

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN Y PCR MULTIPLEX  
DEL PEZ VELA (*Istiophorus platypterus*: Istiophoridae) EN COSTA RICA.**

Informe de Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Ingeniería en  
Biotecnología con grado académico de bachiller universitario

**Mary Cruz Álvarez Vega**

Cartago, Enero de 2012

**Identificación molecular mediante secuenciación y PCR Multiplex del pez vela  
(*Istiophorus platypterus*: Istiophoridae) en Costa Rica**

**Mary Cruz Álvarez Vega\***

**RESUMEN**

En Costa Rica se ha estipulado legislación que protege al pez vela (*I. platypterus*) al prohibir la pesca comercial y la exportación del mismo. A pesar de ello, se cree que en los últimos años se ha dado una exportación ilegal de esta especie, situación que no se ha logrado comprobar, debido a que la metodología convencional presenta limitaciones para la identificación del producto pesquero. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo la estandarización de dos metodologías alternativas que permitan una identificación más exacta de las especies de picudos de importancia económica en Costa Rica. La secuenciación del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo *c* oxidasa permitió la identificación de las muestras como *I. platypterus*, *Kajikia* sp., *M. nigricans*, *X. gladius* y *Thunnus* sp. Análisis filogenéticos demostraron que el gen COI no es apto para la identificación de algunas especies de picudos pues no logra diferenciar entre los peces aguja *T. angustirostris* y *T. pfluegeri* ni entre marlín rosado (*K. audax*) y marlín blanco (*K. albida*), sin embargo, esta distinción no es necesaria en el mercado costarricense. Así mismo, se estandarizó un PCR multiplex para la amplificación de fragmentos específicos de la región control del ADN mitocondrial, lo cual permitió la identificación de las especies o géneros de interés: *I. platypterus*, *Kajikia* spp., *X. gladius* y *Thunnus* sp. De esta manera, el presente estudio demuestra que los métodos moleculares pueden ser utilizados para la identificación fiable de los peces de pico.

**Palabras clave:** *Istiophorus platypterus*, COI, PCR multiplex, identificación molecular, ADN mitocondrial.

\*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2011.

**Molecular identification of sailfish (*Istiophorus platypterus*: Istiophoridae) by gene sequencing and multiplex PCR in Costa Rica**

**Mary Cruz Álvarez Vega\***

**ABSTRACT**

Costa Rican legislation has stipulated the protection of sailfish (*I. platypterus*) by prohibiting the commercial fishery and exportation of this species. However, it is suspected that in the last few years illegal exportation of sailfish has been occurring, fact that cannot be demonstrated due to the limitations of the conventional methods used for species identification once the product has been processed. This is why the objective was to standardize two alternative techniques that allow a specific identification of the economically important billfishes in Costa Rica. The analysis based on the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene sequences identified the samples as *I. platypterus*, *K. audax*, *M. nigricans*, *X. gladius* and *Thunnus* sp. Phylogenetic reconstruction demonstrated that COI gene does not differentiate unambiguously the species *T. angustirostris* and *T. pfluegeri* nor the species *K. audax* and *K. albida*, nevertheless this distinction is not important in Costa Rican market. Also, the multiplex PCR assay standardized to amplify specific fragments of the mitochondrial control region allowed the identification of the species: *I. platypterus*, *Kajikia* sp., *X. gladius* and *Thunnus* sp. This study reveals that genetic identification can be used as a reliable tool for the identification of billfishes.

**Key words:** *Istiophorus platypterus*, COI, multiplex PCR, genetic identification, mitochondrial DNA.

\*GRADUATION FINAL PROYECT REPORT, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2011.

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN Y PCR MULTIPLEX DEL PEZ  
VELA (*Istiophorus platypterus*: ISTIOPHORIDAE) EN COSTA RICA**

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para  
optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

**Miembros del Tribunal**



MSc. Olga Rivas Solano  
Profesora Asesora-ITCR



Ing. Juan Miguel Cordero Solórzano  
Asesor-Institución



MSc. Johnny Peraza Moraga  
Lector

## **DEDICATORIA**

*A Dios, quien siempre me acompaña  
A mis padres, por su apoyo incondicional  
en cada momento de mi vida.*

*Mary Cruz*

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada agradezco a Dios por acompañarme día a día, por llenar mi vida de bendiciones, por darme la oportunidad de disfrutar cada momento y darme la fortaleza necesaria para luchar contra cada obstáculo que se me ha presentado.

Agradezco a mis padres, a mi hermana Marianella y mi hermano José Ricardo, quienes han estado conmigo en los buenos y en los malos momentos y en quienes siempre he encontrado una palabra de aliento.

Al MSc. Bernal León Rodríguez por permitirme realizar mi trabajo de investigación en el SENASA. A todo el personal del Laboratorio de Seguridad quienes demostraron su apoyo, interés y cooperación durante mi permanencia en el mismo. En especial agradezco al Ing. Juan Miguel Cordero Solórzano por su valiosa guía, por todo el apoyo y consejos brindados, por su paciencia y todas las horas que invirtió guiándome en el laboratorio, que hicieron posible la culminación de este Trabajo de Graduación.

A la profesora MSc. Olga Rivas Solano y al profesor MSc. Jhonny Peraza Moraga por su valiosa guía, aportes y recomendaciones, así como por la confianza brindada durante la ejecución de este trabajo.

Finalmente, pero no menos importante, quisiera extenuar mi más grato agradecimiento a todos mis compañeros del TEC con quienes pasé momentos inolvidables, así como todas aquellas personas que de una u otra forma tuvieron la paciencia y la comprensión para acompañarme durante toda la carrera y en especial para que pudiese culminar esta meta.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ACREDITACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Historia filogenética de los peces picudos.....	4
2.2 Distribución Geográfica.....	8
2.3 Hábitat y nicho ecológico.....	8
2.4 Morfología de los picudos.....	9
2.5 Importancia económica de los picudos.....	10
2.6 Situación Actual.....	11
2.7 Problemática Actual de la pesca comercial de pez vela ( <i>I. platypterus</i> ).....	13
2.8 Identificación de especies de interés comercial.....	14
2.8.1 Identificación mediante Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	15
2.8.2 Identificación mediante PCR Multiplex.....	16
2.8.3 Identificación mediante Secuenciación.....	17
2.9 ADN mitocondrial (ADNmt).....	19
2.9.1 Gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI).....	20
2.9.2 La región control (D-loop).....	21
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo General.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23

CAPÍTULO 4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	24
4.2	EXTRACCIÓN DE ADN .....	25
4.3	SECUENCIACIÓN .....	26
4.3.1	Elección de imprimadores .....	26
4.3.2	Amplificación del gen de la citocromo c oxidasa .....	28
4.3.3	Purificación de bandas del gel .....	29
4.3.4	Reacción de secuenciación .....	29
4.3.5	Secuenciación y Análisis de secuencias .....	30
4.4	PCR MULTIPLEX .....	31
4.4.1	Evaluación de los iniciadores diseñados para el PCR Multiplex .....	32
4.4.2	Optimización de la reacción de PCR .....	33
4.4.3	PCR Multiplex .....	33
4.4.4	Evaluación de la especificidad de los iniciadores.....	34
CAPÍTULO 5.	RESULTADOS.....	36
5.1	EXTRACCIÓN DE ADN .....	36
5.2	SECUENCIACIÓN .....	37
5.2.1	Elección de imprimadores .....	37
5.2.2	Purificación de bandas .....	38
5.2.3	Secuenciación.....	39
5.3	PCR MULTIPLEX .....	42
5.3.1	Evaluación de los iniciadores diseñados para el PCR Multiplex.....	42
5.3.2	Optimización de la reacción de PCR .....	43
5.3.3	PCR Multiplex .....	44
5.3.4	Evaluación de la especificidad de los iniciadores.....	46
CAPÍTULO 6.	DISCUSIÓN.....	47
6.1	Secuenciación del gen COI y análisis de secuencias .....	48
6.2	PCR Multiplex .....	52
CAPÍTULO 7.	CONCLUSIONES.....	54
CAPÍTULO 8.	RECOMENDACIONES.....	55



BIBLIOGRAFÍA..... 56  
ANEXOS..... 62

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1 Muestras recolectas y su respectiva identificación.....	24
Cuadro 4.2 Pares de imprimadores universales utilizados para amplificar el gen COI en picudos .....	27
Cuadro 4.3 Muestras elegidas a partir de las extracciones con el kit DNeasy (Qiagen) y el kit de la marca Roche para ser amplificadas por PCR.....	27
Cuadro 4.4 Perfil térmico de PCR utilizado para la elección de imprimadores que amplifiquen la subunidad I del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa (COI) ..	27
Cuadro 4.5 Perfil térmico de PCR para la amplificación de la subunidad I del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa (COI).....	28
Cuadro 4.6 Perfil térmico para la reacción de secuenciación .....	30
Cuadro 4.7 Detalle de la secuencia y características de los imprimadores a utilizar en el PCR Multiplex.....	31
Cuadro 4.8 Perfil térmico de PCR utilizado en la evaluación individual de la especificidad de los iniciadores para amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial .....	32
Cuadro 4.9 Perfil térmico de PCR modificado para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial .....	33
Cuadro 5.1 Valores de concentración e indicadores de calidad de las muestras de ADN extraídas con el kit de Qiagen (Q) y el kit de Roche (R) .....	37
Cuadro 5.2 Valores de concentración e indicadores de calidad de las bandas de ADN purificadas con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).....	38
Cuadro 5.3 Resultado de la identificación de las muestras recolectadas con base en la comparación de las secuencias obtenidas de la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa (COI) contra secuencias de referencia de GenBank.....	40

Cuadro 5.4 Cuadro resumen de los resultados obtenidos en las pruebas para la optimización de la reacción para el PCR Multiplex..... 43

Cuadro 5.5 Perfil térmico del PCR Multiplex para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial ..... 44

Cuadro 5.6 Cuadro resumen del tamaño de la banda obtenida en el análisis por electroforesis en gel de agarosa para cada una de las muestras en el PCR Multiplex ..... 45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1 Evaluación de la extracción de ADN genómico, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v .....	36
Figura 5.2 Detección de la subunidad I del gen mitocondrial que codifica para la citocromo c oxidasa utilizando el par de iniciadores vf2_t1 y fishr2_t1.....	38
Figura 5.3 Árbol filogenético del vecino más cercano (NJ) de 99 secuencias del gen COI correspondientes a 12 especies, basado en el parámetro de distancia K2P. ....	41
Figura 5.4 Detección de la región control del ADN mitocondrial (D-loop) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v.....	42
Figura 5.5 Productos específicos de la región control del ADN mitocondrial de un PCR Multiplex.....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Bench Protocol: Animal Tissue (Spin-Colum Protocol) del kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen).....	62
Anexo 2. Protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de tejido animal y protocolo de lavado y elución del kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) .....	63
Anexo 3. Cuantificación de ADN .....	64
Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa .....	64
Anexo 5. Bench Protocol: QIAquick Gel Extraction Microcentrifuge Protocol (Qiagen)..	65
Anexo 6. Protocolo: Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems).....	66

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los picudos, también conocidos como peces de pico, abarcan el suborden Xiphoidei, compuesto por dos familias: Istiophoridae y la monotípica Xiphiidae. Dichas familias incluyen seis géneros: *Istiophorus*, *Makaira*, *Istiompax*, *Kajikia*, *Tetrapturus* y *Xiphias*, a partir de los cuales se diferencian cuatro tipos de peces: el pez vela, el pez espada, los marlines y los peces aguja (Collete *et al.*, 2006).

Todos estos peces son predadores activos, que se caracterizan por presentar un pico en forma de espada o lanza. Son especies dioicas, siendo el tamaño la única diferencia notoria entre ambos sexos, ya que generalmente la hembra es de mayor tamaño que el macho (Hanner *et al.*, 2011). Asimismo, son considerados de los peces más rápidos, altamente migratorios y capaces de realizar movimientos trans-oceánicos (Collette, 2010). Los picudos se distribuyen en aguas epipelágicas tanto tropicales como subtropicales, no obstante, aunque pueden tolerar amplios rangos de temperatura, siempre buscan aguas cálidas para el desove (Graves y McDowell, 2003).

Los peces de pico han desarrollado una gran importancia económica a nivel mundial, en primera instancia debido a su amplia distribución geográfica, han sido fácilmente utilizados en áreas pesqueras comerciales. Además, al ser especies de nado rápido, muchos países los han aprovechado para la pesca deportiva (McDowell y Graves, 2002).

Sin embargo, dicho papel a nivel económico ha provocado que en los últimos años se observe una disminución significativa de las poblaciones de picudos. La pesca comercial indiscriminada de la que han sido objeto se debe a que se encuentran fuertemente relacionadas con la pesca con palangre, que no es capaz de distinguir entre los peces blanco y los picudos (Galeana *et al.*, 2008), siendo el principal problema el tipo de anzuelos que se utilizan, pues diversos autores señalan que una vez que el espécimen se engancha al anzuelo es poco probable que sobreviva (Galeana *et al.*, 2008; Graves y McDowell, 2006).

En Costa Rica, el artículo 76 de la “Ley de Pesca y Acuicultura” declara al marlín azul conocido como marlín blanco, al marlín rosado, al pez vela y al marlín negro como especies de interés turístico-deportivo y en el Acuerdo No. A.J.D.I.P/476-2008 se establece que la pesca de explotación comercial especialmente dirigida a la captura del pez vela se encuentra prohibida.

Esta legislación ha sido de vital importancia, pues se ha demostrado que el impacto económico de la pesca turístico-deportiva ha sido mucho mayor al de la pesca comercial, ya que genera mayor cantidad de divisas al país (Soto *et al.*, 2010).

En los últimos años se ha venido presentando una disminución significativa en la abundancia relativa del pez vela en las aguas jurisdiccionales, como consecuencia del aumento de flotas con palangre que han favorecido la sobreexplotación de esta especie (Vega, 2008). Además, a pesar de existir legislación que prohíbe la pesca comercial de pez vela, se tiene la sospecha que se está exportando de forma ilegal encubierto como pez espada, marlín, atún, entre otros.

Ejemplo de ello, en mayo del 2011, inspectores del Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPECA) y del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), decomisaron 7.000 kilogramos de pez vela que iban a ser exportados a Perú, cuando en la declaración se había reportado el producto como marlín rosado (Delgado, 2011).

La exportación ilegal de pez vela no ha sido fácil de comprobar, ya que la identificación del producto pesquero se realiza con base en sus características morfológicas, de manera que una vez que el espécimen ha sido fileteado, procesado o congelado es casi imposible identificar una especie u otra (Bangma, 2006; Hsieh *et al.*, 2005).

Debido a esta situación se han desarrollado metodologías alternativas que permiten una identificación más exacta de las especies. Entre ellas las más utilizadas son las técnicas moleculares basadas en el ADN.

Las dos técnicas que han sido mayormente empleadas para la identificación de los picudos son el PCR-RFLP (del inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms”), por medio del cual se han identificado especies como *I. platypterus*, *X. gladius*, *M. nigricans*, *Istiompax indica*, *T. pfluegeri* y *T. angustirostris* (Hsieh *et al.*, 2007; McDowell y Graves, 2002), y la secuenciación, que ha permitido identificar casi todas las especies de peces de pico (Hanner *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2007; Hyde *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2010; Shivji *et al.*, 2006). No obstante, también se han realizado estudios para la identificación mediante la técnica de PCR-Multiplex (Hyde *et al.*, 2005).

En la mayoría de los casos las técnicas de identificación de especies analizan regiones del ADN mitocondrial (*cyt b*, ND4, 16S ARNr, COI) debido a las ventajas que presenta este sobre el ADN nuclear (Paine *et al.*, 2007).

El gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa es uno de los más utilizados, pues a pesar de ser un gen muy conservado se cree que tiene suficientes regiones polimórficas como para la identificación de especies (Herbert *et al.*, 2003). Sin embargo, en muchos casos se prefiere la región control del ADN mitocondrial, que presenta una tasa de mutación más elevada y variaciones interespecíficas mayores, permitiendo una mejor distinción entre especies (Rocha *et al.*, 2005).

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de secuenciación del gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) y un PCR Multiplex, para la identificación molecular del pez vela (*Istiophorus platypterus*) en Costa Rica.



## CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Historia filogenética de los peces picudos

Los picudos son peces que abarcan el orden de los perciformes, no obstante, a través de los años las relaciones filogenéticas, entre picudos y escómbridos, han generado grandes debates en la clasificación de estos en un suborden determinado. En 1984, Collette *et al.* realizaron estudios filogenéticos mediante análisis cladísticos de 40 características morfológicas y con base en ellos propusieron una hipótesis de las relaciones filogenéticas de los miembros del suborden Scombroidei. En este suborden incluyeron seis familias: Scombroidei, Trichiuridae, Gempylidae, así como, Istiophoridae y Xiphiidae que fueron consideradas parientes cercanos de la familia Scombridae.

Posteriormente, Johnson (1986) desarrolló una hipótesis alternativa basada en 49 caracteres morfológicos. Su propuesta llegó a diferir de aquella expuesta por Collette *et al.* (1984) principalmente en dos aspectos. Primeramente, este autor extendió los límites del suborden Scombroidei, ya que incluyó a la familia Sphyrnidae y ésta en conjunto con las familias Gempylidae y Scombridae, conformaron las tres grandes familias que integraban el suborden. Como segunda incongruencia, Johnson propuso que los picudos (Istiophorine y Xiphiini) eran miembros de la familia Scombridae.

Por su parte, otros científicos cuestionaron sus hipótesis, principalmente en cuanto a la relación filogenética existente entre los peces picudos y el resto de los miembros del suborden Scombroidei. Potthoff *et al.* (1986), analizaron el desarrollo de los huesos de los escómbridos y concluyeron que era requerida mayor investigación para comprender en su totalidad estos caracteres, pero con base en la información obtenida afirmaron que los picudos eran parientes lejanos de los escómbridos.

Así mismo, Carpenter *et al.* (1995) re-evaluaron las características morfológicas analizadas por Collette *et al.* (1984) y Johnson (1986) y luego de una evaluación de los datos y análisis cladísticos obtenidos por Johnson rediseñaron la clasificación que este autor había propuesto, de manera que, aún dentro del suborden Scombroidei clasificaron a los picudos dentro de una superfamilia denominada Xiphiodei compuesta por la familia Istiophoridae y Xiphiidae.

Ese mismo año, Finnerty y Block (1995) secuenciaron un fragmento del gen mitocondrial de la citocromo *b* y con base en análisis de las secuencias nucleotídicas y las secuencias de aminoácidos inferidas apoyaron los resultados obtenidos por Potthoff *et al.* (1986) al afirmar que los picudos (Istiophoridae y Xiphiidae) no eran escómbridos.

Estudios más recientes han incluido el análisis de genes más conservados que presentan mayor potencial para ser utilizados como marcadores moleculares en estudios de filogenia. Es así como estudios de genes nucleares y mitocondriales reafirmaron que los peces de pico no eran parientes cercanos de los escómbridos (Orrell *et al.*, 2006), además confirman que los picudos son lo suficientemente distintos, a nivel morfológico y genético, con respecto a los escómbridos para ser separados en un suborden específico denominado Xiphiodei (Collette *et al.*, 2006). Así mismo, los últimos estudios realizados concuerdan en que los picudos no tienen ningún parentesco con los miembros del suborden Scombroidei (Little *et al.*, 2010).

De esta manera, el suborden Xiphiodei se encuentra compuesto por dos familias: Istiophoridae y Xiphiidae. Inicialmente, con base en características morfológicas se establecieron cuatro géneros: *Istiophorus*, *Makaira*, *Tetrapturus*, géneros un tanto controversiales y *Xiphias* (Collette *et al.*, 2006; Fierstine, 2006; Nakamura, 1985).

El género *Istiophorus* se creía compuesto por dos especies que se habían diferenciado según su peso y según el tamaño de sus aletas caudales y pectorales. Así, se encontraba la especie *I. albicans* o pez vela del Atlántico, con un peso que no superaba los 60 kg, que a su vez se caracterizaba por presentar aletas caudales y pectorales largas y la

especie *I. platypterus* o pez vela de la región Indo-Pacífica, con pesos de hasta 100 kg, cuyas aletas eran relativamente cortas en comparación con las del Atlántico (Nakamura, 1985).

Análisis más recientes del ADN mitocondrial, usando RFLP, y de ADN nuclear, mediante microsatélites, han demostrado que existen ciertas diferencias entre el pez vela del Atlántico y el de la región Indo-Pacífica, sin embargo, la información obtenida no confirma la existencia de dos especies diferentes y por ende, actualmente el género *Istiophorus* se reconoce como de carácter monotípico, comprendido por la especie *I. platypterus* (Bangma, 2006; Graves y McDowell, 2003).

Dentro del género *Makaira* se encontraba *M. indica* o marlín negro y *M. nigricans* y *M. mazara*, conocidos comúnmente como marlín azul del Atlántico y marlín azul de la región Indo-Pacífica, que habían sido clasificados por Nakamura (1985) como especies distintas según el patrón de la línea lateral. No obstante, estudios del ADN mitocondrial y de ADN nuclear no han encontrado diferencias que apoyen la separación de ambas especies (Graves y McDowell, 2003) y por ende, hoy en día, se conoce al marlín azul como una sola especie, *M. nigricans*. A su vez análisis de parsimonia y bayesianos realizados por Collette *et al.* (2006), indicaron que el género *Makaira* no era monofilético, de esta manera *M. indica* fue clasificado dentro de un género distinto denominado *Istiompax*, con una sola especie *I. indica* (Collette *et al.*, 2006).

El género *Tetrapturus* comprendía seis especies, *T. albidus* y *T. audax* conocidos como marlín blanco y marlín rayado, respectivamente y cuatro peces aguja, *T. belone* o pez aguja del Mediterráneo, *T. pfluegeri* o pez aguja de trompa larga, *T. angustirostris* o pez aguja de trompa corta y *T. georgii* (Nakamura, 1985). A pesar de ello, estudios moleculares realizados por Collette *et al.* (2006) demostraron, mediante análisis de parsimonia y bayesianos, que el marlín blanco y el rayado se agrupan juntos pero su parentesco con los peces aguja no era tal como para clasificarlos dentro de un mismo género y por ende, en la actualidad el marlín blanco y el marlín rayado comprenden un nuevo género denominado *Kajikia*.

El género *Xiphias* no ha sido tan problemático como los antes mencionados pues aún hoy en día presenta la clasificación dada por Nakamura (1985) compuesto por una única especie, *X. gladius* que comprende a los peces espada (Collette *et al.*, 2006).

Por lo tanto, actualmente, la clasificación taxonómica de los peces de pico es la siguiente:

Orden: Perciformes

Suborden: Xiphioidei

Familia Istiophoridae

Género *Istiophorus*

*I. platypterus* (pez vela)

Género Makaira

*M. nigricans* (marlín azul)

Género Istiompax

*I. indica* (marlín negro)

Género Kajikia

*K. audax* (marlín rayado)

*K. albida* (marlín blanco)

Género Tetrapturus

*T. angustirostris* (pez aguja de trompa corta)

*T. pfluegeri* (pez aguja de trompa larga)

*T. belone* (pez aguja del mediterráneo)

*T. georgii*

Familia Xiphiidae

Género *Xiphias*

*X. gladius* (pez espada)

(Collette *et al.*, 2006; Integrated Taxonomic Information System, 2011).

Los nombres científicos y comunes antes mencionados han sido aquellos establecidos internacionalmente por la FAO, sin embargo, en Costa Rica los nombres locales de algunos marlines difieren de dicha clasificación. El marlín rayado (*K. audax*) es conocido como marlín rosado y el marlín azul (*M. nigricans*) es conocido como marlín blanco (Soto *et al.*, 2010).

## **2.2 Distribución Geográfica**

A nivel mundial, el pez vela (*I. platypterus*), el marlín azul (*M. nigricans*) y el pez espada (*X. gladius*), habitan al este e Indo-oeste del Océano Pacífico y al este y oeste del Océano Atlántico. Por su parte, el marlín negro (*I. indica*), marlín rayado (*K. audax*) y pez aguja de trompa corta (*T. angustirostris*) habitan en la región este e Indo-oeste del Océano Pacífico. Mientras que el marlín blanco (*K. albida*), el pez aguja de trompa larga (*T. pfluegeri*), el pez aguja *T. georgii* y el pez aguja *T. belone* habitan en el Océano Atlántico (ITIS, 2011).

En Costa Rica los picudos de importancia económica son el marlín azul conocido como marlín blanco, el marlín rosado, el pez vela y el pez espada (Ley de Pesca y Acuicultura, 2005) los cuales se encuentran en la región del Océano Pacífico Oriental (Soto *et al.*, 2010), siendo especies altamente migratorias (Orbesen *et al.*, 2008), a excepción del marlín rayado (McDowell y Graves, 2008).

## **2.3 Hábitat y nicho ecológico**

Los picudos son peces que se distribuyen tanto en aguas tropicales como subtropicales de los océanos (Graves y McDowell, 2003). Así mismo, se caracterizan por ser especies pelágicas (FishBase, 2011), siendo el ambiente pelágico aquel denominado mar abierto que se divide en zona nerítica y zona oceánica (Gubbay, 2006).

El ambiente pelágico da lugar a distintas zonas biológicas según la profundidad, encontrándose las zonas: epipelágica que se extiende desde los 0 a los 200 m, mesopelágica que va de los 200 a los 1000 m, batipelágica comprendida entre los 1000 y los 4000 m, abisopelágica que se extiende de los 4000 a los 6000 m y hadopelágica que va desde los 6000 m al fondo marino (Nahle, 2008).

Los picudos de la familia Istiophoridae suelen desplazarse en las regiones epipelágicas (Bangma, 2006; Graves y McDowell, 2003). Sin embargo, el comportamiento del pez espada ha demostrado ser distinto, ya que en general estos peces tienden a encontrarse a profundidades mayores de 200m, en la denominada zona mesopelágica, y suben a la superficie durante la noche o durante el día para conseguir alimento (Romeo *et al.*, 2008).

#### **2.4 Morfología de los picudos**

En su estado larval, según características anatómicas y patrones de coloración, es relativamente sencillo diferenciar entre larvas de peces de la familia Xiphiidae y larvas de picudos de la familia Istiophoridae, sin embargo, la diferenciación de las larvas en género o especie dentro de esta última familia es realmente compleja. Es por ello que en estos casos, preferiblemente, se recurre a la práctica de análisis bioquímicos y moleculares (Luthy *et al.*, 2005). A diferencia de este problema en la distinción según la morfología larval, en su estado adulto existen características anatómicas más diferenciadas entre especies que permiten clasificar el pez a simple vista, siempre y cuando este no haya sido procesado (Bangma, 2006; McDowell y Graves, 2002).

Morfológicamente los picudos adultos son fácilmente reconocidos, ya que presentan un pico o rostro muy característico, el cual se forma debido a que la mandíbula superior se extiende en mayor proporción con respecto a la mandíbula inferior. En el caso de los peces de la familia Xiphiidae, este pico se asemeja a la sección transversal de la hoja de una espada, a diferencia de los peces de la familia Istiophoridae cuyo rostro es más redondeado (Collette *et al.*, 2006; Goujon y Majkowski, 2011).

Además, cuentan con dos aletas dorsales, la primera de ellas posee como soporte espinas, mientras que la segunda está compuesta por rayos blandos. En el caso de los peces de la familia Istiophoridae las aletas dorsales se encuentran adyacentes, mientras que en los miembros de la familia Xiphiidae estas se encuentran separadas. Así mismo, todos los picudos presentan dos aletas pectorales, una aleta anal, una aleta caudal, ubicada en el final del pedúnculo caudal y un par de aletas pélvicas, ausentes únicamente en los peces espada (Goujon y Majkowski, 2011).

De igual manera, poseen las denominadas quillas caudales que proveen de estabilidad y soporte a la aleta caudal (Goujon y Majkowski, 2011). Los peces de pico de la familia Istiophoridae presentan un par de quillas caudales pequeñas en el centro del pedúnculo caudal, a diferencia de los peces de la familia Xiphiidae los cuales poseen una sola quilla larga (Collette *et al.*, 2006).

## **2.5 Importancia económica de los picudos**

Los peces de pico son especies de gran importancia económica a nivel mundial, gracias a su amplia distribución geográfica han sido fácilmente utilizados en diferentes países como recursos en áreas pesqueras comerciales, así como en actividades recreativas (Hyde *et al.*, 2005; McDowell y Graves, 2002).

Por ejemplo, en Centro América la industria de pesca deportiva de picudos representa una oportunidad importante para el desarrollo económico y social, la cual se enfoca principalmente en la pesca y liberación de las especies de interés, de manera que se pueda lograr un desarrollo sostenible de estos recursos (Ehrhardt y Fitchett, 2006).

Costa Rica es uno de los países que ha aprovechado en gran medida las ventajas económicas que ofrece la actividad de pesca deportiva de los picudos. El artículo 76 de la “Ley de Pesca y Acuicultura” declara al pez vela (*I. platypterus*), marlín azul (*M. nigricans*), marlín negro (*I. indica*) y marlín rayado (*K. audax*) como especies marinas de interés turístico-deportivo. Siendo el turismo la primera actividad generadora de divisas en el país (Soto *et al.*, 2010).

Un estudio realizado por el Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas, patrocinado por The Billfish Foundation (Soto *et al.*, 2010), determinó que en el 2008 el impacto de la pesca turístico-deportiva en la actividad económica del país fue mayor que el impacto debido a la pesca comercial de estas especies. En este sentido, la pesca deportiva generó 599.1 millones de dólares, siendo un 2.13% del PIB de dicho año, mientras que la pesca comercial generó 527.8 millones de dólares, con solo un 1.88% del PIB. En forma comparativa, se puede decir que en el 2008 la pesca turístico-deportiva generó aproximadamente 70 millones de dólares más que la pesca comercial de picudos.

No obstante, sin importar si es una u otra actividad el valor económico de los picudos es alto, pues genera diversos beneficios económicos como divisas, empleos, inversión, impuestos, entre otros.

La pesca turístico-deportiva de pez vela es una de las actividades de mayor difusión internacional (Soto *et al.*, 2010), por ello la existencia de esta especie en las aguas territoriales de Costa Rica es de vital importancia para la atracción de turistas.

## **2.6 Situación Actual**

Debido a los grandes beneficios económicos que se obtienen como consecuencia de las actividades comerciales de los picudos, en los últimos años, los peces de pico se han vuelto objeto de la pesca comercial indiscriminada de los gobiernos locales de cada país, lo que ha provocado una disminución significativa de las poblaciones de picudos en las costas centroamericanas (Ehrhardt y Fitchett, 2006).

Como se dijo anteriormente, la pesca deportiva de los peces de pico genera mayores ganancias que aquellas obtenidas por la pesca comercial, por lo que en Costa Rica el gobierno ha buscado promover la pesca turístico-deportiva, la cual además de generar más beneficios permite el desarrollo sostenible de estos recursos, ya que genera



ingresos por la pesca del espécimen pero al devolver el pez al mar evita la disminución de la población de este en las costas (Soto *et al.*, 2010).

Siendo el pez vela la especie de mayor importancia en la pesca deportiva y debido a la disminución sustancial de las capturas, en el año 2008 Costa Rica obtuvo uno de los principales logros mediante el pronunciamiento del Acuerdo No. A.J.D.I.P./476-2008 el cual dice en su artículo primero que “se prohíbe la pesca dirigida al pez vela, utilizando palangre de superficie adaptada para este fin y con carnada viva como arte de pesca, en todas las aguas marinas jurisdiccionales costarricenses, a la flota comercial no turística-deportiva (...)”.

Tal acuerdo ha sido de vital importancia, ya que la pesca comercial se caracteriza por su capacidad para desplazarse por zonas marinas epipelágicas y por encontrarse fuertemente relacionada con la pesca tipo palangre, también denominada “longline”. (Galeana *et al.*, 2008).

La pesca con palangre consiste en una línea madre con varios anzuelos unidos a ella por medio de líneas más delgadas. Se encuentra mayoritariamente dirigida hacia la captura de miembros de la familia Scombridae, como es el caso de los atunes (Paine *et al.*, 2007). Sin embargo, por sus características y por realizarse en ambientes epipelágicos, la pesca tipo palangre es multiespecífica (Eslava *et al.*, 2003), de manera que puede ocasionar la captura incidental de otras especies como el pez vela, marlín azul, marlín rayado y pez dorado (Galeana *et al.*, 2008). La mayor problemática de este tipo de pesca es, como señalan Graves y McDowell (2006), que dependiendo del tipo de anzuelo una vez que el pez queda enganchado puede ser poco probable que este sobreviva.

En Costa Rica, el problema de la explotación indiscriminada de los peces de pico ha incrementado debido a que en los últimos trece años se han incorporado en nuestro país gran número de flotas con palangre (artesanal, semi-industrial e industrial), las cuales han favorecido la sobreexplotación de picudos como el pez vela y diferentes especies de marlín (Vega, 2008).

Lo anterior, además de reducir los recursos disponibles, puede provocar una considerable disminución del interés de los clientes extranjeros por la pesca turístico-deportiva de Costa Rica, ya que son mayormente atraídos por cantidades abundantes de los especímenes en los litorales y en el mar, característica que puede verse afectada por la pesca desmedida (Soto *et al.*, 2010).

## **2.7 Problemática Actual de la pesca comercial de pez vela (*I. platypterus*)**

El problema existente se debe a que, a pesar de existir legislación que prohíbe la pesca comercial de pez vela, artículo primero del Acuerdo No. A.J.D.I.P./476-2008, y reglamentación en ese mismo acuerdo que prohíbe las exportaciones de esta especie al decretar en su artículo octavo que “en caso de producirse pesca incidental de pez vela en la actividad de pesca comercial no turística, sin que hubiere sido posible la devolución al mar del ejemplar aún vivo; se permitirá la comercialización del producto en estado fresco o congelado para consumo humano exclusivamente en el mercado nacional (...)”, se sospecha que, actualmente, algunas compañías están exportando de forma ilegal pez vela encubierto como pez espada, marlín, atún, entre otros, cuya exportación si es legal.

Esta situación no se ha podido controlar, ya que a pesar de que los picudos son fáciles de identificar, según las características morfológicas de las etapas adultas, estas pueden confundirse durante el procesamiento de la carne, lo que hace difícil y en algunas ocasiones casi imposible, la diferenciación entre una u otra especie (Bangma, 2006; McDowell y Graves, 2002), dándole a los exportadores la oportunidad de vender un producto bajo un nombre falso con el fin de ocultar capturas ilegales. Por ejemplo, el tratar los filetes de pescado con monóxido de carbono, una sustancia coadyuvante para estabilizar los colores de la carne, provoca que estos se tornen color rojo brillante lo cual se prestaría para confusión (Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2006).

Es por ello que el Estado costarricense ha decidido actuar oportunamente hacia la protección del pez vela, de manera que la pesca turístico-deportiva siga siendo una actividad sostenible que contribuya económicamente al país. Para que esto ocurra se requiere de una metodología práctica que permita la identificación de la carne que se exporta, sin tener que depender de identificaciones morfológicas que se vuelven inciertas luego del procesamiento de la misma o al ser fileteado el pescado.

## **2.8 Identificación de especies de interés comercial**

Tradicionalmente, la identificación de los especímenes que son obtenidos producto de la pesca comercial o turístico-deportiva se ha realizado según características morfológicas, como la forma y tamaño del cuerpo, patrones de coloración, tipo de aletas presentes, entre otros (Asensio, 2007).

Sin embargo, debido a la problemática para la identificación del producto pesquero, según su morfología, una vez que este ha sido procesado (Bangma, 2006; McDowell y Graves, 2002), se han desarrollado metodologías alternativas que permiten una identificación más precisa de las especies aún cuando estas han sufrido cambios físicos debidos al procesamiento de la carne.

Las primeras técnicas utilizadas para la identificación de productos alimenticios, entre ellos el pescado crudo, fueron análisis proteicos mediante técnicas electroforéticas, como el SDS-PAGE, cromatográficas como la cromatografía de capa fina (HPLC) o la técnica de isoelectroenfoque (Asensio, 2007; Hsieh *et al.*, 2005). No obstante, estas metodologías no fueron muy efectivas, ya que su presencia y características dependen del tipo de célula en la que se encuentren y además al morir el espécimen las proteínas llegan a perder su actividad biológica como consecuencia de cambios en sus estructuras, características básicas para este tipo de análisis (Teletchea, 2009).

Debido a los inconvenientes que presentan las técnicas de identificación basadas en proteínas, en los últimos años se han desarrollado técnicas de identificación por medio de métodos moleculares, con la ventaja que los ácidos nucleicos pueden obtenerse de una pequeña muestra del organismo, ya que se encuentran en casi todas las células de un individuo, y además proporciona mayor información genética que las proteínas (Teletchea *et al.*, 2005).

Las técnicas de PCR, la secuenciación, y más recientemente, la hibridación ADN-ADN o microarrays, son metodologías que se han utilizado para la identificación de especies (Asensio, 2007; Teletchea *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés “Polimerase Chain Reaction”), es la técnica más utilizada para la identificación de organismos, por ser una metodología simple, de gran especificidad y sensibilidad (Hsieh *et al.*, 2007) que permite la amplificación de un segmento de ADN específico (Terreros *et al.*, 2010).

### **2.8.1 Identificación mediante Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)**

La técnica de análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisims”) en combinación con la técnica de PCR ha sido la más utilizada para la identificación de especies de pescado fresco y de productos procesados (Wu *et al.*, 2008) y según detallan McDowell y Graves (2002) ha dado muy buenos resultados en la identificación y diferenciación de tejidos de peces adultos.

Esta técnica consiste en la amplificación de un fragmento deseado, mediante el uso de iniciadores específicos en una reacción de PCR. Posteriormente, dicho fragmento es digerido con enzimas de restricción (endonucleasas tipo II) las cuales reconocen secuencias pequeñas de ADN doble banda, usualmente de tres a cinco pares de bases, las cuales corresponden al sitio específico de corte, de manera que generan fragmentos

más pequeños de diferentes tamaños. Dichos fragmentos al ser analizados mediante electroforesis en gel de agarosa generan un patrón de bandas específico para cada especie como resultado de la variación genética entre cada una de ellas (Graves y McDowell, 2003; Hsieh y Hwang, 2004; Teletchea, 2009).

De esta manera, el PCR-RFLP es una metodología sencilla y más barata que otras técnicas utilizadas para la identificación de especies. No obstante, tiene la desventaja que puede originar resultados erróneos en casos donde ocurra una digestión incompleta. Así mismo, la presencia de variaciones intraespecíficas en el ADN de un individuo puede modificar el patrón de corte, agregando o eliminando sitios de reconocimiento (Asensio, 2007; Teletchea, 2009).

Esta técnica, se ha utilizado para la identificación de picudos a partir de muestras como pescado crudo, filetes congelados o cocinados mediante análisis de fragmentos de ADN nuclear, como el locus MN32-2 y ADN mitocondrial, como el locus ND4 y el gen de la citocromo b (*cyt b*). No obstante, en ciertos casos la diferenciación entre marlín rayado (*K. audax*) y marlín blanco (*K. albida*) no ha sido posible mediante esta técnica, ya que como algunos estudios señalan, ambas especies han demostrado poca divergencia genética (Hsieh *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2007; McDowell y Graves, 2002).

### **2.8.2 Identificación mediante PCR Multiplex**

La técnica de PCR múltiple o multiplex, a pesar de ser menos utilizada para la identificación de peces, se ha desarrollado como una metodología alternativa menos laboriosa, que reduce el tiempo de análisis y que a la vez permite una identificación más precisa (Hyde *et al.*, 2005).

Es un variante del PCR convencional, que consiste en el diseño de pares de iniciadores específicos para cada especie de interés y que a su vez puede incluir un par de cebadores no específicos, que actúen como un control interno y por ende sean capaces de amplificar un fragmento común entre cada una de las especies.

En un PCR multiplex es fundamental que todos los cebadores que se desean incluir en la reacción posean una temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) similar y además deben diseñarse de manera tal que generen productos de diferentes tamaños. De esta manera, el producto obtenido puede ser visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa y dependiendo del tamaño de la banda pueda ser identificada la muestra incógnita (Asensio, 2007; González *et al.*, 2004; Terreros *et al.*, 2010).

Por lo tanto, la posibilidad de tener en una misma reacción todos los iniciadores específicos para cada especie de interés, además de disminuir el tiempo requerido para el análisis, disminuye en gran medida los riesgos de contaminación, en comparación con las digestiones requeridas en la técnica de PCR-RFLP (Hyde *et al.*, 2005).

Mediante esta técnica se ha logrado, exitosamente, la identificación de algunas especies de peces de pico. Hyde *et al.* (2005) desarrollaron una metodología en la cual, a partir de muestras de larvas y huevos identificaron especies como el pez espada, marlín azul, marlín rayado, pez vela, marlín negro y el pez aguja *T. angustirostris*. Más recientemente, Simms *et al.* (2010) lograron identificar pez vela, marlín blanco y marlín azul, a partir de muestras de larvas, utilizando iniciadores específicos en un PCR Multiplex.

### **2.8.3 Identificación mediante Secuenciación**

La secuenciación en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica molecular más exacta para la identificación de especies y es a partir de la cual se obtiene la mayor cantidad de información acerca de un individuo, por lo que puede ser utilizada como una metodología base para la validación de otras técnicas moleculares utilizadas para la identificación de especies, así como para estudios filogenéticos o análisis poblacionales. Por ello es muy utilizada para la identificación de especies, a pesar de ser relativamente cara (Asensio, 2007; Bangma, 2006; Kawakami *et al.*, 2010; Teletchea, 2009).

Existen varios métodos de secuenciación, sin embargo, actualmente el más utilizado es la secuenciación por capilar que se basa en el principio del método de Sanger. En dicha técnica se utilizan análogos de los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) denominados didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que carecen del grupo –OH en el carbono 3' del azúcar desoxirribosa. Debido a que en la reacción de PCR el grupo –OH del extremo 3' es esencial para la formación del enlace fosfodiéster, cuando la ADN polimerasa incorpora uno de estos ddNTPs, se trunca la extensión y por ende se obtienen productos de diferentes longitudes (Sanger *et al.*, 1977). Dichos ddNTPs se marcan fluorescentemente, de manera que los productos son entonces analizados mediante una electroforesis por capilar, en la cual van desplazándose a través del campo eléctrico de forma proporcional a su tamaño y poco antes de llegar al electrodo positivo, un láser incide sobre ellos lo que promueve la emisión de fluorescencia. Las señales producidas, son entonces, tomadas por un detector y consecuentemente analizadas por un software que traduce la señal de fluorescencia en información digital (Magaña *et al.*, 2009).

De esta manera, el proceso para la secuenciación inicia con un PCR convencional, en el cual se utilizan iniciadores que se encuentren dirigidos a secuencias altamente conservadas, cuyo producto posea las suficientes variaciones para la identificación entre especies (Poggi *et al.*, 2009). Seguidamente, se realiza una segunda reacción de PCR en la cual se incluyen los ddNTPs que permiten la obtención de la secuencia respectiva (Magaña *et al.*, 2009).

En los últimos años el desarrollo de herramientas bioinformáticas ha representado una gran ventaja para esta técnica, ya que facilitan en gran medida los análisis que deben realizarse luego de la secuenciación. Dichos análisis consisten en la edición y ensamblaje de las secuencias, así como la comparación de estas contra secuencias de referencia, por medio de herramientas como el BLAST (del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”). Esto permite identificar las especies según la similitud entre los fragmentos obtenidos y los reportados.

Lo anterior sumado a las bases de datos de acceso público, como EMBL/DDBJ/GenBank favorecen el uso de la secuenciación como una metodología eficiente para la identificación de especies (Honma *et al.*, 2009; Kawakami *et al.*, 2010).

Mediante esta técnica se ha logrado exitosamente la secuenciación de genes de peces de la familia Istiophoridae. Uno de los más utilizados ha sido el gen del citocromo *b* del ADN mitocondrial, a partir del cual se han identificado especímenes de *X. gladius*, *M. nigricans*, *I. indica*, *I. platypterus*, *K. audax*, *T. angustirostris*, *T. georgii* y *T. pfluegeri* (Hsieh *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2007; Hyde *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2007; Shivji *et al.*, 2006). No obstante, también se han secuenciado otras regiones del genoma mitocondrial como la región control (D-loop), utilizada para la identificación y análisis poblacionales de especies como el marlín blanco y rayado (Graves y McDowell, 2006; McDowell y Graves, 2008). Así mismo, a partir de la secuenciación de los sitios hipervariables de la región control del ADN mitocondrial, se ha logrado la identificación de especies como el pez vela, marlín azul, blanco y rayado, además de la obtención de información de estructuras poblacionales e historia demográfica de las mismas (Bangma, 2006). También, se han identificado especies como *I. platypterus*, *X. gladius* y *T. angustirostris*, por medio de la secuenciación de una región mitocondrial que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (Kawakami *et al.*, 2010). Igualmente, se han logrado identificar cinco de las diez especies de picudos que existen, mediante secuenciación del gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (Hanner *et al.*, 2011).

## **2.9 ADN mitocondrial (ADNmt)**

Como se ha mencionado, en la mayoría de los casos las técnicas de identificación de especies analizan regiones del ADN mitocondrial (cyt *b*, ND4, 16S ARNr, COI, D-loop), situación que se debe a las ventajas que presenta este sobre el ADN nuclear para su uso en estudios genéticos (Paine *et al.*, 2007).



El genoma mitocondrial es circular, con un tamaño de aproximadamente 16000 pb, unas cinco veces más pequeño que el genoma nuclear, su composición es más simple, ya que es haploide y no posee intrones (Hsieh *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Teletchea *et al.*, 2005). Es de herencia materna y no sufre recombinación, razón por la cual tiende a ser más conservado a lo largo de distancias evolutivas, permitiendo un estudio más sencillo (Graves y McDowell, 2003; Hsieh *et al.*, 2007).

El uso de genes mitocondriales para la identificación de especies presenta grandes ventajas en el caso de muestras deterioradas por el paso de los años o por el procesamiento de las mismas. Tales situaciones provocan la degradación de los ácidos nucleicos, no obstante al presentarse un alto número de copias por célula, se facilita la amplificación de un fragmento dado por medio de una reacción de PCR (Paine *et al.*, 2007; Teletchea, 2009).

El ADN mitocondrial posee una tasa de mutación mayor que el ADN nuclear, lo que permite que en menos generaciones se observen variaciones entre secuencias de especies muy relacionadas, lo que permite la identificación de las mismas (Graves y McDowell, 2003; Lin *et al.*, 2005; Teletchea *et al.*, 2005).

### **2.9.1 Gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI)**

El gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa, es uno de los más conservados del genoma mitocondrial. Esta proteína es de gran importancia para los seres vivos, debido a que es crítica para la respiración celular y la consecuente producción de energía (Hsieh *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2007).

Presenta gran versatilidad, ya que posee tanto regiones conservadas como polimórficas. Por medio del estudio de las primeras ha sido posible la identificación entre grupos taxonómicos, mientras que las regiones polimórficas han permitido realizar identificaciones más específicas entre géneros y especies relacionados (Paine *et al.*, 2007).

Estudios han señalado que el gen que codifica para COI podría presentar las suficientes diferencias interespecíficas para la identificación de muchas especies. Los autores especifican que un fragmento de 658pb del gen COI puede funcionar como si fuese un “código de barras” (del inglés “DNA barcoding”) que permita identificar a los seres vivos tal y como se realiza con los productos de un supermercado (Herbert *et al.*, 2003).

Según varios estudios, dicho gen permite la identificación de diferentes especies de peces (Hubert *et al.*, 2008; Paine *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2005). Así mismo, se ha determinado que un fragmento del gen COI permite la identificación de cinco de las diez especies de picudos que existen, presentando problemas para diferenciar entre tres de los peces aguja (*T. angustirostris*, *T. belone* y *T. pfluegeri*) y entre marlín rayado y marlín blanco (*K. audax* y *K. albida*, respectivamente). Se cree que no es capaz de diferenciar estas especies debido a que es muy conservado y estas especies, evolutivamente hablando, se separaron hace muy poco tiempo por lo que no se han acumulado las suficientes mutaciones como para crear regiones variables (Hanner *et al.*, 2011).

### **2.9.2 La región control (D-loop)**

El genoma mitocondrial posee 37 genes codificantes, de los cuales dos de ellos son para ARN ribosomal, trece para proteínas y veintidós para ARN de transferencia. No obstante, también presenta una secuencia no codificante, denominada región control o D-loop (del inglés “Displacement-loop containing region”) compuesta por un bloque central conservado que se encuentra flanqueado por dos secciones hipervariables (Morris *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2005).

A pesar de que los genes mitocondriales presentan, ya de por sí, una tasa de mutación mayor que los nucleares, la región control posee una tasa de dos a cinco veces mayor, por lo que se ha utilizado ampliamente como marcador molecular en estudios genéticos y de relaciones intraespecíficas (Rocha *et al.*, 2005).

Como consecuencia de su alta variabilidad, muchos estudios de estructura poblacional de diversas especies de picudos se han realizado con base en este fragmento (Bangma, 2006; Graves y McDowell, 2006; McDowell y Graves, 2008). Presentándose en algunos casos problemas para la distinción entre marlín rayado (*K. audax*) y marlín blanco (*K. albida*), por la misma razón que el gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa no es capaz de distinguirlos (Graves y McDowell, 2003; Hanner *et al.*, 2011).

## CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

Estandarizar la técnica de secuenciación de la subunidad I del gen de la citocromo *c* oxidasa (COI) y de PCR Multiplex, para la identificación molecular del pez vela (*Istiophorus platypterus*) en Costa Rica.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) y el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) para la extracción de ADN de las muestras a analizar.
- Estandarizar la reacción de PCR para la amplificación del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) del ADN mitocondrial.
- Secuenciar los fragmentos amplificados por PCR del gen COI, para cada una de las muestras de referencia.
- Realizar un análisis filogenético del gen COI con base en las secuencias obtenidas y secuencias de referencia.
- Estandarizar una reacción de PCR Multiplex para la identificación de pez vela (*I. platypterus*), pez espada (*X. gladius*), atunes (*Thunnus* sp.) y en un mismo grupo marlín blanco y marlín rayado (*Kajikia* sp.)

## CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción de ácidos nucleicos, la estandarización del PCR para la amplificación de la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa (COI) y su secuenciación, así como la optimización del PCR Multiplex fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, Servicio Nacional de Salud Animal, MAG.

### 4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectó un total de diez muestras de tejido muscular, de las cuales tres muestras fueron identificadas morfológicamente como pez vela (*I. platypterus*), dos muestras como marlín rayado conocido en Costa Rica como marlín rosado (*K. audax*), una muestra de tejido de un marlín de especie desconocida, dos muestras de pez espada (*X. gladius*), una muestra de tejido muscular de atún de especie desconocida (*Thunnus* sp.) y una muestra incógnita. La identificación de cada una de las muestras se presenta en el cuadro 4.1:

**Cuadro 4.1** Muestras recolectas y su respectiva identificación.

<b>Muestra</b>	<b>Etiqueta</b>
Pez vela 1	PV1
Pez vela 2	PV2
Pez vela 3	PV3
Marlín rosado 1	MROS
Marlín rosado 2	MRay
Marlín especie desconocida	MX
Pez espada 1	PE1
Pez espada 2	PE2
Atún de especie desconocida	AAA
Muestra incógnita	PX

La toma de dichas muestras fue realizada en coordinación con el personal de INCOPECA, mediante muestreos en plantas de procesamiento de empresas exportadoras. Una vez recolectadas fueron transportadas al laboratorio del SENASA donde se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2 EXTRACCIÓN DE ADN**

Para la extracción del ADN genómico se evaluaron dos kits el DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) y High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), en ambos casos la extracción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido animal (Anexo 1 y 2). Todas las muestras extraídas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, se realizó la cuantificación de las muestras extraídas utilizando un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) basado en la absorbancia de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260nm, siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 3. A partir de las lecturas realizadas se obtuvieron datos de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), relación de absorbancia 260/280 y absorbancia 260/230. Estos últimos dos parámetros fueron utilizados como indicadores de calidad para valorar la pureza del ADN extraído.

Así mismo, para la valoración de las extracciones se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v. La electroforesis se realizó por un período de 45 minutos con un voltaje constante de 125 voltios. Finalizada la corrida, los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo 4.1).

### 4.3 SECUENCIACIÓN

#### 4.3.1 Elección de imprimadores

Para la amplificación de la citocromo *c* oxidasa (COI) se utilizaron cuatro iniciadores universales empleados en un coctel diseñado por Ivanova *et al.* (2007), con la diferencia que en la presente investigación se trabajaron como parejas de iniciadores. Las cuatro combinaciones de los iniciadores se presentan en el cuadro 4.2.

En este análisis no se trabajó con todas las muestras sino que, con base en las fotografías de los geles para la valoración de las extracciones, se eligieron cuatro muestras de la extracción de Qiagen y cuatro de la extracción con el kit de Roche, correspondientes a aquellas muestras cuya banda en el gel se vio más fuerte. En el cuadro 4.3 se presentan las muestras con las cuales se trabajó.

La mezcla de reacción utilizada fue de un volumen total de 12.5  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 3.875  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 6.25  $\mu\text{L}$  de DreamTaq Master Mix (2X) (Fermentas), 0.1875  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (20  $\mu\text{M}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  de la muestra. Una vez preparadas las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) para llevar a cabo la amplificación. El programa o perfil térmico utilizado para el PCR se muestra en el cuadro 4.4.

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v. La corrida se realizó por 45 minutos con un voltaje constante de 125 V. Una vez finalizada la corrida, los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo 4.1).

**Cuadro 4.2** Pares de imprimadores universales utilizados para amplificar el gen COI en picudos.

Bloque	Nombre del iniciador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto de PCR (pb)
1	vf2_t1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	704
	fr1d_t1	ACC TCA GGG TGT CCG AAR AAY CAR AA	
2	fishf2_t1	TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC	704
	fishr2_t1	ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA	
3	vf2_t1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	704
	fishr2_t1	ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA	
4	fishf2_t1	TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC	704
	fr1d_t1	ACC TCA GGG TGT CCG AAR AAY CAR AA	

Fuente: Ivanova *et al.* (2007)

**Cuadro 4.3** Muestras elegidas a partir de las extracciones con el kit DNeasy (Qiagen) y el kit de la marca Roche para ser amplificadas por PCR.

Kit de Extracción	Muestras
DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)	PV3, MRay, PE2, AAA
High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)	PV1, MRos, PE1, AAA

**Cuadro 4.4** Perfil térmico de PCR utilizado para la elección de imprimadores que amplifiquen la subunidad I del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa (COI).

Programa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	5min	1
2 (1)	Desnaturalización	95	1min	35
2 (2)	Apareamiento	55	1min	
2 (3)	Extensión	72	1min	
3	Extensión final	72	5min	1
4	Almacenamiento	4	∞	1



### 4.3.2 Amplificación del gen de la citocromo c oxidasa

Para la amplificación de la subunidad I de la citocromo c oxidasa se trabajó con el par de imprimadores universales vf2\_t1 y fishr2\_t1. Las diez muestras control extraídas con el kit de la marca Roche fueron amplificadas por triplicado, con el fin de obtener la mayor cantidad de ADN posible.

Para el PCR se preparó una mezcla de reacción con un volumen total de 12.5  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 3.625  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 6.25  $\mu\text{L}$  de Dream Taq Master Mix (2X) (Fermentas), 0.312  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (20  $\mu\text{M}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  de la muestra. Una vez preparadas las mezclas de reacción estas fueron colocadas en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) para llevar a cabo la reacción. El programa de PCR utilizado se detalla en el cuadro 4.5.

Para el análisis de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % m/v, la cual se corrió por 45 minutos con un voltaje constante de 125 voltios (Anexo 4.2).

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se cortaron las tres bandas por muestra, las cuales fueron colocadas en un mismo tubo eppendorf de 1.5 ml para su purificación.

**Cuadro 4.5** Perfil térmico de PCR para la amplificación de la subunidad I del gen mitocondrial de la citocromo c oxidasa (COI).

Programa	Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	4min	1
2 (1)	Desnaturalización	95	45s	35
2 (2)	Apareamiento	58	10s	
2 (3)	Extensión	72	35s	
3	Extensión final	72	5min	1
4	Almacenamiento	4	$\infty$	1

### **4.3.3 Purificación de bandas del gel**

Las bandas de ADN en el gel de las diez muestras control fueron purificadas utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las especificaciones del protocolo de extracción con microcentrífuga (Anexo 5).

Una vez realizada la purificación todas las muestras fueron cuantificadas utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para ello se utilizó como blanco el buffer de elución del kit (buffer EB). Así mismo, para la lectura, se trabajó con un volumen de 1.5  $\mu\text{L}$  tanto del blanco como para cada muestra. Se obtuvieron datos de concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), relación de absorbancia 260/280 y 260/230.

### **4.3.4 Reacción de secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del fabricante. No obstante, se trabajó con una cantidad de 9.6 pmol de cada iniciador y con una cantidad de ADN entre los 200 y 250 ng, ya que en pruebas anteriores se determinó que dichos parámetros son los adecuados para la secuenciación de un fragmento de aproximadamente 700 pb.

Las mezclas de reacción se trabajaron con un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , de los cuales 4  $\mu\text{L}$  correspondían al Ready Reaction Premix (2.5X), 2  $\mu\text{L}$  al Big Dye Sequencing Buffer (5X), 3  $\mu\text{L}$  del iniciador (3.2  $\mu\text{M}$ ) y 11  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN. Todas las reacciones fueron colocadas en un termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) con el perfil térmico que se muestra en el cuadro 4.6.

**Cuadro 4.6** Perfil térmico para la reacción de secuenciación.

Programa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	96	1min	1
2 (1)	Desnaturalización	96	10s	25
2 (2)	Apareamiento	50	5s	
2 (3)	Extensión	60	4min	
3	Almacenamiento	4	∞	1

#### 4.3.5 Secuenciación y Análisis de secuencias

Las diez muestras fueron tratadas con el Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 6). La secuenciación final de las muestras se realizó en un analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems) con un capilar de 50 cm. De igual manera, para la corrida se trabajó con el software 3130 Data Collection v3 (Applied Biosystems), utilizando el modulo estándar de corrida para dicha longitud del capilar, probando dos tiempos de inyección, uno de 20 y otro de 5 segundos.

La lectura y edición de las curvas cromatográficas, tanto de la secuencia directa como la reversa, se realizó mediante el software Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems) y una vez editadas se ensamblaron utilizando el software SeqScape v2.6 (Applied Biosystems). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas, mediante la herramienta BLAST (del inglés “Basic Local Alignment Search Tool”), contra secuencias de referencia reportadas en las bases de datos de GenBank.

Además, mediante el programa MEGA 5 se construyó un árbol filogenético del vecino más cercano (del inglés “Neighbor-joining”) basado en el parámetro de distancia Kimura 2-parameter (K2P) para comparar gráficamente la similitud entre secuencias. Se tomaron 79 secuencias de referencia de 8 especies de picudos y 10 secuencias de referencia de 5 especies de atún que se encontraban disponibles en la base de datos de GenBank.

#### 4.4 PCR MULTIPLEX

Esta técnica fue utilizada para la identificación de pez vela (*I. platypterus*), pez espada (*X. gladius*), atunes (*Thunnus* sp.) y en un mismo grupo marlín rayado y marlín blanco (*Kajikia* sp.).

Para la identificación de cada especie o género se diseñó un cebador reverso o antisentido universal y cebadores sentido específicos, así como un imprimador sentido universal para picudos (Cuadro 4.7).

**Cuadro 4.7** Detalle de la secuencia y características de los imprimadores a utilizar en el PCR Multiplex.

Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Tm (°C)	Amplicón (pb)
Thun_R5	TTT ACA GGA GTG TTA ATG ATA TC	58.1	-
Thun-F	TAA ATC GTC TAA GCC ATA CCA AGT	62.9	545
Billf-F	CTT ATT GAT RGT CAR GGA CA	59.1	435
Billf-R	TTT TCA GGA GTG TTA GYR ATC TC	63.0	-
Kaji-F	ATT AAG GAG ACC AGG RCA TG	63.1	610
Xiph-F	AAC TGG TCC TTC CTC ACT C	67.2	355
lplat-F	GTG ATA GTG YGC ATG GAC TG	65.8	580

#### 4.4.1 Evaluación de los iniciadores diseñados para el PCR Multiplex

Debido a que los iniciadores fueron diseñados para el presente estudio, se probaron de forma individual con cada una de las diez muestras que fueron extraídas con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

En todos los casos se trabajó con una mezcla de reacción con un volumen total de 12.5  $\mu\text{L}$  la cual contenía: 6.25  $\mu\text{L}$  de DreamTaq Master Mix (2X) (Fermentas), 0.3125  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (20  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de muestra y 3.625  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Además, se utilizó el mismo programa de PCR en todos los casos (Cuadro 4.8).

Para el análisis de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v, con una duración de corrida de 45 minutos con un voltaje constante de 125 voltios (Anexo 4.1).

**Cuadro 4.8** Perfil térmico de PCR utilizado en la evaluación individual de la especificidad de los iniciadores para amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial.

Programa	Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	5min	1
2 (1)	Desnaturalización	95	1min	35
2 (2)	Apareamiento	55	1min	
2 (3)	Extensión	72	1min	
3	Extensión final	72	5min	1
4	Almacenamiento	4	$\infty$	1

#### 4.4.2 Optimización de la reacción de PCR

Para la optimización, se trabajó con un gradiente de temperaturas de alineamiento de 55 a 64 °C.

Además, se trabajó modificando el perfil térmico de PCR, en el cual se probaron dos tiempos de alineamiento, uno de 10 y otro de 15 segundos (Cuadro 4.9).

Para estas pruebas se utilizó la mezcla de reacción que se empleó en la sección “A”. El perfil térmico utilizado para la prueba con gradientes de temperatura de alineamiento se describe en el cuadro 4.8.

Todos los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % m/v, la cual se realizó por 45 minutos con un voltaje constante de 125 V (Anexo 4.2).

**Cuadro 4.9** Perfil térmico de PCR modificado para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial.

Programa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	4min	1
2 (1)	Desnaturalización	95	45s	35
2 (2)	Apareamiento	62	10/15s	
2 (3)	Extensión	72	35s	
3	Extensión final	72	5min	1
4	Almacenamiento	4	∞	1

#### 4.4.3 PCR Multiplex

Primeramente, se realizaron pruebas con todas las combinaciones posibles de parejas de iniciadores específicos, con el fin de determinar si existía alguna incompatibilidad entre ellos.

Posteriormente, para el PCR Multiplex se realizaron pruebas con diferentes combinaciones de las concentraciones de los cebadores, sin incluir en la reacción los iniciadores Thun-F y Thun\_R5, además se probaron diferentes perfiles térmicos. Una vez estandarizada la reacción con los iniciadores para picudos se realizaron pruebas incorporando los específicos de atún.

Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v, la cual se realizó por una hora con un voltaje constante de 125V (Anexo 4.2). Se utilizó el documentador de geles Essential V2 (UVITEC Cambridge) para la toma de la fotografía y el software essential 1D para el cálculo del peso de cada banda obtenida.

#### **4.4.4 Evaluación de la especificidad de los iniciadores**

Para evaluar la especificidad de los imprimadores que fueron diseñados para el PCR Multiplex se secuenciaron los fragmentos generados.

Todas las muestras extraídas con el kit de Roche, fueron amplificadas por triplicado. Con los iniciadores específicos para picudos se utilizó una mezcla de reacción con un volumen total de 12.5  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 3.625  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 6.25  $\mu\text{L}$  de Dream Taq Master Mix (2X) (Fermentas), 0.312  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (20  $\mu\text{M}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  de la muestra. Por su parte, para los cebadores específicos de atún, se trabajó con la misma mezcla de reacción con la diferencia que el imprimador Thun\_R5 se trabajó a 0.7  $\mu\text{M}$ . El perfil térmico de PCR con el cual se trabajó fue el mismo que se utilizó para la amplificación del gen COI (Cuadro 4.5).

Los productos de PCR, purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) (Anexo 5) y cuantificados con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), fueron utilizados para las reacciones de secuenciación utilizando el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las muestras fueron tratadas con el Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 6) y una vez purificados los fragmentos estos fueron secuenciados en un analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems).

Las secuencias de ADN fueron editadas con el software Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems) y ensambladas con el software SeqScape v2.6 (Applied Biosystems). Finalmente, las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas, mediante la herramienta BLAST, contra secuencias de referencia reportadas en las bases de datos de GenBank.

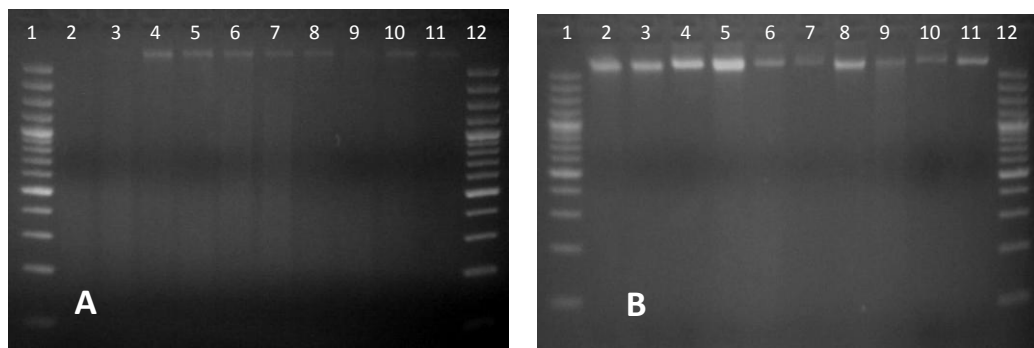


## CAPÍTULO 5. RESULTADOS

### 5.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Con el kit de la marca Roche se visualizó una banda definida de alto peso molecular para cada una de las muestras, mientras que con el kit de Qiagen no se obtuvo ninguna banda para las muestras PX y AAA. Así mismo, las bandas obtenidas para las muestras extraídas con el kit de Roche fueron más intensas en comparación con las bandas que se obtuvieron a partir de las muestras de la extracción con el kit de Qiagen, siendo las diferencias en la intensidad de fluorescencia correspondientes a la variabilidad en la concentración de ADN de cada muestra extraída (Figura 5.1).

Según los datos obtenidos mediante el análisis por espectrofotometría, la concentración promedio de ADN (ng/μL) de las muestras extraídas con el kit de Roche fue de 92.23 ng/μl y de 70.46 ng/μl para el kit DNeasy de Qiagen. Solo las muestras QPV2, QMRos y QMRay, presentaron concentraciones mayores a sus muestras análogas extraídas con el kit de Roche. Así mismo, en el cuadro 5.1 se observa que la concentración de ADN fue variable entre muestras.



**Figura 5.1** Evaluación de la extracción de ADN genómico, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. **A:** Extracción con el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), **B:** Extracción con el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). (1 y 12) Marcador molecular 100pb, (2) muestra PX, (3) muestra AAA, (4) muestra PE2, (5) muestra PE1, (6) muestra MX, (7) muestra MRay, (8) muestra MRos, (9) muestra PV3, (10) muestra PV2, (11) muestra PV1.

**Cuadro 5.1** Valores de concentración e indicadores de calidad de las muestras de ADN extraídas con el kit de Qiagen (Q) y el kit de Roche (R).

Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub> <sup>1</sup>	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>230</sub> <sup>2</sup>
QPV1	28.9	2.30	3.36
QPV2	57.2	1.92	2.20
QPV3	46.7	1.75	2.67
QMRos	111.3	1.82	1.95
QMRay	83.5	1.83	2.16
QMX	66.8	1.78	2.03
QPE1	56.1	1.87	3.21
QPE2	111.0	1.92	1.96
QAAA	115.6	1.82	1.40
QPX	27.5	2.73	5.51
RPV1	35.8	2.37	2.86
RPV2	51.9	1.97	1.79
RPV3	193.1	1.26	1.02
RMRos	96.1	1.38	1.07
RMRay	38.8	2.06	3.88
RMX	78.2	1.94	2.25
RPE1	75.0	1.86	2.25
RPE2	158.2	1.33	1.13
RAAA	152.9	1.51	1.23
RPX	42.3	2.40	5.64

<sup>1</sup>El valores promedio de la relación de absorbancia 260/280 fue de 2.645 para el kit DNeasy (Qiagen) y de 1.974 para el kit de Roche.

<sup>2</sup>El valor promedio de la relación absorbancia 260/230 fue de 2.3125 para el kit DNeasy (Qiagen) y de 1.808 para el kit de Roche.

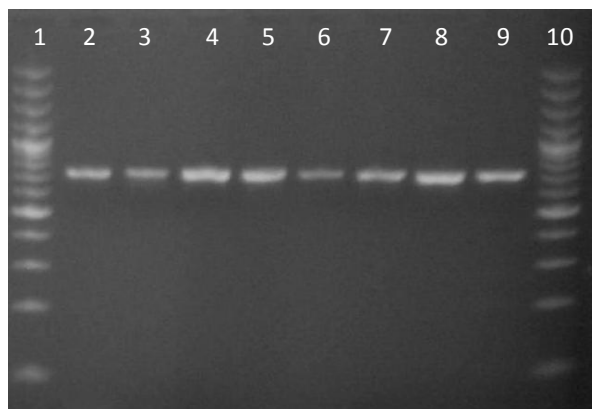
## 5.2 SECUENCIACIÓN

### 5.2.1 Elección de imprimadores

En la figura 5.2 se observan las bandas correspondientes a la amplificación de la subunidad I del gen que codifica para citocromo c oxidasa (COI).

Para todas las muestras amplificadas se obtuvieron bandas definidas y relativamente fuertes que se encontraban alrededor de las 700 pb. Sin embargo, con el par de imprimadores vf2\_t1 y fishr2\_t1 las bandas a su vez presentaron una intensidad de

fluorescencia más constante entre muestras, sin presentar diferencias significativas entre las mismas muestras extraídas con ambos kits (Figura 5.2).



**Figura 5.2** Detección de la subunidad I del gen mitocondrial que codifica para la citocromo c oxidasa utilizando el par de iniciadores vf2\_t1 y fishr2\_t1. (1 y 10) Marcador molecular 100pb, (2) muestra QAAA, (3) muestra QPE2, (4) muestra QMRay, (5) muestra QPV3, (6) muestra RAAA, (7) muestra RPE1, (8) muestra RMRos, (9) muestra RPV1.

### 5.2.2 Purificación de bandas

Las bandas cortadas del gel y purificadas con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) fueron cuantificadas, dando los valores de concentración de ADN que se muestran en el cuadro 5.2.

**Cuadro 5.2** Valores de concentración e indicadores de calidad de las bandas de ADN purificadas con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub>	Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>230</sub>
RPV1	19.0	1.65	0.06
RPV2	17.7	1.76	0.04
RPV3	21.3	1.69	0.13
RMRos	18.9	1.86	0.03
RMRay	29.7	1.93	0.25
RMX	28.6	1.82	0.09
RPE1	43.2	1.72	0.09
RPE2	20.3	1.71	0.08
RAAA	16.2	2.11	0.05
RPX	18.2	2.07	0.03

### 5.2.3 Secuenciación

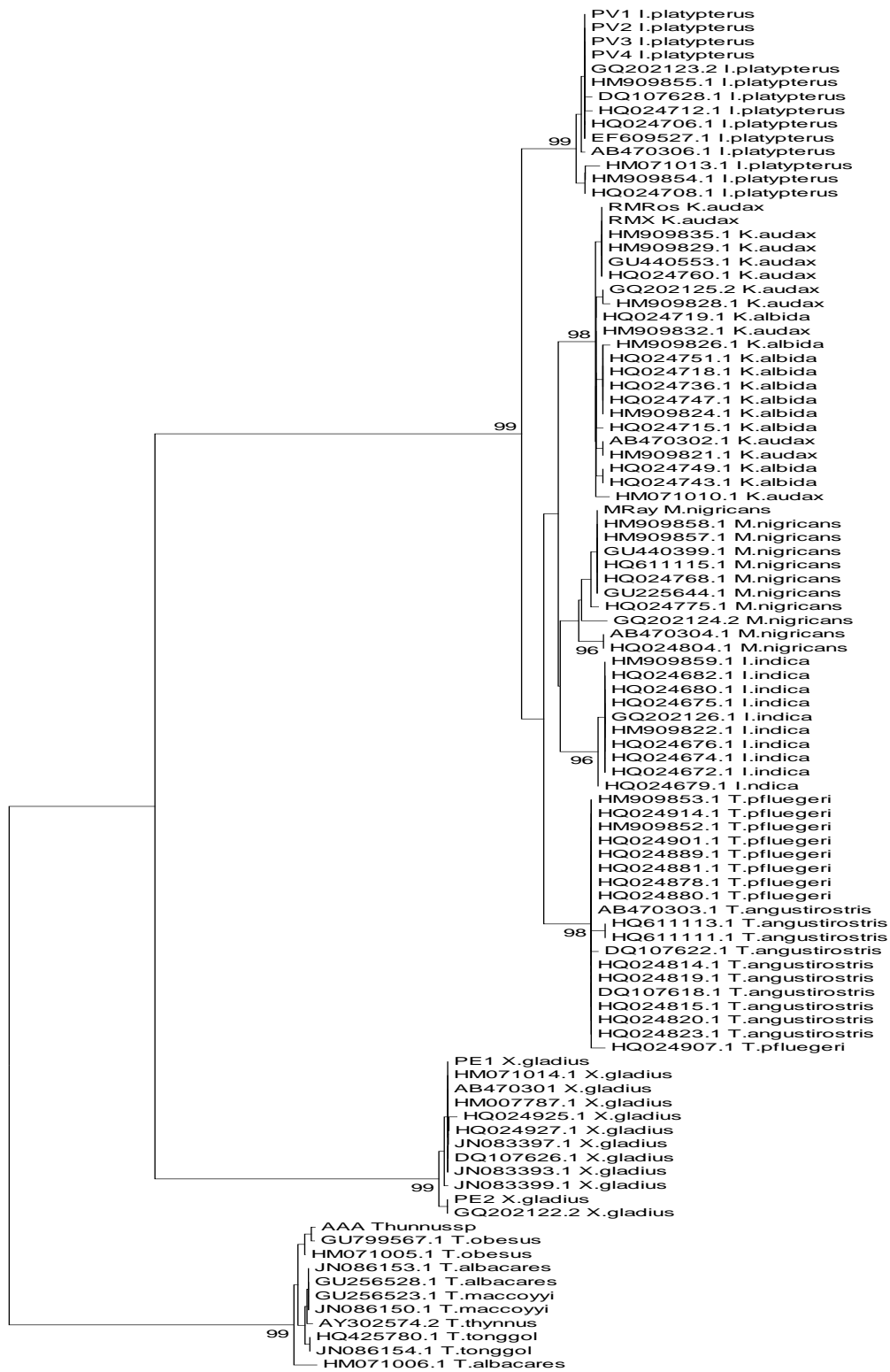
En la secuenciación al trabajar con un módulo de corrida con un tiempo de inyección de 20 segundos se obtuvieron electroferogramas caracterizados por un exceso de picos y gran cantidad de “blobs” (picos amplios que no permiten la identificación correcta de las bases), lo que generó secuencias muy pequeñas. Por el contrario, el módulo con un tiempo de inyección de 5 segundos generó electroferogramas con picos distinguibles, sin la presencia de “blobs”, permitiendo la obtención de secuencias consenso para las diez muestras control, con una longitud promedio del fragmento amplificado de la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa de 681 pb, con un rango de 674 a 691 pb.

Por medio de la secuenciación y la subsecuente comparación de las secuencias contra secuencias de referencia fue posible identificar todas las muestras, tal y como se presenta en el cuadro 5.3.

En el árbol filogenético elaborado (Figura 5.3), las secuencias de un mismo género se agruparon en un mismo clado.

**Cuadro 5.3** Resultado de la identificación de las muestras recolectadas con base en la comparación de las secuencias obtenidas de la subunidad I del gen de la citocromo c oxidasa (COI) contra secuencias de referencia de GenBank.

<b>Muestra</b>	<b>Tamaño del fragmento obtenido (pb)</b>	<b>Especie</b>	<b>% Identidad (match/mismatch)</b>	<b>Número de accesión de la secuencia de referencia</b>
PV1	678	<i>I.platypterus</i>	99 (677/678)	GQ202123.2
		<i>I.platypterus</i>	99 (676/678)	AB470306.1
		<i>I.albicans</i>	99 (673/678)	HM071013.1
PV2	690	<i>I.platypterus</i>	99 (684/686)	GQ202123.2
		<i>I.platypterus</i>	99 (683/686)	AB470306.1
		<i>I.albicans</i>	99 (680/686)	HM071013.1
PV3	674	<i>I.platypterus</i>	99 (673/674)	GQ202123.2
		<i>I.platypterus</i>	99 (672/674)	AB470306.1
		<i>I.albicans</i>	99 (669/674)	HM071013.1
PX	674	<i>I.platypterus</i>	99 (673/674)	GQ202123.2
		<i>I.platypterus</i>	99 (672/674)	AB470306.1
		<i>I.albicans</i>	99 (669/674)	HM071013.1
MRos	691	<i>T.audax</i>	99 (684/688)	GQ202125.2
		<i>T.audax</i>	99 (684/688)	AB470304.1
		<i>T.audax</i>	99 (683/688)	HM071010.1
MX	680	<i>T.audax</i>	99 (677/680)	GQ202125.2
		<i>T.audax</i>	99 (677/680)	AB470304.1
		<i>T.audax</i>	99 (676/680)	HM071010.1
MRay	685	<i>M.nigricans</i>	99 (674/680)	GQ202124.2
		<i>M.mazara</i>	99 (674/680)	AB470304.1
PE1	675	<i>X.gladius</i>	99 (674/675)	HM071014.1
		<i>X.gladius</i>	99 (674/675)	AB470301.1
		<i>X.gladius</i>	99 (671/675)	GQ202122.2
PE2	684	<i>X.gladius</i>	99 (678/681)	GQ202122.2
		<i>X.gladius</i>	99 (677/681)	HM071014.1
		<i>X.gladius</i>	99 (677/681)	AB470301.1
AAA	680	<i>T.obesus</i>	99 (675/680)	GU799567.1
		<i>T.obesus</i>	99 (675/680)	HM071005.1
		<i>T.albacares</i>	99 (674/680)	JN086153.1
		<i>T.albacares</i>	99 (674/680)	GU256528.1
		<i>T.tonggol</i>	99 (673/680)	HQ425780.1
		<i>T.tonggol</i>	99 (673/680)	JN086154.1
		<i>T.thynnus</i>	99 (673/680)	AY302574.2
		<i>T.thynnus</i>	99 (672/680)	JN086149.1
		<i>T.maccoyyi</i>	99 (671/680)	GU256523.1
<i>T.maccoyyi</i>	99 (672/680)	JN086150.1		

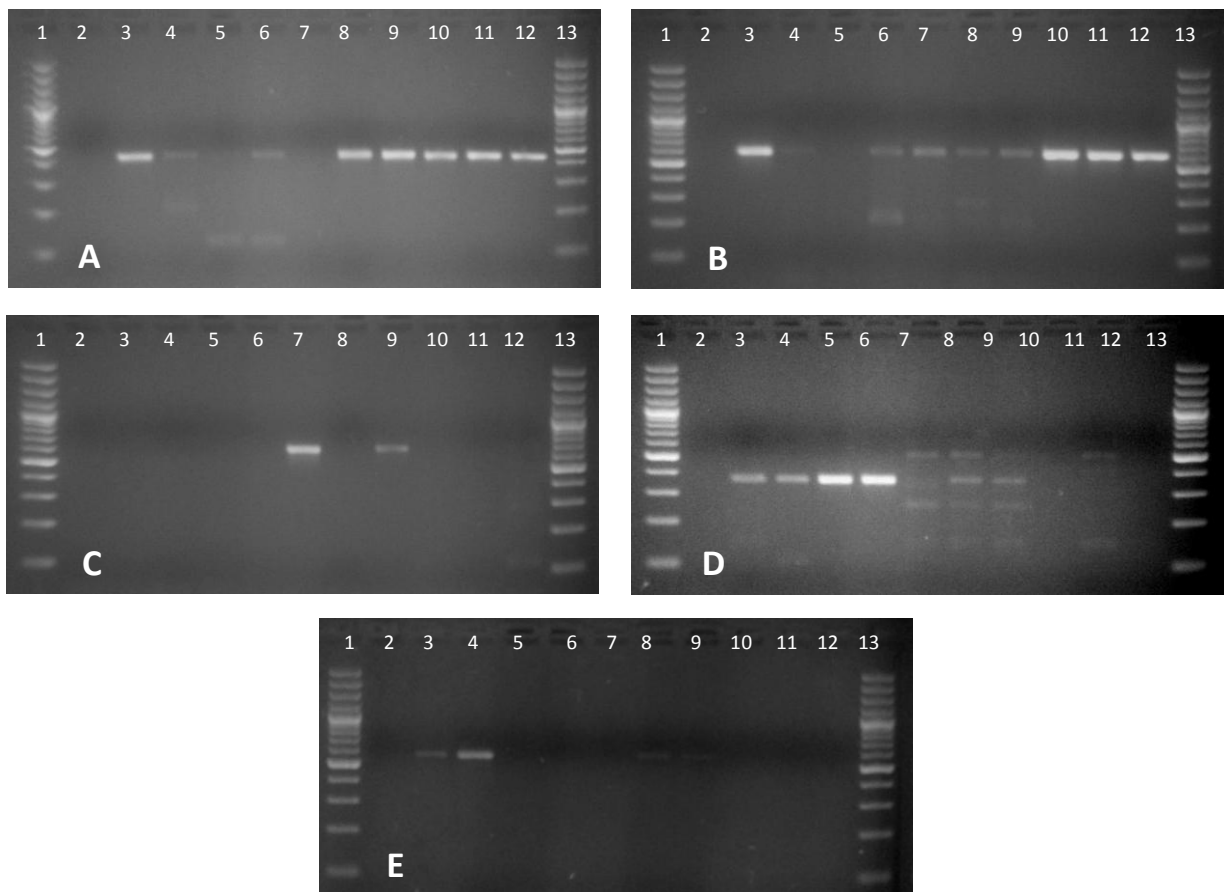


**Figura 5.3** Árbol filogenético del vecino más cercano (NJ) de 99 secuencias del gen COI correspondientes a 12 especies, basado en el parámetro de distancia K2P.

### 5.3 PCR MULTIPLEX

#### 5.3.1 Evaluación de los iniciadores diseñados para el PCR Multiplex

En la figura 5.4, correspondiente al análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se observa que para todos los iniciadores se obtuvieron bandas fuertes y definidas con pesos correspondientes para cada amplicón. No obstante, con el perfil térmico utilizado también se obtuvieron bandas débiles para muestras no específicas, excepto en el caso del iniciador Kaji-F (Figura 5.4C).



**Figura 5.4** Detección de la región control del ADN mitocondrial (D-loop) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v. **A:** Iniciadores Billf-F/Billf\_R, **B:** Iniciadores lplat-F/Billf-R, **C:** Iniciadores Kaji-F/Billf-R, **D:** Iniciadores Xiph-F/Billf-R, **E:** Iniciadores Thun-F/Thun\_R5. Carriles (1 y 13) Marcador molecular 100pb. (2) Control negativo, (3) muestra PX, (4) muestra AAA, (5) muestra PE2, (6) muestra PE1, (7): muestra MX, (8) muestra MRay, (9) muestra MRos, (10), muestra PV3, (11), muestra PV2, (12): muestra PV1.

### 5.3.2 Optimización de la reacción de PCR

Las pruebas realizadas aumentando la temperatura de alineamiento desde 55 °C hasta 64 °C, demostraron que al aumentar la temperatura los iniciadores amplificaron en menor medida muestras inespecíficas. No obstante, se presentaron discrepancias en cuanto a la temperatura adecuada de alineamiento para la amplificación de cada fragmento específico. Por tal razón se probaron perfiles térmicos a una temperatura de 62 °C pero con tiempo de alineamiento de 10 y 15 segundos. Los resultados de dichas pruebas se muestran en el cuadro 5.4.

**Cuadro 5.4** Cuadro resumen de los resultados obtenidos en las pruebas para la optimización de la reacción para el PCR Multiplex.

Prueba	Iplat-F	Kaji-F	Xiph-F	Billf-F	Thun-F
64 °C/1 min	BID	BEF	BID	NA	BEF
62 °C/10 s	BEF	BEF	BEF	NA	NA
62 °C/15 s	BID	BEF	BID	NA	BED

Nomenclatura BEF: banda específica fuerte, BED: banda específica débil, BIF: banda inespecífica fuerte, BID: banda inespecífica débil, NA: no hubo amplificación.

Como se muestra en el cuadro 5.4 solo los iniciadores Thun-F y Billf-F presentaron problemas para la amplificación con un tiempo de alineamiento corto. Por ello realizando modificaciones en la concentración de los cebadores sentido (Thun-F o Billf-F) y reverso (Thun\_R5 o Billf-R) se logró la amplificación de las muestras de atún, trabajando con Thun-F a 0.5 µM y Thun\_R5 a 0.7 µM, mientras que la amplificación de las muestras de picudos no se logró.

A razón de dichos resultados se determinó que el programa de PCR adecuado para realizar las pruebas del PCR Multiplex debía presentar una temperatura y tiempo de alineamiento de 62 °C y 10 s, respectivamente, y debido a la desemejanza de condiciones de PCR necesarias para el iniciador Billf-F con respecto a los demás, no iba a ser posible incluir este imprimador en el PCR Multiplex.



### 5.3.3 PCR Multiplex

Las pruebas realizadas con diferentes concentraciones de los iniciadores en la reacción, demostraron que si el imprimador Kaji-F se encuentra a una concentración igual o mayor a los demás iniciadores inhibe la amplificación de su propio fragmento así como del amplicón de los demás iniciadores. Por tal motivo, se determinó que la concentración de este iniciador debe ser de 0.2  $\mu\text{M}$  y los demás a 0.5  $\mu\text{M}$ .

De igual manera, al incorporar Thun-F y Thun\_R5 en el PCR Multiplex, se determinó que la concentración de Thun\_R5 debe ser de 0.7  $\mu\text{M}$  para lograr la amplificación de las muestras del género *Thunnus* sp.

De esta manera, los mejores resultados se obtuvieron con la siguiente mezcla de reacción: 6.25  $\mu\text{L}$  de DreamTaq Master Mix (2X) (Fermentas), 0.3125  $\mu\text{L}$  de los iniciadores Iplat-F, Xiph-F, Billf-R y Thun-F (20  $\mu\text{M}$ ), 0.125  $\mu\text{L}$  del cebador Kaji-F (20  $\mu\text{M}$ ), 0.4375  $\mu\text{L}$  de Thun\_R5, 2  $\mu\text{L}$  de muestra y 3.625  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Además, el perfil térmico con el cual se logró la amplificación de las muestras específicas se describe en el cuadro 5.5.

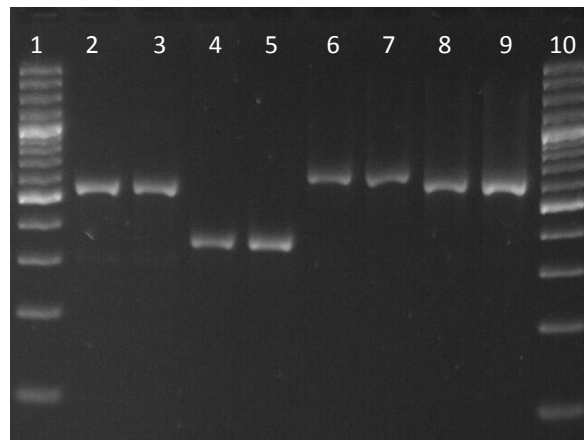
**Cuadro 5.5** Perfil térmico del PCR Multiplex para la amplificación de fragmentos específicos de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial.

Programa	Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	4min	1
2 (1)	Desnaturalización	95	45s	35
2 (2)	Apareamiento	58	10	
2 (3)	Extensión	72	35s	
3	Extensión final	72	5min	1
4	Almacenamiento	4	$\infty$	1

La reacción de PCR Multiplex estandarizada permitió la obtención de bandas definidas, fuertes, con una intensidad de fluorescencia constante (Figura 5.5) y con pesos correspondientes al peso teórico de cada amplicón (Cuadro 5.6).

**Cuadro 5.6** Cuadro resumen del tamaño de la banda obtenida en el análisis por electroforesis en gel de agarosa para cada una de las muestras en el PCR Multiplex.

Muestra	Tamaño de la banda obtenida (pb)	Tamaño esperado (pb)
PV2	581	580
PV3	586	580
MRos	624	610
MX	624	610
PE1	360	355
PE2	365	355
AAA	564	545
AAA	559	545



**Figura 5.5** Productos específicos de la región control del ADN mitocondrial de un PCR Multiplex. (1 y 10) Marcador molecular 100pb, (2) muestra AAA, (3) muestra AAA, (4) muestra PE2, (5) muestra PE1, (6) muestra MX, (7) muestra MRos, (8) muestra PV3, (9) muestra PV1.

#### **5.3.4 Evaluación de la especificidad de los iniciadores**

La secuenciación de los fragmentos específicos de la región control del ADN mitocondrial que generó cada par de iniciadores confirmó que en efecto amplificaban la especie deseada. Solamente, la muestra etiquetada como MRay (*K. audax*) no fue posible amplificarla con el par de iniciadores Kaji-F/Billf-R, por lo que al amplificarla con los universales para picudos, Billf-F/Billf-R, se determinó que dicho espécimen fue identificado incorrectamente, ya que correspondía a marlín azul (*M. nigricans*).

## CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La identificación de organismos y microorganismos por medio de métodos moleculares ha tomado gran auge en los últimos años y hoy en día son utilizados en diversidad de áreas a nivel mundial. Se han desarrollado técnicas que no solo han sido aplicadas a la investigación, sino también en diagnósticos rutinarios de laboratorio.

Estas técnicas se basan principalmente en el ADN, el cual se encuentra, prácticamente, en todas las células de un organismo (Teletchea *et al.*, 2005). Por esta razón la extracción del ADN genómico es un paso crítico para cualquier tipo de análisis que se desee realizar.

A través de los años las metodologías para la obtención de ácidos nucleicos a partir de muestras de peces se han ido optimizando. Las extracciones con fenol/cloroformo fueron de las primeras metodologías utilizadas (Collette *et al.*, 2006; Hiesh *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). Seguidamente, apareció el aislamiento de ácidos nucleicos basado en una resina de intercambio iónico denominada comercialmente como Chelex (Collette *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2005). En la actualidad, se encuentran gran cantidad de kits que permiten la obtención de ácidos nucleicos en unas pocas horas. La mayoría de ellos, basados en columnas de sílica en las cuales, en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas, se adhiere el ADN que finalmente es recuperado (Ivanova *et al.*, 2006).

Un ejemplo de kits comerciales ampliamente utilizados, son los kits DNeasy (Qiagen), los cuales han dado buenos resultados en la extracción de ADN genómico a partir de muestras de tejido de peces (Hanner *et al.*, 2011; Hyde *et al.*, 2005; Teletchea *et al.*, 2008).

Es por ello que en el presente trabajo se decidió evaluar dos kits comerciales el DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

Con base en los datos del cuadro 5.1, se determinó que la concentración promedio de ADN de las muestras extraídas con el kit de Roche fue mayor que aquellas extraídas con el kit DNeasy de Qiagen, con una concentración promedio de ADN de 92.23ng/μl y 70.46ng/μl, respectivamente.

En cuanto a pureza del ADN extraído, se ha establecido que un valor de, aproximadamente, 1.8 para la relación absorbancia 260/280 y entre 1.7 y 2.0 para la relación absorbancia 260/230 representan una muestra pura (López, 2007; Wilfinger *et al.*, 1997). Tomando en cuenta tales parámetros y con base en los resultados obtenidos (Cuadro 5.1) se obtuvo un ADN de mayor calidad con el kit de la marca Roche, con valores de 1.808 y 1.974 para las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, respectivamente.

A pesar que en primera instancia se tuvo como hipótesis que los mejores resultados se iban a obtener con el kit DNeasy (Qiagen), el cual ha sido muy utilizado para la extracción de ADN genómico a partir de tejido de peces, los mejores resultados se obtuvieron con el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), ya que permitió recuperar mayor cantidad de ADN, de alta calidad y pureza.

Lo anterior ratifica que la evaluación de diferentes protocolos es de vital importancia, ya que la obtención de buenos resultados depende de diversas variables, entre ellas la procedencia y calidad de la muestra, así como la manera en la que se tomó, procesó y se almacenó, la concentración de ADN, entre otros.

### **6.1 Secuenciación del gen COI y análisis de secuencias**

Con una extracción de ADN exitosa, paso clave para los posteriores análisis, se realizaron pruebas para la elección del par de imprimadores que se utilizarían para amplificar la región a secuenciar. Se eligió amplificar el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa debido a que este es uno de los genes mitocondriales más conservados, al codificar una proteína crítica para la respiración

celular y por ende para la producción de energía (Hsieh *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2007). Por lo tanto, se han diseñado iniciadores universales bastante robustos (Herbert *et al.*, 2003), característica que beneficiaría en gran medida la amplificación de la región de interés.

Para la amplificación de COI se emplearon cuatro iniciadores universales utilizados por Ivanova *et al.* (2007) como un coctel de imprimadores. Sin embargo, en el presente estudio se evaluaron como parejas, con el fin de valorar si dicha modificación permitía la obtención del fragmento de interés, disminuyendo así costos de la técnica.

Según los resultados de la electroforesis en gel de agarosa se determinó que todas las combinaciones fueron capaces de amplificar la región de interés, obteniéndose los mejores resultados con el par vf2\_t1 y fishr2\_t1 (Figura 5.2). Con ello se confirmó la posibilidad de utilizarlos en parejas para la amplificación del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa, tanto para todos los picudos como para atún, un escómbrido.

Para la secuenciación fue posible recolectar tres de las cuatro especies de picudos de importancia económica en Costa Rica: pez vela (*I. platypterus*), marlín rosado (*K. audax*) y pez espada (*X. gladius*) (Soto *et al.*, 2010). Además se incluyó una muestra de atún (*Thunnus* sp.) pues es una de las especies que más transita en el mercado pesquero y si el espécimen, sea un picudo o un atún, es fileteado y procesado sería muy poco probable notar diferencia alguna.

Mediante la secuenciación del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa, se logró confirmar la identificación de cada una de las muestras recolectadas (Cuadro 5.3). Cabe resaltar que por medio de esta técnica fue posible identificar la muestra incógnita (PX) como una muestra de pez vela y la muestra de marlín de especie desconocida (MX) como una muestra de marlín rosado.

Además, en este mismo estudio fue posible corroborar los errores que pueden cometerse a la hora de identificar visualmente un espécimen. Lo anterior, ocurrió con la

muestra MRay, que fue identificada durante la recolección como marlín rosado, pero cuya secuenciación determinó que en realidad correspondía a una muestra de marlín azul (*M. nigricans*). Lo anterior es muy razonable debido a que corresponde a la especie de interés comercial de la cual se creyó no haber podido recolectar ninguna muestra.

Con base en la situación presentada para la muestra de marlín azul, es posible pensar lo fácil que puede ser enmascarar la verdadera identidad de un espécimen. De esta manera, se corrobora la importancia de métodos que permitan una mejor identificación, de forma tal que se respete la legislación existente (“Acuerdo A.J.D.I.P./476-2008”, 2008) que busca velar por la protección del pez vela que es de gran importancia en una actividad sostenible como lo es la pesca turístico-deportiva que contribuye sustancialmente en la economía del país.

Con base en los resultados obtenidos en el árbol filogenético (Figura 5.3), se confirma que el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa, a pesar de ser muy conservado, a través del tiempo ha acumulado un número de mutaciones, de manera que hoy en día posee las suficientes variaciones como para permitir la distinción entre géneros de picudos.

Mucha controversia se ha generado en cuanto a la relación filogenética entre los peces de pico y los escómbridos, principalmente debido a semejanzas fisiológicas entre ambos (Little *et al.*, 2010). No obstante, estudios filogenéticos recientes han demostrado que pertenecen a diferentes taxones (Collette *et al.*, 2006; Orrell *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2010). En el análisis realizado en este estudio se observan resultados similares, ya que las secuencias correspondientes al género *Thunnus* sp. fueron lo bastante diferentes en comparación con las secuencias de picudos, ya que se agruparon en un clado completamente aparte (Figura 5.3), verificando que a nivel genético los picudos no son muy similares a los escómbridos y por tanto sus semejanzas pueden deberse a algún tipo de presión selectiva y no necesariamente como consecuencia de que compartan un ancestro común (Little *et al.*, 2010).

Por otra parte, en cuanto a su capacidad para realizar una distinción interespecífica, en el presente estudio solo se trabajó con tres géneros dentro de los cuales se analizaron dos o más especies: *Kajikia* sp., *Tetrapturus* sp. y *Thunnus* sp. En todos ellos no fue posible diferenciar cada una de las especies mediante el análisis filogenético (Figura 5.3).

En cuanto a la imposibilidad de la separación de las especies *T. angustirostris* y *T. pfluegeri* y las especies *K. audax* y *K. albida*, Hanner *et al.* (2010) obtuvieron resultados concordantes pues mediante el análisis del gen COI no fue posible identificar de forma exacta tres de los peces aguja (*T. belone*, *T. pfluegeri* y *T. angustirostris*) ni fueron capaces de distinguir ambos marlines.

La identificación de especies mediante análisis de secuencias de ADN, se basa en la acumulación de variaciones en el genoma de los organismos (Wong y Hanner, 2008). Por esta razón, tales variaciones entre individuos les permiten agruparse según la semejanza entre ellas. Sin embargo, cuando nos referimos a especies que han divergido recientemente, puede ser más difícil tal distinción ya que el proceso de especiación requiere de un lapso determinado para acumular las variaciones necesarias que permitan distinguir de forma clara una especie de otra.

Puede pensarse que los tres peces aguja (*T. belone*, *T. pfluegeri* y *T. angustirostris*), así como el marlín rosado (*K. audax*) y rayado (*K. albida*) divergieron recientemente y dicho suceso aunado a que COI es un gen muy conservado, revela que no ha transcurrido un período adecuado como para que se hayan acumulado las suficientes mutaciones que generen una variación significativa entre cada una de estas especies. Además, debe tomarse en cuenta que al ser un gen esencial para los seres vivos el fenómeno de especiación deberá ser tal, que las variaciones en la secuencia de dicho gen no afecten el producto proteico que codifica. Por lo tanto, es necesario considerar si un gen tan conservado es el adecuado para la identificación de especies dentro de la familia Istiophoridae.



Igualmente, no fue posible realizar una diferenciación clara entre las especies de atún, resultados que concuerdan con aquellos obtenidos por Kawakami *et al.* (2010). Cabe resaltar que en el árbol filogenético construido (Figura 5.3), la secuencia de atún obtenida en el presente estudio agrupó selectivamente con las secuencias de *T. obesus* lo que hace posible considerar que la muestra en cuestión corresponda a dicha especie y por tanto que el gen COI puede ser capaz de realizar tal distinción. En otros estudios se concluye que mediante análisis de secuencias de dicho gen es posible identificar diferentes especies del género *Thunnus* sp. (Paine *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2005). Por esta razón, los resultados obtenidos podrían deberse al poco número de secuencias con las cuales se trabajó ya que no era el género de mayor interés en la presente investigación.

## 6.2 PCR Multiplex

La técnica de PCR Multiplex es una metodología que se ha empleado muy poco para la identificación de peces de pico (Hyde *et al.*, 2005; Simms *et al.*, 2010), siendo la técnica de PCR-RFLP la más utilizada (Hsieh *et al.*, 2005; Hsieh *et al.*, 2007; Luthy *et al.*, 2005; McDowell y Graves, 2002). A pesar de ello es una metodología prometedora, al ser menos laboriosa y disminuir el tiempo requerido para realizar el análisis.

Se determinó que el PCR Multiplex estandarizado fue exitoso, por lo que puede ser utilizado como una técnica fiable, reproducible y eficiente para la identificación de los tres picudos *I. platypterus*, *X. gladius* y *K. audax*, así como miembros del género *Thunnus* sp. Con base en el análisis de los productos de PCR obtenidos mediante la electroforesis en gel de agarosa, cada par de iniciadores amplificó únicamente la especie o género blanco, pues cada fragmento específico se encontró cerca del peso esperado para cada muestra analizada (Figura 5.5).

No obstante, cabe señalar que el PCR Multiplex fue exitoso solamente con los iniciadores específicos, ya que el comportamiento tan disímil del Billf-F no permitió la incorporación de este en la reacción.

Lo anterior sugiere que cada par de iniciadores diseñados para amplificar la región control del ADN mitocondrial de la especie o género determinado, presentaron una buena especificidad bajo las condiciones de trabajo establecidas. Lo anterior se evidencia en los resultados obtenidos mediante la secuenciación de los productos de PCR que confirmaron que el amplicón generado por cada pareja correspondía a la especie blanco.

La región control es una región no codificante del genoma mitocondrial que presenta una tasa de mutación unas cinco a diez veces mayor que los genes codificantes (Bradman *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2005), situación que podría deberse en gran medida a la ausencia de una función codificante (Roques *et al.*, 2004). Al no codificar ningún producto proteico las mutaciones ocurridas no generarían cambios tan drásticos, como se explicó para el caso del gen COI, y como consecuencia de ello podría creerse que no existe tanta limitación en cuanto a modificaciones se refiere.

De esta manera, se esperaría que la región control fuese más representativa del proceso evolutivo y por ende de la divergencia, no solo entre géneros sino entre especies relacionadas. Entre mayor sea la tasa de mutación de la región de interés mayor será el número de variaciones inter e intraespecíficas que con el paso del tiempo se acumulan, presentando así la información de la variación filogenética (Feinstein y Cracraft, 2004).

Para lograr que cada par de imprimadores específicos no amplifiquen muestras inespecíficas debe trabajarse bajo estrictas condiciones de PCR, lo cual es de vital importancia cuando se trata de especies relacionadas. En este caso, a pesar de que la región control presenta mayor número de variaciones interespecíficas, un tiempo de alineamiento de 10 segundos fue crucial para lograr la especificidad de los iniciadores, ya que con un tiempo de alineamiento mayor, inclusive de 5 segundos más, los iniciadores amplificaron bandas inespecíficas.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- Con los dos kits comerciales evaluados se logró la extracción de ADN genómico a partir de muestras de tejido de peces, siendo el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) el más efectivo al permitir recuperar mayor cantidad de ADN de alta pureza.
- Todas las parejas de iniciadores universales evaluadas fueron capaces de amplificar el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa.
- Con el par de iniciadores vf2\_t1 y fishr2\_t1 y el programa de PCR utilizado se obtuvieron los mejores resultados para la amplificación del gen que codifica para COI.
- La secuenciación de las muestras control permitió determinar que correspondían a muestras de pez vela (*I. platypterus*), marlín rosado (*K. audax*), marlín azul (*M. nigricans*), pez espada (*X. gladius*) y atún (*Thunnus* sp.)
- El análisis filogenético realizado con base en el gen COI determinó que no es apto para realizar una diferenciación entre especies de peces aguja y las de marlín rosado y blanco.
- El PCR Multiplex estandarizado permitió la identificación de las especies y géneros *I. platypterus*, *Kajikia* sp., *X. gladius* y *Thunnus* sp.
- Tanto la secuenciación como el PCR Multiplex pueden ser utilizados como metodologías reproducibles y fiables para la identificación del pez vela *I. platypterus*, en Costa Rica.

## **CAPÍTULO 8. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda diseñar otro iniciador sentido universal para picudos que posea una temperatura de alineamiento teórica ( $T_m$ ) mayor, ya que por lo general en la práctica la temperatura de alineamiento tiende a disminuir, de manera que exista mayor probabilidad de que pueda amplificar bajo las condiciones establecidas para el multiplex.

## BIBLIOGRAFÍA

Acuerdo AJDIP/476-2008. (2008, 12 de Diciembre). Medidas de ordenamiento para el establecimiento de acuerdos que permitan regular las actividades de la pesca comercial y la pesca turística-deportiva. Instituto de Pesca y Acuicultura. INCOPECA. Diario Oficial La Gaceta No 8. Enero 13, 2009.

Asensio, L. 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology*. 18(11): 558-566

Bangma, J. 2006. *Contemporary population structure and historical demography of sailfish (Istiophorus platypterus) in the Atlantic Ocean*. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Texas A&M, Estados Unidos. Consultado el 25 de setiembre del 2011. Disponible en: <<http://repository.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/ETD-TAMU-1876/BANGMA-THESIS.pdf?sequence=1>>

Bradman, H., Grewe, P., Appleton, B. 2011. Direct comparison of mitochondrial markers for the analysis of swordfish population structure. *Fisheries Research*. 109(1): 95-99

Carpenter, K., Collette, B. y Russo, J. 1995. Unstable and stable classifications of scombroid fishes. *Bulletin of Marine Science*. 56(2): 379-405.

Collette, B., Potthoff, T., Richards, W., Uevangi, S., Russo, J. y Nishikaw, Y. 1984. Scombroidei: development and relationships. En H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., y S.L. Richardson, (Eds). *Ontogeny and Systematics of fishes: Based on An International Symposium Dedicated to the Memory of Elbert Halvor Ahlstrom*. (591-620). New York, USA: American Society of Ichthyologist and Herpetologists.

Collette, B., McDowell, J. y Graves, J. 2006. Phylogeny of recent billfishes (Xiphoidei). *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 455-468

Collete, B. 2010. Reproduction and development in epipelagic fishes. En: *Reproduction and Sexuality in Marine Fishes: Patterns and Processes*, K. Cole. (Ed) University of California Press. (21- 63). California, USA.

Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2006. Polémica por el uso de monóxido de carbono en carne. Boletín de Información Agraria y Pesquera de Estados Unidos y Canadá. No.296 Consultado el 15 de julio del 2011. Disponible en <<http://www.mapausa.org/Boletines/2006/bol296.pdf>>

Delgado, D. 2011. Autoridades decomisan 7000 kilos de pez vela. La Nación: Sección Sucesos, San José, CR. Abril 02, p18A. Consultado en <<http://www.nacion.com/2011-04-02/Sucesos/NotasSecundarias/Sucesos2734868.aspx>>

Ehrhardt, N. y Fitchett, M. 2006. On the seasonal dynamic characteristics of the sailfish, *Istiophorus platypterus*, in the eastern Pacific off Central America. *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 589-606

Eslava, N., González, L. y Gaertner, D. 2003. Asociación de la abundancia y la distribución vertical de atunes y peces de pico en el sureste del Mar Caribe. *Revista Biología Tropical*. 51(1): 213-220.

Feinstein, J. y Cracraft, J. 2004. Solving a sequencing problem in the vertebrate mitochondrial control region using phylogenetic comparisons. *DNA Sequence*. 15(6): 374-377

Fierstine, H. 2006. Fossil history of billfishes (Xiphiidae). *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 433-453

Finnerty, J. y Block, B. 1995. Evolution of cytochrome *b* in the Scombroidei (Teleostei): molecular insights into the billfish (Istiophoridae and Xiphiidae) relationships. *Fishery Bulletin*. 93(1): 78-96

FishBase. 2011. Consultado el 15 de julio del 2011. Disponible en: <<http://www.fishbase.org/search.php>>

Galeana, I., Galván, F., Gómez, R. 2008. Influencia del tipo de anzuelo y la profundidad de pesca en la captura con palangre de tiburones y otras especies pelágicas al noroeste del Pacífico mexicano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(1): 99-110.

González, S., Krug, M., Nielsen, M., Santos, Y. y Call, D. 2004. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(4): 1414-1419

Goujon, M; Majkowski, J. 2011. Biological characteristics of tuna. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Consultado el 16 de julio del 2011. Disponible en: <<http://www.fao.org/fishery/topic/16082/en>>

Graves, J. y McDowell, J. 2003. Stock structure of world's istiophorid billfishes: a genetic perspective. *Marine and Freshwater Research*. 54(4): 287-298

Graves, J. y McDowell. 2006. Genetic analysis of white marlin (*Tetrapturus albidus*) stock structure. *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 469-482

Gubbay, S. 2006. Marine nature conservation in the pelagic environment: a case for pelagic Marine Protected Areas? WWF for a living planet.

Hanner, R; Floyd, R; Bernard, A; Collette, B y Shivji, M. 2011. DNA barcoding of billfishes. *Mitochondrial DNA*. 22(S1): 27-36

Herbert, P.; Cywinska, A.; Ball, S. y Waard, R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*. 270(1512): 313-321

Honma, H., Asano, R., Obara, M., Otawa, K., Suyama, Y. y Nakai, Y. 2009. Bacterial populations in epilithic biofilms along two oligotrophic rivers in the Tohoku region in Japan. *Journal of General and Applied Microbiology*. 55(5): 359-371

Hsieh, Y. y Hwang, D. 2004. Molecular phylogenetics relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome *b* gene and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52(13): 4159-4165

Hsieh, H., Chai, T. y Hwang, D. 2005. Rapid PCR-RFLP method for the identification of 5 billfish species. *Journal of Food Science*. 70(4): 246-249

Hsieh, H., Chai, T. y Hwang, D. 2007. Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfishes meats. *Food Control*. 18(4): 369-374

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N., Taylor, E., Burrdige, M., *et al.* 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoSone*. 3(6): 2490-2497

Hyde, J., Lynn, E., Humphreys, R., Musyl, M., West, A. y Vetter, R. 2005. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. *Marine Ecology Progress Series*. 286: 269-277

Hyde, J., Humphreys, M., Lynn, E y Vetter, R. 2006. A Central North Pacific spawning ground for striped marlin, *Tetrapturus audax*. *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 683-690

Integrated Taxonomic Information System. [ITIS]. 2011. Consultado el 14 de julio del 2011. Disponible en: <<http://www.itis.gov/>>

Ivanova, N., Dewaard, J., Herbert, P. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*. 6(4): 998-1002

Ivanova, N., Zemlak, T., Hanner, R., Herbert, P. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 7(4): 544-548

Johnson, D. 1986. Scombroid phylogeny: an alternative hypothesis. *Bulletin of Marine Science*. 39(1): 1-41

Kawakami, T., Aoyama, J. y Tsukamoto, K. 2010. Morphology of pelagic fish eggs identified using mitochondrial DNA and their distribution in waters west of the Mariana Islands. *Environmental Biology of Fishes*. 87(3): 221-235

Ley de Pesca y Acuicultura. Ley No 8436. (2005, 10 de Febrero). Diario Oficial La Gaceta, No 78. Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. Abril 25, 2005.

Lin, W., Shiau, C. y Hwang, D. 2005. Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome *b* gene sequence and PCR-RFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*. 13(4): 382-387.

Little, A., Lougheed, S. y Moyes, C. 2010. Evolutionary affinity of billfishes (Xiphiidae and Istiophoridae) and flatfishes (Pleuronectiformes): Independent and trans-subordinal origins of endothermy in teleost fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(3): 897-904

López, G. 2007. *Detección molecular de Helicobacter pylori*. Informe de Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.

Luthy, S., Cowen, R., Serafy, J. y McDowell, J. 2005. Toward identification of larval sailfish (*Istiophorus platypterus*), white marlin (*Tetrapturus albidus*), and blue marlin (*Makaira nigricans*) in the western North Atlantic Ocean. *Fishery Bulletin*. 103(4): 588-600

Magaña, J., Arenas, M. y Gómez, R. 2009. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*. 137(7): 946-956

McDowell, J. y Graves, J. 2002. Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. *Fishery Bulletin*. 100(3): 537-544

McDowell, J. y Graves, J. 2008. Population structure of striped marlin (*Kajikia audax*) in the Pacific Ocean based on analysis of microsatellite and mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65(7): 1037-1320

Morris, J., Taylor, S., Birt, T. y Friesen, V. 2010. Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in the three related seabird species. *BMC Evolutionary Biology*. 10(14): 1-10

Nahle, N. 2008. Ambientes Marinos. Biology Cabinet Organization. Consultado el 18 de julio del 2011. Disponible en: <[http://www.biocab.org/Ambientes\\_Marinos.html](http://www.biocab.org/Ambientes_Marinos.html)>

Nakamura, I. 1985. FAO Species Catalogue: Vol.5. Billfishes of the World, An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. *FAO Fisheries Synopsis*. 5(125): 3-9

Orbesen, E., Hoolihan, J., Serafy, J., Snodgrass, D., Peel, E. y Prince, E. 2008. Transboundary movement of atlantic Istiophorid billfishes among international and U.S. domestic management areas inferred from mark-recapture studies. *Marine Fisheries Review*. 70(1): 14-23

Orrell, T., Collette, B. y Jhonson, D. 2006. Molecular data support separate Scombrids and Xiphioid clades. *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 505-519



Paine, M., McDowell, J. y Graves, J. 2007. Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science*. 80(2): 353-367

Poggi, H., Guzmán, A., García, P., Lagos, M. 2009. "PCR universal o de amplio espectro": Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Revista médica de Chile*. 137(8): 1122-1125

Potthoff, T., Kelley, S. y Javech, J. 1986. Cartilage and bone development in scombroid fishes. *Fishery Bulletin*. 84(3): 647-678

Richardson, D., Vanwye, J., Exum, A., Cowen, R. y Crawford, D. 2007. High-throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics. *Molecular Ecology Notes*. 7(2): 199-207

Rocha, A; Garber, N; Garber, A y Stuck, K. 2005. Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of *Mugil cephalus*. *Hidrobiológica*. 15(2): 139-149

Romeo, T., Consoli, P., Greco, S., Canese, S. y Andaloro, F. 2008. Swordfish (*Xiphias gladius*: Teleostea: Xiphiidae) surface behaviour during reproductive period in the central Mediterranean sea (southern Tyrrhenian sea). *Marine Biodiversity Records*. 2(45): 1-7

Roques, S., Godoy, J., Negro, J. y Hiraldo, F. 2004. Organization and variation of the mitochondrial control region in two vulture species, *Gypaetus barbatus* and *Neophron percnopterus*. *Journal of Heredity*. 95(4): 332-337

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12): 5463-5467

Simms, J., Rooker, J., Holt, S., Holt, G. y Bangma, J. 2010. Distribution, growth, and mortality of sailfish (*Istiophorus platypterus*) larvae in the northern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*. 108(4): 478-490

Shivji, M., Magnussen, J., Beerkircher, L., Hinteregger, G. Lee, D., Serafy, J., et al. 2006. Validity, identification, and distribution of the roundscale spearfish, *Tetrapturus georgii* (Teleostei: Istiophoridae): morphological and molecular evidence. *Bulletin of Marine Science*. 79(3): 483-491

Soto, M., Yong, M., Gutiérrez, A., Fernández, C., Lucke, R., Rojas, F., et al. 2010. Un análisis de la contribución económica de la pesca deportiva y comercial a la economía de Costa Rica. Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas, Universidad de Costa Rica.

Teletchea, F., Maudet, C. y Hanni, C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *TRENDS in Biotechnology*. 23(7): 359-366

Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisie, M., Laudet, V. y Hanni, C. 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*. 45(3): 967-975

Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews of Fish Biology and Fisheries*. 19(3): 265-293

Terreros, M., Grijalva, M. y Jiménez, P. 2010. Implementación de un ensayo PCR Multiplex para la detección de genes VanA, VanB y VanC relacionados con la resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. *Revista Ciencia*. 13(2): 141-150

Vega, E. 2008. Potencial de la pesca en el Pacífico costarricense. *Ambientico: Revista mensual sobre la actualidad ambiental*. 173: 14-15. ISSN 1409-214X

Ward, R., Zemlak, T; Innes, B; Last, P y Herbert, P. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of Royal Society B*. 360(1462): 1847-1857

Wilfinger, W; Mackey, K; Chomcynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 22(3): 474-481

Wong, E. y Hanner, R. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International Journal*. 41(8): 828-837

Wu, Y., Hsieh, C., Chen, H. y Hwang, D. 2008. Identification of six common species of processed filefish using cytochrome *b* gene sequence and PCR-RFLP analysis. *The Raffles Bulletin of Zoology*. Suppl.19: 151-158

## ANEXOS

### **Anexo 1. Bench Protocol: Animal Tissue (Spin-Colum Protocol) del kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)**

1. Se cortaron aproximadamente unos 25 mg del tejido, el cual se disgregó en pequeños pedazos y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Seguidamente, se añadieron 180  $\mu$ L de buffer ATL.
2. Se agregaron 20  $\mu$ L de proteinasa K, se agitó e incubó a 56 °C hasta que el tejido se lisó completamente. Durante la incubación se agitó ocasionalmente de forma manual.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron agitadas por 15 s. Se agregaron 200  $\mu$ L del buffer AL, se adicionaron 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) y se agitó nuevamente.
4. La muestra se pipeteó a una columna del kit que fue previamente colocada en un tubo recolector de 2 ml. Se centrifugó a 8000rpm por un minuto y luego se descartó el tubo de colecta.
5. La columna se colocó en un nuevo tubo recolector de 2 ml y se agregó 500  $\mu$ L de buffer AW1. Posteriormente, se centrifugó por un minuto a 8000rpm y se descartó el tubo de colecta.
6. La columna fue colocada en otro tubo recolector, se procedió a adicionar 500  $\mu$ L del buffer AW2, centrifugar por tres minutos a 14000rpm y, finalmente, descartar el tubo recolector.
7. A continuación, la columna fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se adicionaron 200  $\mu$ L del buffer AE o buffer de elución y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugó por un minuto a 8000rpm, se recolectó el flujo que pasó a través de la columna y este se colocó de nuevo en la parte superior de esta. Nuevamente, se dejó incubar las muestras por dos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por un minuto a 8000rpm.

## **Anexo 2. Protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de tejido animal y protocolo de lavado y elución del kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)**

### a) Protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de tejido animal

1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se adicionaron, aproximadamente, 25 mg de la muestra de tejido cortada en pequeños pedazos, se agregaron 200  $\mu$ L del buffer de lisis y 40  $\mu$ L de proteinasa K e inmediatamente se agitó e incubó a 55 °C por una hora o hasta que el tejido se lisara completamente.
2. Finalizada la incubación se adicionaron 200  $\mu$ L del “binding buffer”, se agitó e incubó por diez minutos a 70 °C.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol y se agitó vigorosamente.
4. A continuación, se colocó una columna en un tubo de recolección, se transfirió la muestra a la parte superior de la columna y se centrifugó por un minuto a 8000rpm. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

### b) Protocolo de lavado y elución

1. Luego de centrifugar, se descartó el tubo de recolección y se colocó la columna en un nuevo tubo recolector. Seguidamente, se adicionaron 500  $\mu$ L del “inhibitor removal buffer” a la parte superior de la columna y se procedió a centrifugar por un minuto a 8000rpm.
2. Se descartó el tubo recolector y la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu$ L del “wash buffer” y se centrifugó por un minuto a 8000rpm. Este paso se repitió una segunda vez.
3. Consecutivamente, se descartó el flujo que pasó a través de la columna y se centrifugó una vez más a máxima velocidad por diez segundos.
4. Para la elución del ADN se procedió a colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, agregar en la columna 200  $\mu$ L del “elution buffer”

precalentado a 70 °C e incubar por cinco minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación se centrifugó por un minuto a 8000rpm, se tomó el flujo y este se colocó de nuevo en la columna para incubar una vez más, por dos minutos a temperatura ambiente. Finalmente, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó por un minuto a 8000rpm y las muestras se almacenaron a -20 °C.

### **Anexo 3. Cuantificación de ADN**

Para la cuantificación se tomaron 5 µL de cada muestra que se diluyeron en 245 µL de agua libre de nucleasas tratada con DEPC. Del volumen total obtenido se tomaron 220 µL que fueron colocados en la cubeta para realizar la lectura.

Como blanco se utilizó el buffer de elución de cada kit de extracción, el cual fue diluido y tratado de la misma manera en que se trabajó con las muestras.

De la lectura realizada se obtuvieron los datos de concentración de ADN (ng/µL), relación absorbancia 260/280 y absorbancia 260/230, siendo estos dos últimos datos utilizados como indicadores de calidad para evaluar la pureza del ADN extraído.

### **Anexo 4. Electroforesis en gel de agarosa**

#### **Anexo 4.1**

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % m/v en buffer TBE 1X, tiñendo el gel con 3 µL de bromuro de etidio. Para la corrida se utilizó buffer TBE 1X y las muestras se prepararon mezclando el volumen de reacción (aproximadamente 12.5 µL) con 2 µL de buffer de carga (6X DNA Loading Buffer, Fermentas) y de dicha mezcla 10 µL fueron montados en los pocillos del gel. Además, se cargó 4 µL del marcador de tamaño molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Finalmente, el gel se dejó correr por 45 minutos a un voltaje constante de 125 voltios.

## **Anexo 4.2**

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % m/v en buffer TBE 1X. El gel se tiñó con 4 µL de GelRed y se utilizó buffer TBE 1X como buffer de corrida. Las muestras se prepararon mezclando el volumen de reacción (aproximadamente 12.5 µL) con 2 µL de buffer de carga (6X DNA Loading Buffer, Fermentas) y de dicha mezcla se tomaron 3 µL para montar en el gel. Por su parte, del marcador de tamaño molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) se montó 1 µL. Finalmente, se realizó la electroforesis durante 45 minutos con un voltaje constante de 125 V.

## **Anexo 5. Bench Protocol: QIAquick Gel Extraction Microcentrifuge Protocol (Qiagen).**

1. Se cortaron las bandas de ADN del gel de agarosa y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Se pesó el pedazo de gel y para todas las muestras se trabajó con un peso de 300 mg. Se añadieron 3 volúmenes del buffer QG por cada volumen del gel (100mg ~ 100µL), por lo cual se agregaron 900 µL de dicho buffer.
3. Seguidamente, se incubó por 10 minutos a 50 °C o hasta que el gel se hubiese disuelto por completo. Además, durante la incubación se agitó, ocasionalmente, de forma manual.
4. Finalizado el período de incubación, se adicionó un volumen del gel de isopropanol, por lo cual se agregaron 300 µL de este y se agitó vigorosamente.
5. Se colocó una columna del kit en un tubo de recolección de 2 ml y para unir el ADN a la columna se añadió la muestra (máximo 800 µL), se centrifugó por un minuto a 14000rpm y se descartó el flujo. Una vez que todo el volumen de muestra se hizo pasar por la columna, se adicionaron 500 µL del buffer QG, se centrifugó por un minuto a 14000rpm y nuevamente se descartó el flujo que pasó a través de la columna.
6. Posteriormente, para el lavado se agregaron 700 µL del buffer PE y se procedió a centrifugar por un minuto a 14000rpm. Así mismo, el flujo fue descartado.

7. Una vez descartado el flujo, se centrifugó la columna por un minuto a 14000rpm.
8. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y para la elución del ADN se adicionaron 30  $\mu$ L del buffer EB y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido el período de incubación se centrifugaron las muestras por un minuto a 14000rpm y el flujo se colocó de nuevo en la columna dejándolo a temperatura ambiente por 3 minutos más. Finalmente, se centrifugó un minuto a 14000rpm se descartó la columna y las muestras se almacenaron a -20 °C.

#### **Anexo 6. Protocolo: Big Dye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems).**

El procedimiento que se utilizó fue el especificado por el fabricante pero se trabajó con una cuarta parte del volumen establecido para cada uno de los reactivos de trabajo.

1. En tubos eppendorf de 0.2 ml se adicionaron 5  $\mu$ L del reactivo XTerminator solution.
2. Seguidamente, se agregaron 22.5  $\mu$ L de SAM solution.
3. A continuación, se añadieron 5  $\mu$ L del volumen de reacción de cada muestra.
4. Posteriormente, las muestras fueron agitadas en un vortex por 30 minutos a máxima velocidad.
5. Finalizada la agitación, las muestras fueron centrifugadas por 2 minutos a 3000rpm, lo cual provocó la separación en dos fases, una superior transparente y una inferior de apariencia viscosa.
6. Se tomaron 10  $\mu$ L de la fase superior de cada muestra, los cuales fueron colocados en la placa del secuenciador, se centrifugó la placa y se colocó en el equipo para realizar la corrida de secuenciación.