

Aplicación de código de barras de ADN para la identificación molecular de *Atrina maura* "Concha Pala" de los manglares de Tumbes, Perú

Application of barcode DNA for molecular identification of *Atrina maura* "Concha Pala" in the mangroves of Tumbes, Peru

Yovani Rosales M¹, Violeta Moreno Z²

Resumen

El código de barras de ADN es una técnica molecular que emplea secuencias cortas y estandarizadas de ADN, actualmente es ampliamente utilizada para la identificación de nuevas especies así como para resolver los grandes misterios de especies crípticas en grandes poblaciones en el mundo entero. *Atrina maura* "Concha Pala" es un molusco bivalvo cuya importancia económica ha motivado el desarrollo de tecnologías de reproducción con la finalidad de potencializar la industria acuícola sin tener que ejercer presión de pesca sobre los bancos naturales. *A. maura* se encuentra distribuida desde México hasta el Perú, en todo el mundo 13 especies correspondientes al género *Atrina* han sido identificadas basadas en el código de barras de ADN, en el estudio se aplicó el código de barras para la identificación de *A. maura* "concha pala", obteniendo como resultado una secuencia parcial del gen Citocromo Oxidasa I de 732 pb, así mismo se construyó un árbol filogenético teniendo en cuenta las secuencias de las 13 especies de *Atrina* disponibles en el Genbank y 2 especies de *Pinna* demostrando que *A. maura* presenta un 99% de parentesco con *A. rigida*, y que estas corresponden a un segundo clado de la familia Pinnidae. A través de este trabajo se reporta por primera vez el código de barras de ADN para esta importante especie acuática y reafirma la eficiencia de esta técnica para la evaluación de la biodiversidad de especies en el mundo.

Palabras claves: *Atrina maura*, "concha pala", código de barras de ADN, COI.

Abstract

The DNA barcode is a molecular technique that uses short DNA sequences and standardized, is currently widely used for the identification of new species as well as to solve the great mysteries of cryptic species in large populations in the world. *Atrina maura* "concha pala" is a bivalve mollusc whose economic importance has motivated the development of reproductive technologies in order to potentiate the aquaculture industry without exerting fishing pressure on natural banks. *A. maura* is distributed from Mexico to Peru, worldwide 13 species for the genus *Atrina* have been identified based on the barcode DNA, the study was applied barcode for identification of *A. maura* "concha pala", resulting in a partial sequence of the gene Cytochrome Oxidase I of 732 bp, also a phylogenetic tree given the sequences of the 13 species *Atrina* available in Genbank and 2 was constructed species *Pinna* showing that *A. maura* presented 99% of kinship with *A. rigida*, and that these correspond to a second clade of Pinnidae family. Through this work it is reported for the first time DNA barcode for this important aquatic species and reaffirms the efficiency of this technique for assessing biodiversity of species in the world

Keywords: *Atrina maura*, "concha pala", barcode DNA, COI.

1 Marinazul S.A. Tumbes, Perú. yrosales@marinazul.com; yovanir@hotmail.com

2 Domingo Rodas S.A. Tumbes, Perú.

Introducción

La diversidad acuática del mar peruano considera taxonómicamente una gran cantidad de organismos de los cuales se desconoce el grado de parentesco existente entre las diversas poblaciones como en cuanto a su distribución geográfica. El conocimiento taxonómico actual reconoce alrededor de 1,8 millones de especies entre los 10 a 15 millones de especies estimadas (May and Harvey, 2009). Esta cifra no es exacta ya que continuamente se están descubriendo y describiendo nuevas especies (Bisby et al., 2011). La falta de información sobre el número exacto de especies en el mundo se debe en parte a la falta de exploración en ciertas áreas del planeta, la escasez de estudios taxonómicos en algunos grupos biológicos, y a la dificultad que representa la identificación morfológica de algunos organismos (similitud morfológica que constituye la base de la taxonomía tradicional; Packer et al., 2009).

La biología molecular se ha convertido en una herramienta valiosa en la identificación de individuos y especies y ha sido ampliamente aplicada para el estudio de las relaciones filogenéticas de organismos, lo cual ha tenido implicaciones dramáticas para la taxonomía (Baker Cipriano and Palumbi, 1996; Teletchea et al., 2008). Una ventaja de la información genética es que puede ser obtenida a partir de un pequeño fragmento del organismo. Dentro de las metodologías que en biología molecular permiten aproximarse a la identificación de individuos y/o de especies, los códigos de barras de ADN son un método de identificación y reconocimiento de especies que utiliza una base de datos de secuencias de ADN estandarizadas (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004)

El uso de códigos de barras de ADN ha sido presentado como herramienta de identificación taxonómica de especímenes y como mecanismo para descubrir especies crípticas. Los códigos de barras de especímenes desconocidos que no concuerden con ninguna especie presente en la base de datos de referencia pueden sugerir que la base de datos está incompleta o que se trata de

una posible nueva especie. Por otro lado los códigos de barras pueden revelar divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa sugiriendo la existencia de especies crípticas.

La metodología de código de barras de ADN se propuso inicialmente para identificar animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), de aproximadamente 700 pares de bases (pb). La región COI presenta una alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b; Luo et al., 2011). En los últimos ocho años, numerosos estudios han mostrado que para varios grupos de aves, peces, mamíferos, lepidópteros y otros insectos este fragmento COI presenta una variación interespecífica suficientemente amplia, permitiendo buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004; Ward et al., 2005; Borisenko et al., 2008).

El molusco bivalvo *Atrina maura* (Sowerby, 1835) pertenece a la familia Pinnidae, comúnmente conocida en el Perú como "Concha Pala" o "Concha Lapa" y en otros países como "Callo de Hacha" en México; mundo 13 especies correspondientes al género *Atrina* han sido identificadas basadas en el código de barras de ADN. Esta especie ha tenido gran importancia a nivel local en el norte del Perú y actualmente es de gran importancia en la industria gastronómica a nivel mundial, el músculo abductor de estos organismo "callo", tiene gran aceptación en el mercado local, nacional e internacional, razón por la que se ha incrementado la presión de pesca que junto con reducción de áreas de manglar y las contaminaciones de los ecosistemas naturales están disminuyendo la existencia del recurso, al punto que casi desaparece de varias zonas de nuestro litoral.

Atrina maura se encuentra distribuida desde Baja California (Poutiers) hasta sur de

Perú (Keen); presenta su hábitat en zonas de manglares y bancos de lodo (como se citó en Camacho 2009); se caracteriza por poseer una concha triangular en forma de abanico, un poco aplanada y delgada. La misma que es de color crema, blancuzco o castaño, traslúcida. El borde posterior es ancho y con el margen truncado. Presenta

18 filas de espinas delgadas. La longitud valvar de un adulto es de 181 mm y el diámetro de 50 mm en promedio (Ahumada-Sempoal, Serrano-Guzmán y Ruiz-García 2002). Habita en grupos, se alimenta filtrando materia orgánica y su reproducción es sexual.

Material y Métodos

Recolección de muestras

Ejemplares de *Atrina maura* "Concha Pala" fueron recolectados de bancos naturales de la zona de manglar y albuferas estuarinas del departamento de Tumbes, Perú. Los ejemplares fueron trasladados al área de maduración de la unidad experimental de moluscos bivalvos de la empresa Langostinera Domingo Rodas S.A. (Tumbes) y colocados en tanques con agua de mar y aireación constante.

Amplificación y secuenciamiento por PCR

Los análisis moleculares de 10 ejemplares por cada banco natural identificado fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular e Investigación de la empresa Marinazul S.A.; se obtuvo 10 mg de tejido del musculo aductor y fue colocado en microtubos de 1,5 ml, y se les adiciono 300 µl de buffer de lisis (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH8, 0,1% SDS, 10 mM NaCl) y se incubo en hielo por 30 min invirtiendo los tubos ocasionalmente; posteriormente se adiciono 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) las muestras fueron incubadas a 60°C toda la noche; luego se adiciono 150µl de acetato de amonio a 7,5 M y se mezcló por inversión, luego fueron incubadas a -20 °C por 3 horas, y las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm por 20 min; el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Se adicionó 2 volúmenes de etanol absoluto frio; invirtiéndolos varias veces para que el ADN se precipite. Las muestras se Incubaron a -20 °C por 20 min, posteriormente fueron centrifugadas a 13 000 rpm por 20 min; a cada muestra se le retiro cuidadosamente el etanol evitando eliminar el pellet, asimismo se adiciono 600 µl de etanol al 70% para lavar por inversión. A continuación se cen

trifugaron a 13 000 rpm por 10 min, el etanol fue retirado dejando el pellet en el tubo, para luego ser centrifugado a 13 000 rpm por 5 min y secado frente al mechero. Se adiciono 70 µl de TE para resuspender el ADN. Extraído el ADN, fue almacenado a -20°C hasta el momento de uso.

Los iniciadores usados corresponden al gene Citocromo Oxidasa I de moluscos bivalvos, que se encuentran disponibles en la página web de *barcode of life systems* las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl compuesto de 25 µl Master Mix 2x (0.05 U/µl Taq ADN polimerasa, 2x Buffer PCR, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP) (Thermo Scientific), 21 µl de Agua ultra pura, 1 µl iniciador BivF (TGKTCWACWAATCA TAARGATATTGG) (20 pmoles), 1 µl iniciador BivR (CCCRA AHSCAGGYADAATHARAAW RTAMAC) (20 pmoles) y 1 µl de ADN genómico obtenido previamente. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems), bajo el siguiente programa de amplificación: una desnaturalización inicial de 94 °C por 1 min; 5 ciclos que comprendían fases de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 45 °C por 1 min 30 s y polimerización a 72 °C por 1 min, seguido por 45 ciclos que comprendían fases de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 54 °C por 1 min 30 s y polimerización a 72 °C por 1 min, y un ciclo final de 72°C por 5 min.

El tamaño y calidad de cada producto de amplificación obtenido fue analizado mediante técnica de electroforesis, en gel de agarosa al 2,0 % teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) empleando como tam-

pón TAE 1X; 15 µl de producto amplificado; fue mezclado con 2 µl de Azul de Bromofenol 5X, y depositado en los pocillos del gel. De acuerdo al tamaño de los amplicones esperados (550-800 pb), se empleó un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 40 min y los geles fueron visualizados con luz ultravioleta. Verificada la presencia de una sola banda de amplificación y el tamaño esperado del producto estos fueron enviados a secuenciar.

Los productos obtenidos del proceso de PCR fueron enviados a la empresa MacroGen USA, con la finalidad de establecer el orden y disposición de los nucleótidos (A, C, G y T) de cada producto amplificado, los cuales fueron secuenciados por ambos sentidos (Forward y Reverse) usando los primers BiF y BivR esto con el objeto de obtener la secuencia consenso del gen COI. Los resultados de los electroferogramas fueron editados y las secuencias forward y reverse ensambladas y recortadas para remover las secuencias de los primers usando el pro-

grama BioEdit v7.2.5 (Biological Sequence Alignment Editor, Ibis Biosciences).

Alineamiento de secuencias

Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con secuencias previamente publicadas en la base de datos de GenBank, usando la herramienta de Blast nucleotide estándar; todas las secuencias fueron alineadas usando el programa MEGA 5.02 teniendo en consideración un alto grado de confiabilidad. De acuerdo a la base de datos de GENBANK y *Barcode Life System* se determinó la clasificación taxonómica de las muestras analizadas, teniendo como referencia las secuencias disponibles de los géneros *Atrina rigida* (COI:KJ366389) *Atrina pectinata* (COI: AB076914), *Atrina vexillum* (JN944113), *Atrina chinensis* (JN944111), *Atrina chautardi* (KJ366467), *Atrina exusta* (KJ366479), *Atrina fragilis* (KJ366407), *Atrina assimilis* (KJ366470), *Atrina sp.* (KJ366372), *Atrina inflata* (KJ366322), *Atrina hystrix* (KJ366369), *Atrina cf. vexillum* (KJ366392), *Pinna bicolor* (JN182725), *Pinna nobilis* (DQ448218).

Resultados y Discusión

Localización de colección de muestras

La ubicación de bancos naturales de *Atrina maura* fue realizada por pescadores artesanales del litoral de Tumbes, pudiendo localizar seis zonas importantes entre Puerto Pizarro y Playa Hermosa en el distrito de Corrales, Tumbes (Tabla 1).

lizar seis zonas importantes entre Puerto Pizarro y Playa Hermosa en el distrito de Corrales, Tumbes (Tabla 1).

Tabla1. Localización de los bancos naturales de *Atrina maura*. Tumbes, Perú.

Distrito	Coordenadas geográficas		Nombre común
Pto. Pizarro	03° 32' 56.03" S	80° 31' 28.13" O	Playa hermosa Las garzas La ramada
	03° 33' 17.19" S	80° 31' 36.65" O	
	03° 30' 13.74" S	80° 24' 30.91" O	
Corrales	03° 30' 44.02" S	80° 25' 11.08" O	Poza rota Las garzas
	03° 33' 31.47" S	80° 31' 12.52" O	
	03° 30' 16.70" S	80° 24' 44.38" O	

Análisis filogenético

Productos de aproximadamente 850 pb (Figura 1) fueron obtenidos de las muestras de "concha pala" recolectadas de las zonas de manglar y albuferas marinas de Tumbes; el ensamblaje de secuencias permitió obtener productos de 876 y 871 pb, las que fueron comparadas con las secuen-

cias disponibles de COI de la familia pectinata disponible en la base de datos de GenBank.

En la Figura 1 se presenta la electroforesis en gel de agarosa para los amplicones obtenidos de los primers BivF/ BivR correspondiente a la secuencia parcial de COI de *Atrina maura*.

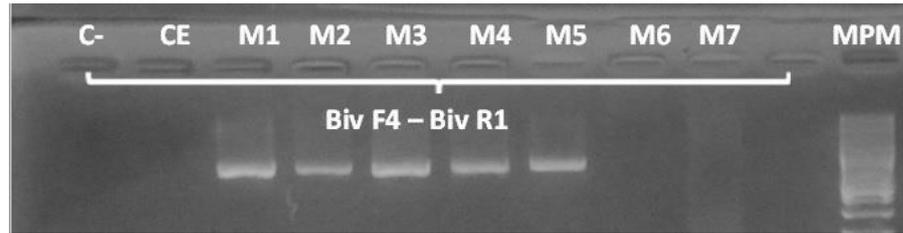


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2,0% de los productos amplificados por PCR de un fragmento de 850 pb del gen COI. de *Atrina maura*. C- : control de amplificación, CE: control de extracción, M1-M5 muestras de músculo aductor, M6 y M7 muestras de tejido de crustáceos, MPM: marcador de peso molecular.

Las secuencias comparada (Figura 2) con la base de datos de Genbank, permitió determinar que existe 91 % identidad de esta especie con respecto a sus pariente más cercano: *Atrina rigida* (KJ366389). De acuerdo a estos resultados las muestras fueron identificadas hasta nivel de genero, no pu

diendose identificar la especie debido a que aun no ha sido reportada en el banco de genes mundial, obteniendose un porcentaje de parentesco tan bajo, siendo esta la primera vez que se reporta la secuencia de COI de *Atrina maura*, "concha pala".

```

TTTGGTCTACTAATCATAAGGATATTGGTACACTTTATCTTTTATTGGGACTTTG
ATCTGGAATGGTGGGTACGGGTTTTAGTGTTATTATTCGAACTGAGTTGTGTGC
TCCAGGTGCGAGATATCTGGGTGATGGGCAGCTGTATAATAGAATTGTAACGG
CTCATGCTTTCATTATGATTTTTCTTTTTGTAATGCCAATAATAATTGGTGGATT
TGGAAACTGGTAAATTCCTATGATGATAGGGGTCCGGACATAGCGTTTTCTCG
TCTTAATAACTTAAGATTTTGGCTCTTGCCGCTCTCTTTATATTGTTTGTTTTGT
CTGCTTTTGTAGAAGGAGGTGCTGGGACTGGGTGAACGGTTTACCCTCCTCTTT
CGACATTCTGTATCATGGGATGTCTGTAGATTTAGCTATTTTTTCTCTTCACCT
TGCTGGGTTGGCTTCTATTTTTGGAGGAATTAATTTTATTGTTACGGCTCAGAAC
ATGCGACGAATGGAGAGTCATTTAATAGATTTATTTCTTGGGCCGTGTTAGTG
ACTGCTGTGCTGTTAGTAGTATCTTTGCCTGTATTAGCGGGAGGAATTAATG
CTTTTAAACAGATCGTCATTTTAAACACCAGGTTCTACTTTCTGGAGGTGGTGA
GATCCTGTTTTGTTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCCATCCGGAGGTGTACA
TTCTAATTCTACCTGCATTTCGGGA
    
```

Figura 2. Secuencia consenso de *Atrina maura* obtenida usando los iniciadores COI BivF/ BivR, producto de 732 pb

Alineamientos múltiples de secuencias usando secuencias registradas en Genbank para otras especies de *Atrina* y las obtenidas en este estudio hicieron posible la construcción de un árbol filogenético, que demuestra existe un acercamiento de 99% a nivel de secuencia con su pariente más cercano a *Atrina rigida* (Figura 3).

El árbol filogenético de los miembros del género *Atrina* muestra el grado parental de *Atrina maura* con respecto a sus ancestros

correspondientes, basados en la comparación de las secuencias del gen Citocromo Oxidasa I de moluscos. Este árbol filogenético afirma la clasificación taxonómica descrita por Camacho (2009), puesto que se nota claramente que la familia Pinnidae forma la raíz del género *Atrina*, y es partir de ella que se desarrollan dos clados, el primero posee muchas más especies con grados divergentes de parentesco y el segundo solo presenta como parientes más cercanos a *A. rigida* y *A. maura*.

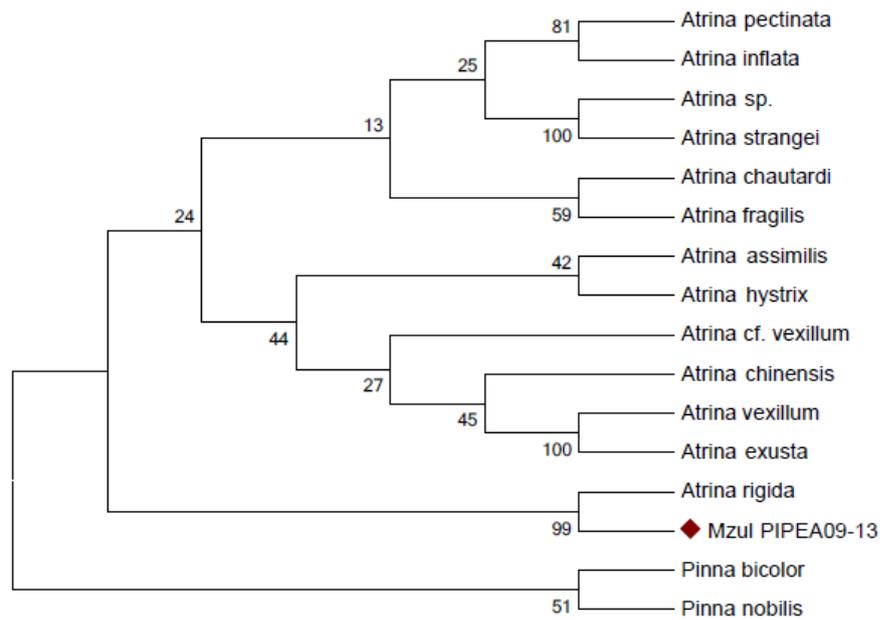


Figura 3. Árbol filogenético de los miembros del género *Atrina*, Basados en el marcador molecular COI.

Estos resultados demuestran que el gen COI es un excelente marcador para la determinación de grados parentales de especies aún no identificadas a nivel molecular y que además puede ayudar a la validación de la biodiversidad de recursos acuáticos.

Se pone en evidencia por primera vez la secuencia parcial del gen citocromo Oxidasa I de *Atrina maura*, mostrando un porcentaje de divergencia de 99% con su pariente *A. rigida*.

Conclusiones:

1. Las secuencias comparadas de secuencias disponibles COI de la familia Pectinata permitió identificar a "concha pala" hasta nivel de género *Atrina*. Se obtuvo secuencia consenso de *Atrina maura* obtenida usando los iniciadores COI BivF/BivR, producto de 732 pb.
2. Se construyó un árbol filogenético teniendo en cuenta las secuencias de las 13 especies de *Atrina* disponibles en el Genbank y 2 especies de *Pinna*, demostrando que *A. maura* presenta un 99% de parentesco con *A. rigida*
3. El análisis de la secuencia parcial del gen Citocromo Oxidasa sub unidad I (COI) es una herramienta muy confiable para la identificación de especies así como para la evaluación de los grados de parentescos entre especies existentes en el mundo.

Agradecimientos

La ejecución del presente trabajo fue cofinanciado por el programa nacional de innovación para la competitividad y productividad Innóvate- Perú, la empresa langostinera Domingo Rodas S.A, con la participación de la Universidad Nacional de Tumbes, El instituto del mar del Perú, Camposol S.A y Copeinca S.A. Un agradecimiento especial a la empresa Marinazul S.A por la disponibilidad de su laboratorio para la ejecución de los análisis moleculares.

Referencias.

- Ahumada-Sempoal, Miguel, Saúl Serrano-Guzmán y Noe Ruiz-García. 2002. "abundancia, estructura poblacional y crecimiento de *Atrina maura* (bivalvia: pinnidae) en una laguna costera tropical del pacífico mexicano". *Revista de biología tropical* 50(3-4): 1091-1100. San José de costa Rica.
- Baker, C.S., F. Cipriano and S.R. Palumbi. 1996. "Molecular genetic Identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan". *Mol ecol*; 5(5):671-685.
- Bisby, F.A., Y.R. Roskov, T.M. Orrell, D. Nicolson, L.E Paglinawan and N. Bailly, et al. 2011. *Species 2000 & Itis catalogue of life: 2011 annual checklist*, Accessed June 3, 2014. www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011/.
- Borisenko A.V., B.k. Lim, N. V. Ivanovanv, R. H. Hanner and P.D. Hebert. 2008. "DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname". *Mol ecol resour*; 8(3):471-479.
- Camacho Mariam. 2009. *Efecto de los fenómenos de "El Niño" y "La Niña" en la reproducción del hacha china Atrina maura (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) en la ensenada de La Paz, B.C.S., México*. Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional que a través del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR). México.
- May R.M. and P.H. Harvey. 2009. "Species uncertainties". *Science*; 323(5915):687-687.
- Hebert P.D., A. Cywinska, S. Ball, and Jr. deWaard. 2003a. "Barcode of life: identifying species with DNA barcoding biological identifications through DNA barcodes". *Proc biol sci*; 270: 313-321.
- Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball and Jr. de Waard. 2003b. "Biological identifications through DNA barcodes". *Proc biol sci*; 270 (1512):313-321.
- Hebert P.D., S. Ratnasingham and Jr. deWaard. 2003. "Barcoding animal life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 divergences among closely related species". *Proc biol sci*; 270 (sppl. 1):S96-S99.
- Hebert P.D., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak and C.M. Francis. 2004. "Identification of birds through DNA barcodes". *Plos biol*; 2(10): E312.
- Luo, A., A. Zhang, S. Ho, W. Xu, Y. Zhang, W. Shi et al. 2011. "Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals". *Bmc genomics*; 12(1):84.
- Packer, l., J. Gibbs, C. Sheffield, and R. Hanner. 2009. "DNA barcoding and the mediocrity of morphology". *Mol ecol resour*; 9: 42-50.
- Teletchea, F., J. Bernillon, M. Duffraisie, V. Laudet and C. Hänni. 2008. "Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples". *J Appl ecol*; 45(3):967-975.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last, and P.D. Hebert. 2005. "DNA barcoding Australia's fish species". *Philos trans r soc lond b biol sci*; 360(1462):1847-1857.

