



Optimización del Sistema AFLP para Determinación de la Variabilidad Genética de *Ucides occidentalis* en tres zonas de manglar del Golfo de Guayaquil

María Fernanda Ratti Torres¹, Marcelo Muñoz Naranjo²

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar (FIMCM)

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, vía Perimetral Km. 30.5, Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

currufer@yahoo.com¹, mmunoz@espol.edu.ec²

Resumen

El cangrejo rojo Ucides occidentalis es una especie representativa de la fauna de manglar de la costa ecuatoriana. Además este organismo tiene valor comercial y constituye el sustento para muchas familias de pescadores localizadas en el Golfo de Guayaquil. Sin embargo poco se conoce del estado de las poblaciones naturales y de la riqueza genética de esta especie. Por ello, en este estudio se estandarizó una técnica que permitió el uso de marcadores moleculares tipo AFLP para determinar la variabilidad genética de U. occidentalis. Se seleccionaron tres zonas del Golfo de Guayaquil para propósitos de este estudio: Recinto 6 de Julio, Reserva Ecológica Manglares Churute y Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado. En cada zona se colectaron 20 individuos. A partir de los marcadores generados por la técnica AFLP, utilizando siete juegos de iniciadores se calcularon valores de Heterocigocidad esperada, Diversidad genética total y el índice Fst; útiles para determinar variabilidad genética. Los valores Fst calculados fueron menores a 0.05, con un promedio de 0.0163, indicando poca variabilidad genética entre las poblaciones descritas.

Palabras Claves: AFLP, *Ucides occidentalis*, Variabilidad Genética.

Abstract

The red crab Ucides occidentalis is a representative specie of the mangrove fauna in Ecuadorian coast. In addition, this organism has commercial value and constitutes the sustenance for several fishermen families located in the Golfo de Guayaquil. However, we know few facts about the natural populations and the genetic riches of this specie. For this reason in this research a technique was standardized in order to use AFLP molecular markers for determination of genetic variability of U. occidentalis. Three zones of the Golfo de Guayaquil were selected for this investigation: Recinto 6 de Julio, Reserva Ecológica Manglares Churute y Reserva de Producción Faunística Manglares El Salado. In each zone were collected 20 individuals. Based on the molecular markers obtained for the AFLP technique, using seven primer pairs, it was possible to compute expected heterozygosity, total genetic diversity and the Fst index; which are useful to determinate genetic variability. The Fst values calculated were less than 0.05, with a mean of 0.0163, indicating little genetic variability between the analyzed populations.

1. Introducción

Los manglares son ecosistemas de alta productividad que alojan cientos de peces, moluscos y crustáceos; por ende desempeñan un papel fundamental en las pesquerías litorales de la plataforma continental [1]. Los Cangrejos son una de las especies ecológicamente más importantes de la fauna de los manglares. Éstos influyen en la estructura del bosque, su zonificación, dinámica de la hojarasca, productividad y ciclo de nutrientes [2].

El cangrejo rojo *Ucides occidentalis*, uno de los recursos más aprovechados de los manglares del Golfo de Guayaquil, se comercializa durante todo el año, excepto durante el tiempo de vedas, durante las etapas de reproducción y ecdisis [2]. Las medidas regulatorias que rigen actualmente fueron establecidas con base en estudios biológicos, sin embargo se necesita mayor investigación a nivel poblacional para sustentar las decisiones de manejo.

Con el fin de obtener datos preliminares sobre la genética de *U. occidentalis*, se decidió realizar este estudio usando una técnica molecular que fuera capaz de proveer información de utilidad para analizar poblaciones de importancia ecológica y comercial en el Golfo de Guayaquil. Así, se seleccionó la técnica AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados por sus siglas en inglés), la cual genera un gran número de marcadores moleculares [3], [4], [5] de tipo dominante; es de alta resolución, replicabilidad y no requiere de conocimiento previo de la secuencia genómica [6], [7], [8], [9], [10]. Los resultados de esta investigación pueden constituir una herramienta útil que podría generar alternativas para el manejo del recurso *U. occidentalis*.

2. Zonas de estudio

Se seleccionaron tres áreas de conservación que forman parte del Golfo de Guayaquil: Reserva Ecológica Manglares Churute (REMCH) con 55212Ha [1], Reserva de Producción Faunística Manglares de El Salado (RPFMS), con una extensión de 5309Ha [1] y el Recinto 6 de Julio que alberga 1763Ha de bosque de manglar [11].



Figura 1. Zonas de estudio
Fuente: Google Earth 2010

3. Cangrejo rojo *Ucides occidentalis*

El cangrejo rojo *U. occidentalis* es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Ocypodidae. *U. occidentalis* se caracteriza por la presencia de cámaras branquiales bien delimitadas las cuales albergan 5 branquias en cada una [1], [11], resultado de la adaptación a medios terrestres y periodos intermareales [12].

Sus características morfológicas comprenden un caparazón ovalado; las regiones branquiales hinchadas y fuertemente proyectadas a los lados; pedúnculo ocular robusto, casi vertical; quelípedos del macho extremadamente largos, algo asimétricos, con numerosos tubérculos y espinas; color del caparazón rojo grisáceo, con los márgenes laterales rojo-anaranjados; pereiópodos y gran parte de las pinzas de color rojo oscuro; región ventral café o blanca [13].

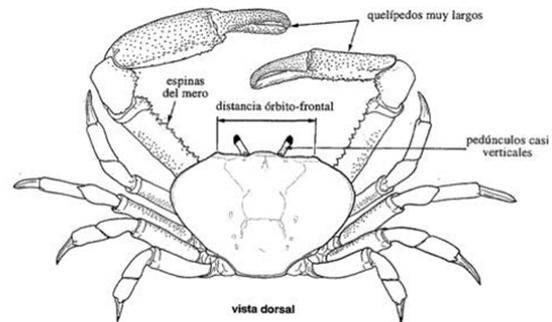


Figura 2. Cangrejo rojo *Ucides occidentalis*
Fuente: FAO, 2005

El exoesqueleto de *U. occidentalis* sufre un proceso de ecdisis cada año. Durante este período, el cangrejo se encierra en su madriguera hasta completar la muda de su caparazón. La ecdisis ocurre generalmente a fines del mes de junio o inicios de julio [12].

La fecundación sexual es interna; durante la cópula, el cangrejo macho transfiere los espermatozoides a la hembra mediante sus órganos copuladores. Para la cópula, las hembras sexualmente maduras son cortejadas por el macho, quien primero rodea a la hembra; luego de éste estímulo sexual, ambos se colocan de frente y se abrazan cruzando sus quelas sobre el cefalotórax. Después la hembra abre su abdomen y el macho procede a introducir sus pleópodos copulatorios en los orificios genitales de ella [1]. La época reproductiva se presenta durante los meses de enero y febrero de cada año [11].

Pese a que se ha estudiado mucho acerca de la biología de esta especie, se desconoce su genoma y transcriptoma. Estos hechos indican un total desconocimiento de genética de población de *U. occidentalis*.



3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)

El Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism o AFLP) es una técnica descrita en 1995 por Pieter Vos y sus colegas. Se basa en la detección de fragmentos de restricción amplificados selectivamente por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) que se originan de un genoma total de ADN digerido [9].

El análisis de AFLP parte de una muestra de ADN genómico, la cual puede ser extraída de los individuos mediante diversos métodos. Este ADN se digiere con un par de enzimas de restricción, usualmente *MseI* y *EcoRI*, las cuales son de corte frecuente y de corte poco frecuente respectivamente [8]. El corte frecuente genera pequeños fragmentos de ADN, los cuales tendrán una buena amplificación y son del tamaño óptimo para ser observados en geles desnaturalizantes. El corte poco frecuente tiene como finalidad reducir el número de fragmentos amplificados [9].

Para poder amplificar los fragmentos generados por las enzimas de restricción, se requiere del uso de adaptadores *MseI* y *EcoRI* que permita obtener una huella genética de ADN única para cada individuo [7], [9]. Estos adaptadores consisten en una molécula de ADN doble cadena que es complementaria a la que se consiguió luego de los cortes con *MseI* y con *EcoRI*. Además, poseen nucleótidos extra, los mismos que una vez ligados los adaptadores, destruyen el sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción. La ligación de los adaptadores comprende la incubación de los fragmentos digeridos con los dos adaptadores y con ADN ligasa [7].

El resultado de la ligación comprende los fragmentos de ADN genómico empareados entre los adaptadores *EcoRI* y *MseI* y sus secuencias únicas de ADN. Esta condición es ideal para que los iniciadores puedan hibridarse en la sección común para los fragmentos resultantes: la región correspondiente a los adaptadores. Debido a la necesidad de analizar los patrones de bandas para cada individuo, y siendo AFLP una técnica que genera muchas bandas, se añadió a los iniciadores tres nucleótidos en los extremos 3', lo cual permite que el ADN objetivo para la PCR sea una sección de los fragmentos de ADN genómico. [7], [9].

Las reacciones de amplificación se llevan a cabo en condiciones de alta selectividad [4], permitiendo sólo que se amplifiquen aquellos fragmentos que son perfectamente complementarios con las terminaciones 3' de los iniciadores. Para visualizar estos fragmentos, son separados en geles de electroforesis de alta resolución [7].

Los marcadores tipo AFLP han sido de gran utilidad en análisis de variación genética, particularmente en investigaciones de estructura poblacional y

diferenciación, incluyendo estimación de estadísticos *F* y variación genética dentro de poblaciones [5].

4. Materiales y Métodos

Se colectaron 90 individuos (30 en cada zona) por medio de pesca extractiva, los miembros de las cooperativas y asociaciones de cangrejeros se encargaron de esta tarea. Su traslado hasta el Laboratorio de Biología de la FIMCM-ESPOL se realizó mediante cajas agujereadas las cuales contuvieron los atados de cangrejo *U. occidentalis*.

4.1 Extracción de ADN

En primera instancia se recolectó la hemolinfa de cada individuo por medio de una punción con jeringuillas de 5ml previamente cargadas con Citrato de Sodio 10% pH 7.5. A continuación se centrifugó la mezcla durante 8 min a 1200 x g. El pellet obtenido se homogenizó nuevamente en de Citrato de Sodio al 10%, pH 7.5. Este paso fue realizado para incrementar el número de hemocitos al momento de la extracción y eliminar los posibles agentes inhibidores presentes en el suero de la hemolinfa.

La extracción de ADN se efectuó por medio del mini-kit de INVITROGEN™ PureLink™ Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA [14], mediante columnas de Sílice.

El lisado de hemocitos se realizó agregando los siguientes compuestos: Proteínasa K (20mg/ml), RNasa A (20mg/ml en Tris-HCl 50mM, pH 8.0 y EDTA 10mM) y PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer. La mezcla se incubó a 55°C por 10 minutos y se le añadió etanol absoluto.

Este lisado se trasladó a una columna de extracción con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 10000 x g durante 1min a temperatura ambiente. El líquido que quedó en el tubo colector fue descartado. Luego, fueron realizados dos lavados al ADN retenido en las columnas usando PureLink™ Genomic Wash Buffer 1 y 2. El líquido del tubo colector fue descartado.

Finalmente, la elución del ADN se llevó a cabo con el PureLink™ Genomic Elution Buffer, el cual se añadió a la columna de extracción con el ADN previamente adherido y lavado. Se centrifugó a ~26300 x g durante 1.5min. El eluido de ADN fue recuperado en un tubo de 1.5ml el cual fue almacenado a -20°C .

4.2 Protocolo Optimizado AFLP

Para cumplir con esta parte del proceso se utilizó el AFLP Analysis System I y AFLP Starter Primer Kit de INVITROGEN™. Fue necesario cuantificar el ADN extraído en cada muestra, para lo cual se utilizó el Thermo Scientific NanoDrop 2000.

A continuación, se procedió con la digestión del ADN genómico por enzimas de restricción, utilizando 5X Reaction Buffer (Tris-HCl 50mM pH 7.5, acetato de Mg 50mM y acetato de K 250mM), enzimas *EcoRI* y *MseI* (1.25U/μl de cada una) para 125ng de ADN. Esta mezcla se incubó durante 2h30 a 37°C. Luego, a 70°C durante 15min e inmediatamente se colocaron en hielo.

Posteriormente, se procedió a la ligación de los adaptadores, adicionando a la mezcla anterior Adapter Ligation Solution (adaptadores *EcoRI/MseI*, ATP 0.4mM, Tris-HCl 10mM, acetato de Mg 10mM y acetato de K 10mM) más T4 ADN Ligasa (1U/μl). Se dejó incubar por 2h00 a 20°C. Del volumen final se realizaron diluciones de 1:10.

El proceso de Preamplificación se efectuó utilizando: Preamplification Primer Mix (contiene los primers+1 y dNTPs), 10XPCR Buffer plus Mg, Platinum *Taq* Polymerase (5U/μl) y el ADN ligado y diluido del paso anterior. Esta reacción se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystem Veriti® 96-well con el siguiente programa:

Tabla 1. Pre-amplificación AFLP

Proceso	Temperatura/tiempo	# ciclos
Desnaturalización	94°C / 30 s	20
Hibridación	56°C / 60 s	
Elongación	72°C / 60 s	
Mantenimiento	4°C / ∞	-

Fuente: María Fernanda Ratti

El resultado de esta primera amplificación se diluyó en 1:50. A continuación se ejecutó la Amplificación Selectiva AFLP con los primers +3, utilizando dos soluciones de trabajo. La primera comprende iniciadores *EcoRI* y *MseI* (contiene dNTPs). La segunda estuvo compuesta de agua destilada, 10X PCR Buffer plus Mg y Platinum *Taq* Polymerase (5U/μl).

Finalmente, se mezclaron ambas soluciones y se adicionó el ADN ligado, preamplificado y diluido. A continuación se describe el programa de amplificación:

Tabla 2. Amplificación AFLP

Proceso	Temperatura/tiempo	# ciclos
Desnaturalización	94°C / 30 s	1
Hibridación	65°C / 30 s	
Elongación	72°C / 60 s	
Touchdown	Disminuir la temperatura 0.7° C cada ciclo	12
Desnaturalización	94°C / 30 s	23
Hibridación	56°C / 30 s	
Elongación	72°C / 60 s	
Mantenimiento	4°C / ∞	-

Fuente: María Fernanda Ratti

Luego de terminada la amplificación, los amplicones fueron sometidos a electroforesis para su

separación en geles de poliacrilamida al 6%, y revelados mediante tinción a la plata. Los geles se fotodocumentaron y las imágenes digitales se utilizaron para el análisis de datos.

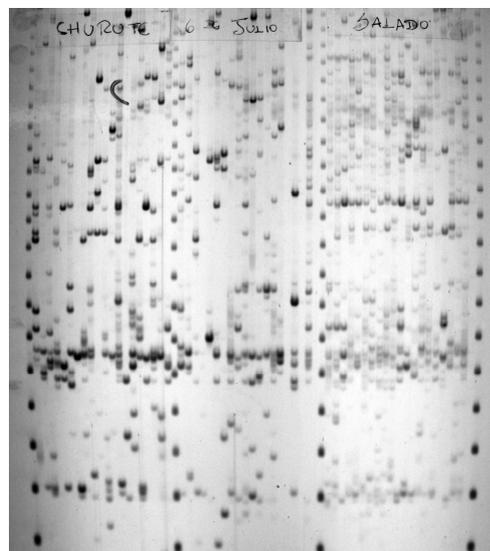


Figura 3. Gel de electroforesis de Poliacrilamida 6%
Fuente: María Fernanda Ratti

4.3 Análisis de Datos

Las imágenes digitales se analizaron en el programa Gene Profiler 4.0.5 [15]. El programa es capaz de detectar bandas del mismo tamaño entre las distintas muestras analizadas bajo un rango de tolerancia dado. El rango de tolerancia utilizado en este trabajo fue de 0.4. Bajo estas condiciones, la presencia o ausencia de bandas de igual tamaño entre las distintas líneas fueron identificadas por el software. A partir de esta información, Gene Profiler 4.0.5 generó bases de datos de Ausencia/Presencia (tablas en binario donde 0 significa ausencia y 1 es presencia de banda).

Las tablas de Ausencia/Presencia se usaron posteriormente para el análisis de variabilidad genética por medio del software AFLPsurv 1.0, los resultados se generaron en archivos .txt [16].

5. Resultados y Discusión

La optimización del Sistema AFLP incluyó la concentración de hemocitos por medio de centrifugación para asegurar una extracción de ADN que evite la degradación y elimine la mayoría de sustancias inhibitoras de PCR. Además, el proceso AFLP fue posible porque la concentración de ADN fue apropiada. Se realizaron varios ensayos para corroborar este hecho, finalmente se trabajó con 125ng, una concentración menor a la recomendada por la casa comercial INVITROGEN™ pero suficiente para visualizar los amplicones en los geles de Poliacrilamida

al 6%. Además, la cantidad de reactivos fue ajustada de tal manera que se reducen costos y se aumenta la cantidad de muestras que pueden procesarse con un kit. Fue posible utilizar la mitad de los volúmenes sugeridos y obtener los resultados esperados.

Se utilizaron siete juegos de iniciadores de entre las 64 combinaciones posibles con el kit, con el fin de obtener los perfiles de cada individuo y poder compararlos para determinar variabilidad genética. La selección de iniciadores se basó en la resolución de los amplicones obtenidos, en la cantidad de información generada y en la definición de bandas de similar longitud entre las muestras.

La comparación de los amplicones en el software GeneProfiler 4.0.5 generó las tablas de Ausencia/Presencia, la base para los análisis con AFLPsurv 1.0. Los archivos .txt obtenidos por este último programa, muestra varias tablas que constan de diferentes datos. La Tabla 3 muestra un ejemplo de los resultados de AFLPsurv 1.0 para el juego de iniciadores E-AGG/M-CAT (primers+3 de INVITROGEN™)

Tabla 3 Resultados obtenidos con AFLPsurv 1.0

Datos de Poblaciones					
Población	n	#loci	#loci Pol.	Proporción Loci Pol.	Hj
Churute	19	62	27	43.5	0.0863
6 de Julio	17	62	25	40.3	0.0950
Salado	20	62	36	58.1	0.1358
Diversidad Genética dentro de poblaciones					
n			Hw		
3			0.1057		
Estructura Genética poblacional					
n	Ht	Hw		Fst	
3	0.1075	0.1057		0.0163	
Test de permutación sobre Fst					
Estadístico			Fst		
Observado			0.0163		
Limite inferior 95%			-0.0081		
Limite superior 95%			0.0060		

Fuente: Investigación realizada

Los datos de heterocigocidad (Hw, Hj, Ht) son útiles para calcular los valores Fst, los cuales indican el nivel de variabilidad entre las poblaciones descritas. En este estudio, el valor medio entre los Fst calculados con los siete pares de iniciadores fue de 0.0163, indicando poca variabilidad según los estándares de Wright (creador de los índices F para estudios de genética de poblaciones) [17]. Las pruebas de permutación indican que los resultados para 5 de los 7 juegos de iniciadores utilizados, son significativos. Por tanto, estos resultados preliminares de la variabilidad genética en *U. occidentalis* muestra que la principal causa de variación es la deriva genética. La migración como fuerza evolutiva parece no influir significativamente sobre esta especie.

Se ha considerado el valor de Fst como referente de la variación existente entre poblaciones, y la sustracción de este valor de 1,0 como la variación dentro de la población. Por tanto, si las poblaciones tienen un Fst promedio de 0.0163, (1.63%), se puede aseverar que los restantes 0.9836 (98.36%) corresponden a la variación dentro de las poblaciones. Este resultado intrapoblacional es indicador de condiciones genéticamente saludables.

6. Conclusiones

La técnica AFLP es factible para establecer variabilidad genética en *U. occidentalis*, el sistema fue estandarizado y capaz de detectar polimorfismos en las muestras utilizadas.

Se determinó poca variabilidad genética en *U. occidentalis* acorde a los Fst calculados (<0.05) entre las poblaciones de estudio. La variación se encuentra primordialmente dentro de las poblaciones descritas, indicando que son genéticamente saludables. El esfuerzo de pesca al que está sometida esta especie principalmente en la zona de 6 de Julio no ha alterado significativamente las frecuencias alélicas de las poblaciones de *U. occidentalis*.

El nivel de variabilidad genética calculado corresponde a un proceso de deriva genética, no se ha comprobado que otras fuerzas evolutivas influyan sobre la salud genética de *U. occidentalis* en las zonas estudiadas.

7. Agradecimientos

Los autores agradecen al PhD. c Franklin Pérez por su colaboración en el análisis de los resultados y al Dr. Peter Chedraui por facilitar sus instalaciones del Instituto de Biomedicina de la UCSG para realizar la fase de optimización del protocolo AFLP.

8. Referencias

- [1] ECOLAP y MAE, 2007. *Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador*. ECOFUND, FAN, DarwinNet, IGM. Quito, Ecuador.
- [2] Solano F, 2007. *Aspectos biológicos y socioeconómicos de la captura de cangrejo rojo *Ucides occidentalis* en los manglares del Ecuador*. Instituto Nacional de Pesca, Investigación de recursos bioacuáticos y su ambiente. Disponible en la web en www.inp.gov.ec
- [3] Eguiarte L, Souza V, Aguirre X, 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. Mexico. Págs.: 541-557.
- [4] Montaña K, Villalpando E, Vargas-Albores F, 2006. *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en Acuicultura*. Interciencia. Vol. 31, pp. 563-569.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



- [5] Mueller U, Wolfenbarger L, 1999. *AFLP genotyping and fingerprinting*. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 14, pp. 389-394.
- [6] Rogers D, 2006. *What is a genetic marker? Why do we care about genetics* Vol. 5. Genetic Resources Conservation Program. University of California. USA
- [7] Chial H., 2008. *DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphism (AFLP): No genome sequence required*. Nature Education.
- [8] Vuylsteke M, Pelerman J, Eijk M, 2007. *AFLP technology for DNA fingerprinting*. Protocol. Nature Publishing Group.
- [9] Vos, P, Hogers, R, Bleeker, M, Reijans, M, van de Lee, T, Hornes, M, Frijters, A, Pot, J, Peleman, J, Kuiper, M. 1995. *AFLP: A new technique for DNA fingerprinting*. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- [10] Robinson J, Harris S, 1999. *Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: a phylogenetic perspective*. En: *E.M. Gillet (ed), Which DNA marker for which purpose?* Final Compendium of the Research Project Development, Optimisation and Validation of Molecular Tools for Assessment of Biodiversity in Forest Trees in the European Union.
- [11] Villón C, Chalén X, Molina R, González J, Castro F, 2004. *Manejo sustentable del recurso cangrejo rojo *Ucides occidentalis* en la zona de manglar concesionada a la Asociación de cangrejeros 6 de julio*. Fundación Ecológica Rescate Jambelí.
- [12] Tazán G De. y Pozo M., 2001. *Análisis de las pesquerías de *Ucides occidentalis* Ortmann y su manejo sostenible en la Reserva Ecológica Manglares Churute*. Tesis de grado previa a la obtención del título de Magister Scientiae en Manejo de Recursos Naturales. Universidad Agraria del Ecuador. Guayaquil, Ecuador.
- [13] FAO, 1995. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca Pacífico Centro Oriental Vol 1: Plantas e Invertebrados*. Roma, FAO.
- [14] INVITROGEN™, 2007. *PureLink™ Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA*. Catalog no. K1820-01. User manual. INVITROGEN Corporations, USA.
- [15] Scanalytics Inc. *Gene Profiler 4.0.5* software.
- [16] Vekemans X, 2002. *AFLPsurv 1.0*. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- [17] Hartl D, Clark A, 1997. *Principles of population genetics*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Canada. Pags.: 111-119.