>	6
<i>S. annulatus</i>	<i>S. annulatus</i>	<i>S. annulatus</i> / <i>S. kendalli</i>	5
<i>S. kendalli</i>	<i>S. annulatus</i> /Sin coincidencia	<i>S. annulatus</i>	3
<i>S. sechurae</i>	<i>S. annulatus</i>	<i>S. annulatus</i> / <i>S. sechurae</i>	2
<i>S. trichocephalus</i>	<i>S. annulatus</i>	<i>S. annulatus</i>	1
Myliobatiformes			
Gymnuridae			
<i>Gymnura marmorata</i>	<i>Gymnura sp.</i>	<i>G. marmorata</i>	3
Urotrygonidae			
<i>Urotrygon asterias</i>	<i>U. chilensis</i>	<i>U. peruanus</i> / <i>U. chilensis</i> / <i>U. asterias</i>	4
<i>U. peruanus</i>	<i>U. chilensis</i>	<i>U. peruanus</i> / <i>U. chilensis</i> / <i>U. asterias</i>	7

* La identificación y cobertura de las secuencias buscadas fue en Blast de 100% y en Bold entre 99-100%.

El análisis filogenético de las secuencias nucleótidas del gen COI de los ejemplares de peces venenosos y tóxicos, mostró una coincidencia en las unidades taxonómicas operacionales (OTU) que representan a las especies *D. holocanthus*, *S. andersonianus*, *D. dowi*, *U. peruanus* y *G. marmorata*.

Para poder discriminar mejor las especies identificadas, se utilizó los datos del árbol generado en base al análisis GMYC conjuntamente con los de los métodos NJ y ABGD, tratando de consensuar los datos de tal manera que los ejemplares de la misma especie compartan clados (**Figura 1**), allí se aprecia que hubo una notable coincidencia entre los tres métodos para casi todos los OTU evaluados, sin embargo las especies que fueron identificadas morfológicamente como pertenecientes al género *Sphoeroides* tales como *S. sechurae*, *S. annulatus* y *S. kendalli* aparentemente pertenecerían a una sola especie (métodos NJ y GMYC) o hasta a dos especies (método ABGD); al respecto **Vella et al. (2017)** han reconocido que la familia Tetraodontidae requiere de mayores estudios taxonómicos pues las limitaciones taxonómicas actuales causan confusión en la

identificación y una posible clasificación incorrecta con inadecuada asignación a especies, por lo que recomiendan que los estudios para delimitar las especies dentro de este género deben basarse en datos de identificación morfológica aunada a datos genéticos los cuales al usarse en conjunto podrían delimitarlas adecuadamente, sin embargo en el caso de familias en los cuales la variación genética a nivel del gen COI es demasiado baja, recomiendan usar un marcador mitocondrial con mayor tasa de mutación que es la región de control (CR) para poder distinguir adecuadamente a las especies, en esta investigación los datos genéticos se basaron solo en un fragmento del gen COI lo que podría justificar el por qué los métodos NJ, ABGD y GMYC detectan una o máximo dos especies en donde en realidad se ha hallado tres especies.

Por otro lado, las especies que mediante identificación morfológica corresponderían al género *Urotrygon* (*U. asterias* y *U. peruanus*) según el análisis filogenético corresponderían a un único OTU, es decir serían una sola especie por lo que se les designó en dicho análisis como *U. peruanus*.

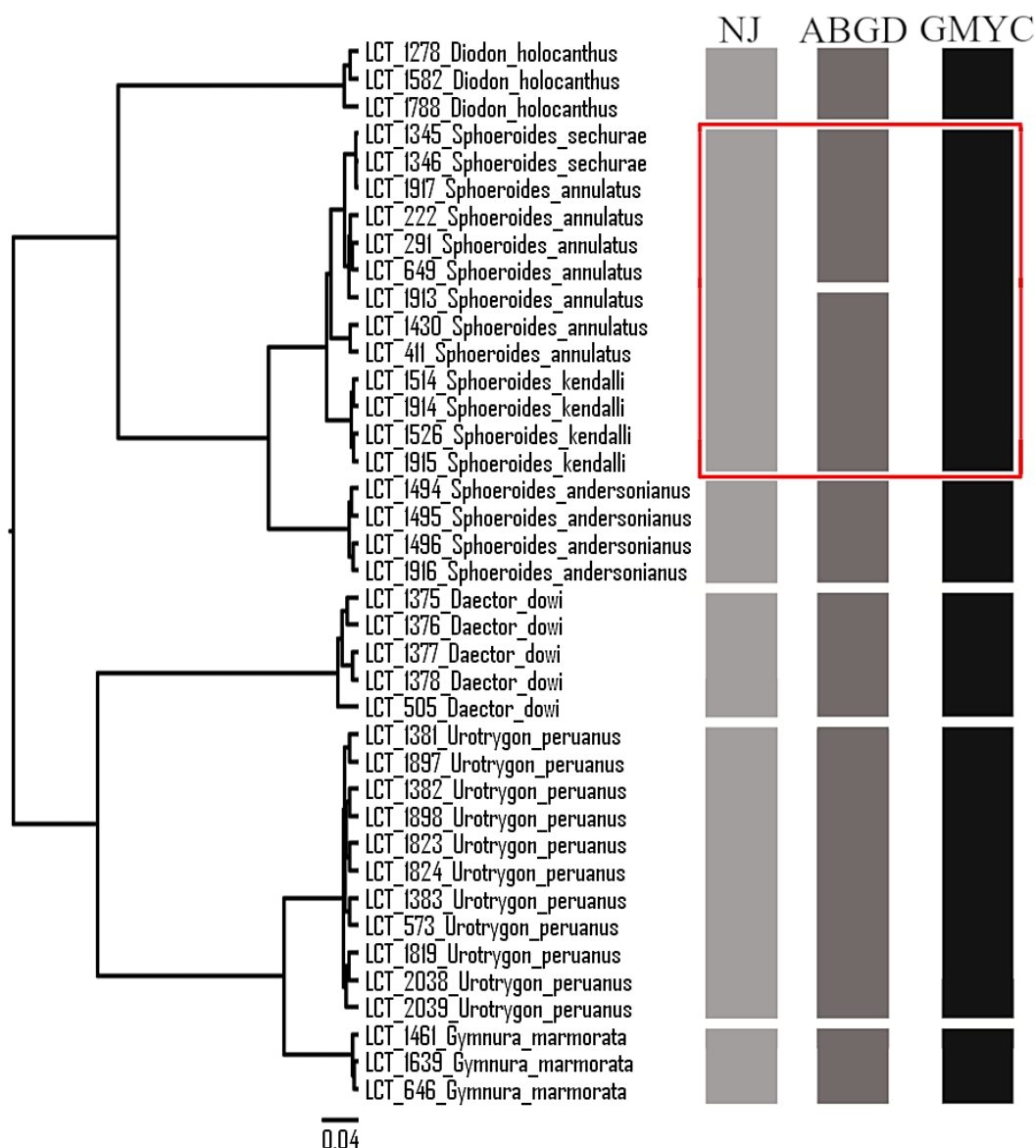


Figura 1. Árbol filogenético comparativo de los métodos NJ, ABGD y GMYC. En cada nodo se indica al final el número de grupo taxonómico de ABGD. Las barras al lado del árbol indica el reconocimiento de cada agrupamiento según el método utilizado. El rectángulo que rodean a alguna de estas barras resaltan las diferencias en agrupamiento obtenidas con los tres métodos.

No se ha hallado mayor información respecto al nivel de divergencia genética dentro de este género como para justificar la alta similitud entre las secuencias de dichos

ejemplares los cuales fueron identificados morfológicamente como correspondientes a dos especies: *U. peruanus* y *U. asterias*.

Conclusiones

Mediante ADN *barcoding* se logró confirmar la identificación a nivel de especie de peces venenosos y tóxicos del manglar tales como: *D. dowi*, *D. holocanthus*, *S. andersonianus*, *G. marmorata*, coincidiendo con la realizada a través de caracteres morfológicos; sin embargo, se identificó de manera discre-

pante con la identificación morfológica a *S. sechurae*, *S. annulatus* y *S. kendalli*, así como a *U. peruanus* y *U. asterias*. Asimismo, utilizando el análisis filogenético se obtuvo indicios de un complejo de especies muy emparentadas a nivel genético en el género *Sphoeroides*.

La investigación permitió determinar que la biodiversidad de peces venenosos y tóxicos del manglar de Tumbes requiere de estudios más profundos para poder discriminar adecuadamente entre aquellas especies en

las que hubo discrepancias en su identificación y en aquellas en las que el análisis filogenético mostró como complejos de especies con baja distancia genética.

Agradecimientos

Al Laboratorio Costero Tumbes del Instituto del Mar del Perú y a la Universidad Nacional de Tumbes, entidades que en asociación desarrollaron el Proyecto: “DNA barcode de las especies ícticas marinas, dulceacuícolas y del manglar de Tumbes”, financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica según contrato Fondecyt -

Imarpe -192-2015. Esta investigación se desarrolló como parte de la ejecución del citado proyecto. Al personal técnico y científico del Laboratorio Costero Tumbes del Instituto del Mar del Perú, en particular a la Mg. Mervin Guevara Torres y Blgo. Manuel Vera Mateo, quienes colaboraron de manera significativa en la ejecución de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Arbeláez, N.; Acero, A. 2011. Presencia del pez león *Pterois volitans* (Linnaeus) en el manglar de la bahía de Chengue, Caribe Colombiano. Bol. Invest. Mar. Cost. 40(2): 431-35.
- Borsa, P.; Shen, K.-N.; Arlyza, I. S.; Hoareau, T.B. 2016. Multiple cryptic species in the blue-spotted maskray (Myliobatoidei: Dasyatidae: Neotrygon spp.): An update. Comptes Rendus Biologies 339(9-10): 417-426.
- Dutertre, S. 2014. Venomics in medicinal chemistry. Future medicinal chemistry 6(15): 1609-1610.
- Holford, M.; Daly, M.; King, G. F.; Norton, R. S. 2018. Venoms to the Rescue. Science 361(6405): 842-44.
- Luque, C. 2008. Estudio de la diversidad hidrobiológica en Tumbes. Instituto del Mar del Perú. Tumbes, Perú. 36 pp.
- Pérez, Á.A. 2018. Análisis preliminar de los componentes proteicos del veneno del pez león *Pterois volitans* de la costa de Santa Marta y evaluación de su actividad biológica. Tesis de Magister en Ciencias Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia 146 pp.
- Pimiento, C.; Nifong, J.C.; Hunter, M.E.; Monaco, E.; Silliman, B.R. 2015. Habitat Use Patterns of the Invasive Red Lionfish *Pterois Volitans*: A Comparison between Mangrove and Reef Systems in San Salvador, Bahamas. Marine Ecology 36(1): 28-37.
- Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S.; Achaz, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation: Molecular Ecology 21(8): 1864-77.
- Saraiva, A.K.; Pereira, J.R.; Pereira, S.; Haddad, V.; Vendel, A.L. 2017. Potentially dangerous fish of the Paraíba Estuary: Identification and envenomation mechanisms. Journal of Coastal Life Medicine 5(11): 459-462
- Shanee, S.; Shanee, N.; Monteferri, B.; Allgas, N.; Alarcon, A.; Horwich, R.H. 2017. Protected Area Coverage of Threatened Vertebrates and Ecoregions in Peru: Comparison of Communal, Private and State Reserves. Journal of Environmental Management 202: 12-20.
- Vella, A.; Vella, N.; Karakulak, F.S.; Oray, I. 2017. DNA Barcoding of Tetraodontidae Species from the Mediterranean Sea: Filling Knowledge Gaps for Improved Taxonomic Accuracy. Genetics of Aquatic Organisms 1(2): 61-69.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360(1462): 1847-57.
- Xavier, J.; de Amorim, H.; Mendes, C.A.M.; Dantas, G.; de Farias, A.; Nunes, E.P.; Rosa, R.S.; Lucena, I. 2012. Fish assemblage of the Mamanguape Environmental Protection Area, NE Brazil: abundance, composition and microhabitat availability along the mangrove-reef gradient. Neotropical Ichthyology 10(1): 109-22.

A. Ordinola-Zpata *et al.*

Zhang, J.-B.; Hanner, R. 2011. DNA Barcoding Is a Useful Tool for the Identification of Marine Fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology* 39(1): 31-42.

Ziegman, R.; Alewood, P. 2015. Bioactive Components in Fish Venoms. *Toxins* 7(5): 1497-1531.