

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Amplificación al azar del ADN de 5 poblaciones cubanas de peces larvívoros del género *Rivulus*

Lic. Aymé Fernández-Calienes,<sup>1</sup> Ing. Natividad Hernández<sup>2</sup> y Lic. Jorge Fraga<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se amplificó al azar el ADN de 10 individuos de 5 poblaciones de *Rivulus* colectados en la región occidental de Cuba. De la amplificación, empleando 5 cebadores, no resultó ningún marcador monomórfico, lo que evidenció una alta variabilidad genética entre los peces de las 5 poblaciones. Según la distancia genética entre los individuos, se forman 4 grupos, para cada uno de los cuales aparecen marcadores genéticos de RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) que son específicos, porque no se evidencian en el resto de los individuos. Estos resultados apoyan la utilización del RAPD como una herramienta eficiente para la caracterización genética de peces cubanos del género *Rivulus*.

DeCS: PECES/genética; ADN; MARCADORES GENETICOS; MORDEDURAS Y PICADURAS DE INSECTOS/prevención & control; CONTROL DE MOSQUITOS.

La lucha biológica contra los mosquitos tiene cada día mayor importancia debido al interés en el mundo por reducir al máximo el uso de los insecticidas químicos, para lograr de este modo contribuir a la protección del medio ambiente. Los peces larvívoros constituyen una opción muy eficaz para controlar esas temibles plagas, causantes cada año de la muerte de cientos de personas. Actualmente la tendencia para aplicar este método está encaminada a utilizar la diversidad de la fauna íctica de cada país, según convenga, para evitar las introducciones que tanto daño causan en los ecosistemas. El uso adecuado de los peces larvívoros para el control de los mosquitos requiere, por lo tanto, entre otros aspectos no menos importantes, que se conozcan las especies en cuestión.

Al género *Rivulus* pertenecen especies de gran importancia científica y práctica como lo

es *R. marmoratus*, Poey 1880, que por ser un vertebrado partenogenético, capaz de autofecundarse y producir clones idénticos<sup>1</sup> resulta muy útil en diversos estudios biológicos. En Cuba, se encuentran en este género especies de gran interés para el control de las larvas de mosquitos, las cuales no solo son importantes por la capacidad que tienen para mantener sus huevos sin eclosionar hasta que las condiciones del medio lo permitan,<sup>2</sup> acercándose de esta forma a la biología de algunas especies de mosquitos, sino también por la facultad para devorar las larvas de culícidos que habitan en agua salobre<sup>3</sup> o adheridos a las raíces de plantas acuáticas, como es el caso de la *Mansonia titillans*.<sup>4</sup>

A pesar de la importancia que poseen las especies de *Rivulus* que se han descrito en Cuba, una de las cuales es endémica,<sup>5</sup> su posición sistemática es bastante controvertida (datos no

<sup>1</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>2</sup> Ingeniera Pecuaria. Investigadora Auxiliar.

<sup>3</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

publicados). Pocas veces se han utilizado las técnicas moleculares para dilucidar los problemas sistemáticos de las poblaciones de peces larvívoros de Cuba, hasta el momento solo se conocen los trabajos de polimorfismo bioquímico en *Rivulus* y en *Cubanichtis* realizados por Hernández y otros.<sup>6</sup>

Actualmente, se cuenta con métodos moleculares que permiten complementar los estudios ecológicos y sistemáticos tradicionales, antes de llegar a resultados concluyentes. La técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) provee un método sensible y muy eficaz de obtener marcadores genéticos, aplicables a organismos muy diferentes y capaz de detectar diferencias entre individuos que muestran una relación genética estrecha.<sup>7</sup> El análisis del RAPD no requiere conocimiento previo sobre la secuencia del ADN de las muestras a analizar. Además, se ha demostrado que la información provista por los polimorfos del RAPD es consistente con aquella obtenida por medio de otras técnicas moleculares.<sup>8</sup> Todas estas propiedades hacen del RAPD una técnica muy atractiva para estudios de variabilidad genética en poblaciones. En este trabajo se demostró la factibilidad del uso del RAPD para caracterizar genéticamente poblaciones de peces cubanos del género *Rivulus*.

## MÉTODOS

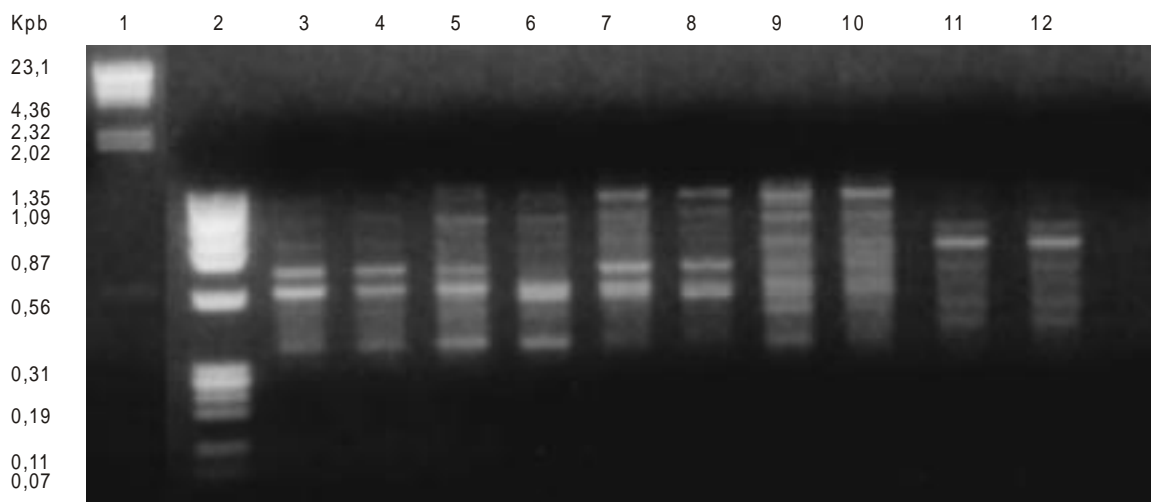
Se analizaron en total 10 individuos, una hembra y un macho de cada una de las 4 poblaciones de *Rivulus* colectados en la región occidental de Cuba: *Rivulus sp.* de Pinar de Río; *R. cylindraceus*, Poey 1861, de Parque Lenin, Ciudad de La Habana; *R. cylindraceus* de Batabanó, La Habana y *R. insulaepinorum*, de la Cruz 1870, procedente de la Isla de la Juventud y 2 individuos de la población hermafrodita de *R. marmoratus*, Poey 1880, de Guanabo en Ciudad de La Habana.

A los peces colectados se le aisló el ADN genómico total de una porción de músculo de la región dorsal del cuerpo, cada individuo fue homogeneizado de forma manual en 300  $\mu$ L de tampón de lisis (20 mM tris-HCl pH 8,25, 25 mM EDTA, 25 mM NaCl, 1 % SDS). La suspensión se incubó con 100  $\mu$ g/mL de proteinasa K

(*Boehringer Mannheim*) durante 2 h a 56 °C. Los ácidos nucleicos se extrajeron con fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) como primer paso y solo con cloroformo-álcool isoamílico (24:1) en el segundo. El ADN se precipitó a en presencia de 2 volúmenes de etanol absoluto que contenían acetato de sodio 3 M. El sedimento se disolvió en 50  $\mu$ L de tampón TE (1 mM tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0). El ARN se eliminó con RNasa H (*Boehringer Mannheim*). La integridad del ADN obtenido se examinó por electroforesis en gel de agarosa (0,8 % en tampón TBE (0,045 M tris-borato; 0,001 M EDTA) que contenían bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y utilizando un transiluminador UV (macrovue 2011, LKB) para su visualización. La concentración de ADN se estimó espectrofotométricamente mediante la medición de su absorbancia a 260 nm.

Para la amplificación del ADN se utilizaron 5 cebadores (OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, y OPA-6) del Kit A, *Operon Technologies Inc*, California, EE. UU. Luego de optimizar las concentraciones de los reactivos (datos no mostrados), la amplificación se desarrolló en un volumen final de 25  $\mu$ L que contenían 2,5  $\mu$ L de tampón (100 mM tris-HCl pH 8,3; 15 mM MgCl<sub>2</sub> 500 mM KCl; 0,01 % de gelatina) (*Boehringer Mannheim*), 25 pmol del cebador, 2,0 U de Taq ADN polimerasa (*Boehringer Mannheim*) y 20 ng de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) consistió de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min seguido por 45 repeticiones de: 1 min a 94 °C, 1 min a 36 °C y 2 min a 72 °C. En el ciclo final, el paso de extensión a 72 °C fue de 15 min. Los productos de la RCP se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1,2 %) en tampón TBE que contenía 0,5 mg/mL de bromuro de etidio y visualizado mediante el transiluminador UV. Las reacciones del RAPD se analizaron 2 veces para cada cebador, y así, verificar la reproducibilidad de la técnica. El análisis del polimorfismo se realizó clasificando las bandas como presentes (1) o ausentes (0) para cada individuo y el inverso del coeficiente de similitud de Jaccard (Sj, modificado por Sneath, 1957)<sup>9</sup> se calculó de la manera siguiente:  $S_j = 1 - a / (a + b + c)$  donde a representa el número de bandas compartidas, b el número de bandas presentes y c



1: patrón de peso molecular de ADN II, *Boehringer Mannheim* (0,563-23,1 kbp); 2: patrón de peso molecular de ADN IX, *Boehringer Mannheim* (0,072-1,35 kbp). 3 y 4: hembra y macho de Parque Lenin (*R. cylindraceus*); 5 y 6: hembra y macho de Isla de la Juventud; (*R. insulaepinorum*); 7 y 8: hembra y macho de Pinar del Río (*Rivulus sp*); 9 y 10: hembra y macho de Batabanó (*R. cylindraceus*); 11 y 12: individuos de Guanabo (*R. marmoratus*).

**Fig. 1.** Electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio de los productos de amplificación del RAPD con el cebador OPA-3.

las ausentes. Los dendogramas se obtuvieron con un método de análisis no pareado de media aritmética (UPGMA), con el empleo de un paquete de software SYNTAX 5.0 (Ponadi, 1993).<sup>10</sup>

## RESULTADOS

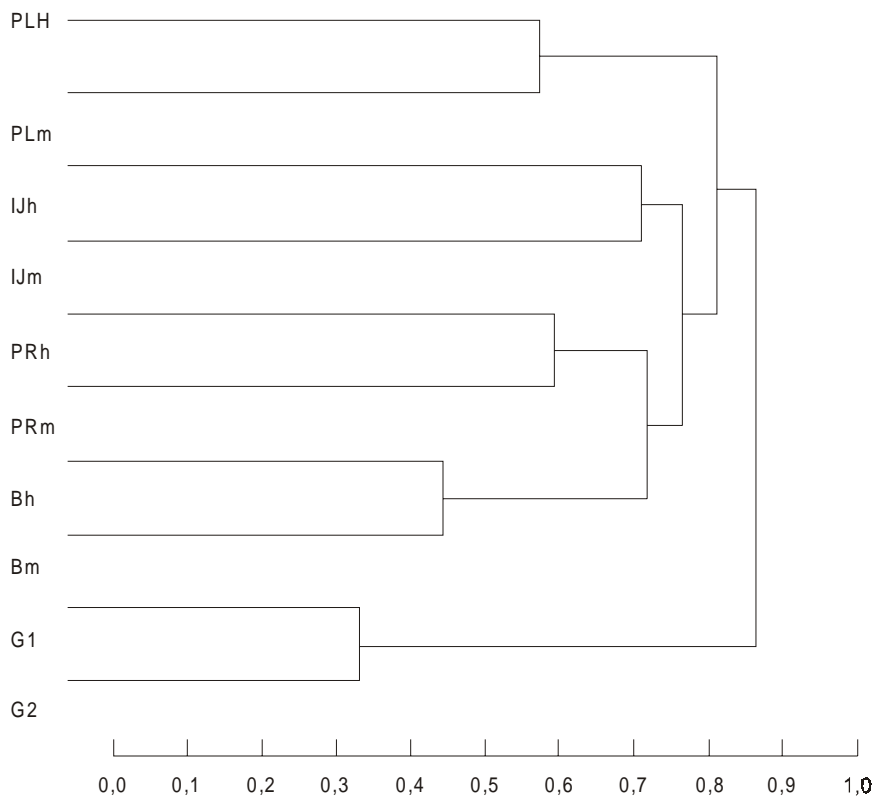
De la amplificación del ADN de los peces con los 5 cebadores se obtuvieron 128 bandas (22,2 kbp-180 bp), no encontrándose ningún marcador monomórfico y demostrando una alta variabilidad genética entre los individuos de las 5 poblaciones. En la figura 1 se representa el patrón de amplificación con el cebador OPA-3.

El dendograma de la figura 2, obtenido a partir del patrón de bandas generados al analizar los 5 cebadores, muestra que según la distancia genética entre los individuos se forman 4 grupos que incluyen a los peces, los cuales representan las 5 poblaciones. El grupo I contiene los individuos de la población de Parque Lenin (*R. cylindraceus*), el grupo II a los individuos de la población de la Isla de la Juventud (*R. insulaepinorum*), el grupo III comprende a los individuos de las poblaciones de Batabanó (*R. cylindraceus*) y Pinar del Río (*Rivulus sp*) y el grupo IV a los individuos de la población de Guanabo (*R. marmoratus*). Para

cada uno de los grupos aparecen marcadores genéticos de RAPD que son específicos pues no se evidencian en el resto de los individuos (tabla).

**TABLA.** Marcadores genéticos hallados a partir de la electroforesis, de los productos de amplificación de ADN de 10 individuos del género *Rivulus*, procedentes de la región occidental del país. Grupo I, Parque Lenin (*R. cylindraceus*); Grupo II, individuos de la población de la Isla de la Juventud (*R. insulaepinorum*); Grupo III, Batabanó (*R. cylindraceus*) y Pinar del Río (*Rivulus sp*) y el Grupo IV, individuos de la población de Guanabo (*R. marmoratus*)

Grupo	Marcador genético	Cebador
I	1 227 pb	OPA-3
	254 pb	OPA-4
II	1 854 pb	OPA-2
	1 253 pb	OPA-2
III	1 196 pb	OPA-2
	239 pb	OPA-4
IV	259 pb	OPA-1
	847 pb	OPA-2
	428 pb	OPA-2
	353 pb	OPA-2
	1 398 pb	OPA-3
	426 pb	OPA-3
	584 pb	OPA-4
	1 547 pb	OPA-6
447 pb	OPA-6	



PL: Parque Lenin; IJ: Isla de la Juventud; PR: Pinar del Río; B: Batabanó y G: Guanabo (h, representa a las hembras; m, a los machos).

**Fig. 2.** Dendrograma del análisis computarizado de las bandas obtenidas de la amplificación (RAPD) de 10 individuos del género *Rivulus* procedentes de la región occidental del país.

## DISCUSIÓN

Los representantes de Guanabo forman un grupo independiente, y son los que menores diferencias muestran entre sí, resultado este esperado debido a las características genéticas que poseen.<sup>3</sup> De acuerdo con las escalas de Jaccard, la mayor distancia parece encontrarse entre hembras y machos de la Isla de la Juventud (fig. 2). Esos peces forman un grupo separado de los individuos de la Isla de Cuba, posiblemente beneficiado por el aislamiento al que han sido sometidos y cuyo proceso de especiación aún no ha concluido. Por su parte, los peces de Parque Lenin, Batabanó y Pinar del Río forman 2 grupos (fig. 2), por lo que resulta interesante la cercanía genética encontrada entre los individuos de las 2 últimas poblaciones, cercanas también geográficamente, así como las significativas diferencias halladas entre los individuos de las 2 poblaciones de *R. cylindraceus*. La relación genética entre estas y otras poblaciones cubanas de peces larvívoros deberá ser estimada en el futuro mediante esta técnica, con el empleo de un número mayor de individuos.

Los resultados de este trabajo apoyan la utilización del RAPD como una herramienta eficiente para la caracterización genética de peces cubanos del género *Rivulus*, al ser capaz de detectar diferencias intraespecie e interespecie.

## SUMMARY

DNA from 10 individuals from 5 populations of *Rivulus* collected in the western region of Cuba was amplified at random. No monomorphic marker resulted from the amplification by using 5 primers, which showed the high genetic variability existing among the fishes of the 5 populations. According to the genetic distance among the individuals, they were divided into 4 groups, for which there are specific genetic markers of RAPD, since they are not observed in the rest of the subjects. These results support the use of RAPD as an efficient tool for the genetic characterization of Cuban fishes of the *Rivulus* genus.

**Subject headings:** FISHES/ genetics; DNA; GENETIC MARKERS; INSECT BITES AND STINGS/ prevention & control; MOSQUITO CONTROL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harrington RW, Kallman KD. The homozygosity of clones of the self-fertilizing hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* Poey (Cyprinodontidae, Atheriniformes). *Am Nat* 1968;102(926):337-43.

2. Koldenkova L, García I. Nota sobre la resistencia a la desecación de los huevos de *R. cylindraceus*, Poey, 1960. *Misc Zool* 1987;29(4).
  3. Hernández N, Díaz M. Datos para la conservación de *Rivulus marmoratus*. IV CAMP (Conservation Assessment Management Plan) 2000 Vol.4.
  4. Hernández N, García I, Alonso N, Cárdenas A, Verovides V. Data on *Mansonia titillans* (Walker, 1948) (Diptera culicidae) oviposition on the plant *Spirodella polirhiza* (L) in Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47(3):161-6.
  5. Cruz J de la, Dubitsky AM. Dos nuevas especies de peces dulceacuícolas del género *Rivulus*, Poey (Cyprinodontidae) de Cuba e Isla de Pinos. *Poeyana, Inst. Zool. ACC* 1976;155:6.
  6. Hernández N, Rivalta V, García I, Camacho A. Marcadores genéticos bioquímicos en el estudio del pez larvívoro *C. cubensis* (Eigenmann, 1903). *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(1):53-7.
  7. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5.
  8. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random- primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1335-9.
  9. Sneath PHA. Some thoughts on bacterial classification. *J Gen Microbiol* 1957;7:201-26.
  10. Ponadi J. SYN-TAX. Computer programs from multivariate data analysis in ecology and systematics. Version 5.0. User's guide 1993. Scientific publishing, Budapest, Hungary.
- Recibido: 30 de enero de 2003. Aprobado: 29 de mayo de 2003.  
Lic. *Aymé Fernández-Caliènes*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: [ciipk@ipk.sld.cu](mailto:ciipk@ipk.sld.cu)