

## Identificación genética y análisis filogenético de cíclidos del estado de Tamaulipas mediante la secuenciación del Citocromo B mitocondrial

### Genetic identification and phylogenetic analysis of cichlids from the state of Tamaulipas by mitochondrial Cytochrome B gene sequencing

Keila Azucena Cepeda-Corona<sup>1</sup> ,  
Gaspar Manuel Parra-  
Bracamonte<sup>2\*</sup> ,  
Isidro Otoniel Montelongo-Alfaro<sup>1</sup> ,  
Ana María Sifuentes-Rincón<sup>2</sup> ,  
Lucero Arely Hernández-Gudiño<sup>2</sup> ,  
Xochitl Fabiola De la Rosa-Reyna<sup>2</sup> ,  
Ana Laura Lara-Rivera<sup>3</sup> ,  
Williams Arellano-Vera<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Tecnológica del Mar Tamaulipas Bicentenario. Carretera Estatal N° 52, Soto La Marina - La Pesca, Km. 46+400, SN, 87678, La Pesca, Soto la Marina, Tamaulipas, México.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional-Centro de Biotecnología Genómica. Boulevard del Maestro SN, Esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, CP. 88710. Reynosa, Tamaulipas, México.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba SN, cruz con Av. Masnuerl L. Barragán, CP. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

\* Autor de correspondencia: [gparra@ipn.mx](mailto:gparra@ipn.mx)

#### Nota científica

Recibida: 03 de marzo de 2020

Aceptada: 16 de octubre 2020

**Como citar:** Cepeda-Corona KA, Parra-Bracamonte GM, Montelongo-Alfaro IO, Sifuentes-Rincón AM, Hernández-Gudiño LA, De la Rosa-Reyna XF, Lara-Rivera AL, Arellano-Vera W (2020) Identificación genética y análisis filogenético de cíclidos del estado de Tamaulipas mediante la secuenciación del Citocromo B mitocondrial. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(3): e2512. DOI: 10.19136/era.a7n3.2512

**RESUMEN.** El objetivo del presente estudio fue verificar genéticamente la identidad de especies del género *Herichthys* y estudiar su relación filogenética utilizando secuencias de citocromo B mitocondrial. Se incluyeron muestras de dos sitios de Tamaulipas de dicha especie: en el río Panal ubicado en Playa Tepehuajes, Soto la Marina y en el río Carrizal ubicado en Aldama. Se analizaron las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo B con herramientas bioinformáticas, los resultados de similitud genética indican que las muestras de Aldama tienen mayor similitud (> 99%) con la especie *Herichthys carpintis*. Mientras que las muestras de Tepehuajes, confirmaron la identidad supuesta con *Herichthys cyanoguttatus*. Los árboles filogenéticos analizados con la finalidad de comparar la distancia genética de las muestras con diferentes especies de cíclidos, confirmaron la similitud encontrada previamente. Los resultados sugieren que el citocromo B es un marcador útil en la identificación de especies de cíclidos de Tamaulipas.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, *Herichthys carpintis*, *Herichthys cyanoguttatus*, Secuenciación génica, Similitud genética.

**ABSTRACT.** The aim of the present work was to perform a genetic verification of *Herichthys* species and assess their phylogenetic relationship by Cytochrome B gene resequencing in two sampling sites from Tamaulipas. Samples from Panal river in Playa Tepehuajes, Soto la Marina and samples from Carrizal river in Aldama were included. The complete sequences were analyzed with bioinformatics tools and the genetic similarity showed that Aldama samples resembled *Herichthys carpintis* species (> 99%) and Tepehuajes samples were confirmed as *Herichthys cyanoguttatus*. The assessed phylogenetic trees for genetic distance comparison among current samples and other cichlids species support the previously found results. This study suggest that cytochrome B gene is useful for genetic identification of cichlid species, such as from Tamaulipas.

**Key words:** Gene sequencing, Genetic similitude, *Herichthys carpintis*, *Herichthys cyanoguttatus*, Mitochondrial DNA.

## INTRODUCCIÓN

En México, la familia *Cichlidae* constituye el segundo grupo de peces dulceacuícolas más diverso (Miller et al. 2005). La diversidad de las especies de cíclidos del género *Herichthys* que se distribuye al norte es pobremente conocida, sobre la distribución geográfica y morfología de las especies alopatricas, la evidencia molecular sostiene que el género está conformado por dos clados monofiléticos importantes *H. labridens* y *H. cyanoguttatus* (Pérez-Miranda et al. 2018). Dentro del grupo de *H. labridens* se incluyen las especies *H. bartoni*, *H. labridens*, *H. steindachneri*, *H. pame*, y *H. pantostictus* (Taylor y Miller 1983); y dentro del grupo de *H. cyanoguttatus* se han incluido la especie que le brinda la denominación (*H. cyanoguttatus*, Baird y Girard 1854), las especies *H. carpintis* (Jordan y Snyder 1899), *H. minckleyi* y *H. tamasopoensis* (Artigas-Azas 1998, 2005); *H. tepehua* (De la Maza-Benignos et al. 2015) y *H. deppii* (Heckel 1840). Para el estado de Tamaulipas, se ha reportado la presencia de *H. cyanoguttatus*, *H. carpintis*, *H. pantostictus* (Hulsey et al. 2004, Pérez-Miranda et al. 2018).

La importancia de estas especies reside en la pesca deportiva, recreativa y de subsistencia. En particular, *H. cyanoguttatus* conocida como Mojarra Copetona o Guapota. Aunque las especies del grupo *Herichthys* se encuentran mundialmente en la categoría de menor preocupación de acuerdo a la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2019). Para el estado de Tamaulipas, se ha sugerido que debido a su popularidad en la pesca recreativa y de subsistencia, su población se ha reducido considerablemente, razón por la cual se han establecido programas de repoblamiento (Aguilar 2018).

Debido a que los programas de repoblamiento se basan en capturas de organismos vivos de regiones nativas en las que se observan ejemplares requeridos, es necesario identificar y confirmar la especie de estos organismos, sobre todo cuando se trata de especies de evolución simpátrica. Pero la identificación temprana es complicada, debido a la falta de desarrollo en las claves taxonómicas uti-

lizadas y a su utilidad predominantemente en ejemplares adultos (Pérez-Miranda et al. 2018). Algunos métodos moleculares se han sugerido para sobrellevar la dificultad de identificación, entre ellos las utilizadas para estudios de diversidad genética como el Citocromo B mitocondrial (Farias et al. 2001, Hulsey et al. 2004, Pérez-Miranda et al. 2018) y el gen de la Citocromo Oxidasa I mitocondrial o variaciones genes nucleares (S7i, ddRAD, Pérez-Miranda et al. 2018). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente especies dentro del género *Herichthys* en dos sitios de Tamaulipas corroborar su agrupamiento filogenético utilizando la secuenciación del CitB.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen y procesamiento de muestras

Se colectaron 20 muestras de aleta caudal, presuntivamente de *H. cyanoguttatus* del río Panal ubicado en las coordenadas 23° 30' 05.4" LN y 97° 46' 37.4" LO, en Tepehuajes, Soto la Marina, Tamaulipas; y 10 muestras del Río Carrizal ubicado en las coordenadas 23° 09' 45.9" LN y 97° 56' 46.0" LO, en Nuevo Progreso, Aldama, Tamaulipas. Los organismos del primer sitio corresponden al programa de repoblación de la Universidad Tecnológica del Mar Tamaulipas Bicentenario, y los del segundo sitio fueron regresados a vida libre después de la colecta. Ambos, correspondieron a estadios juveniles, de los que se extrajo el ADN de las muestras utilizando el kit de extracción Promega Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega).

### Diseño de secuenciación

Considerando la secuencia de referencia (No. de acceso. AY323983.1) de la especie *H. cyanoguttatus* reportada por Hulsey et al. (2004), se diseñó en el Software Primer Select de DNASTar (Lasergene) el par de iniciadores Forward: 5'ATGGCCAGCCTCCGAAAAAC y Reverse: 5'GTGGGAAGTAAGATAAGGAAGATA, que es específico para amplificar 1.2 Kb del gen citocromo B mitocondrial.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, utilizando 50 ng de ADN genómico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.05  $\mu$ M de cada iniciador y 1U Taq polimerasa (Promega). La PCR se llevó a cabo en el termociclador MJ Research bajo el siguiente perfil de temperaturas: un ciclo a 95°C por 5 min; cinco ciclos a (95 °C por 45 s; 62°C por 45 s; disminución de 2°C cada ciclo y 72 °C por 45s); 30 ciclos a (95 °C por 45 s; 55 por 45 s y 72 °C por 45s) y una incubación final a 72 °C por 5 min. Se verificó la amplificación de ADN mitocondrial mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que se visualizó en un fotodocumentador de luz UV y el ADN se cuantificó en el sistema Kodak Digital Science v 5.0 (Eastman Kodak Company).

### Secuenciación

Previo a la secuenciación, los fragmentos de PCR se purificaron utilizando el protocolo de ExoSAP-it (Thermo-Fisher Scientific, Whaltam). Los productos purificados se secuenciaron con los mismos iniciadores de amplificación y utilizando el protocolo del estuche comercial BigDye® Terminator. La secuenciación de las muestras procesadas se realizó mediante el secuenciador automático ABI-3130 (Applied Biosystems). Posteriormente se verificó la calidad e identidad de las secuencias obtenidas utilizando el programa Chromas lite versión 2.1.1. Todas las secuencias obtenidas tuvieron en promedio 1 058 pares de bases, lo que corresponde a una cobertura de alrededor de 95% de la secuencia de referencia.

### Análisis bioinformático

Las secuencias del CitB se cambiaron al formato FASTA y se verificaron mediante un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI (Altschul *et al.* 1990). Posteriormente, se realizó el alineamiento múltiple entre las secuencias estudiadas y la secuencia de referencia (No. de acceso. AY323983.1) de *Herichthys cyanoguttatus*, y complementariamente se incluyeron 72 secuencias de CitB de diferentes especies de cíclidos estudiadas por Hulsey *et al.* (2004). La estructura de los árboles se consideró como cri-

terio de verificación de las especies encontradas y corroborar el agrupamiento filogenético de las especies identificadas. La longitud de las secuencias analizadas fueron de 724 nucleótidos, incluyendo regiones conservadas del CitB, para inferir la filogenia del grupo se usó el método Neighbor Joining basado en distancia genética con un modelo de sustitución Jukes-Cantor y un bootstrap de 1 000 submuestras. Los análisis se realizaron en el software MAFFT ver 7.471 (Rozewicki *et al.* 2019).

Complementariamente, se realizó un análisis de inferencia de la historia evolutiva usando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei 1993). El árbol de consenso bootstrap inferido con 1 000 réplicas (Felsenstein 1985) representa la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein 1985). Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de bootstrap se colapsan. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1 000 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein 1985). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour Joining y BioNJ a una matriz de distancias pareadas estimadas usando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. El análisis incluyó 79 secuencias de nucleótidos que incluyen 16 diferentes especies de cíclidos (Hulsey *et al.* 2004). Los análisis y el árbol de consenso se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró la resecuenciación exitosa del gen CitB mitocondrial en muestras de dos sitios del estado de Tamaulipas. El análisis de BLAST de acuerdo a las similitudes de las secuencias disponibles en el GenBank, reveló que las muestras del río Panal en Playa Tepehuajes pertenecen *H. cyanoguttatus* con un promedio de porcentaje de identidad de 97%. Por otra parte, las muestras correspondientes al río Carrizales en Aldama fueron

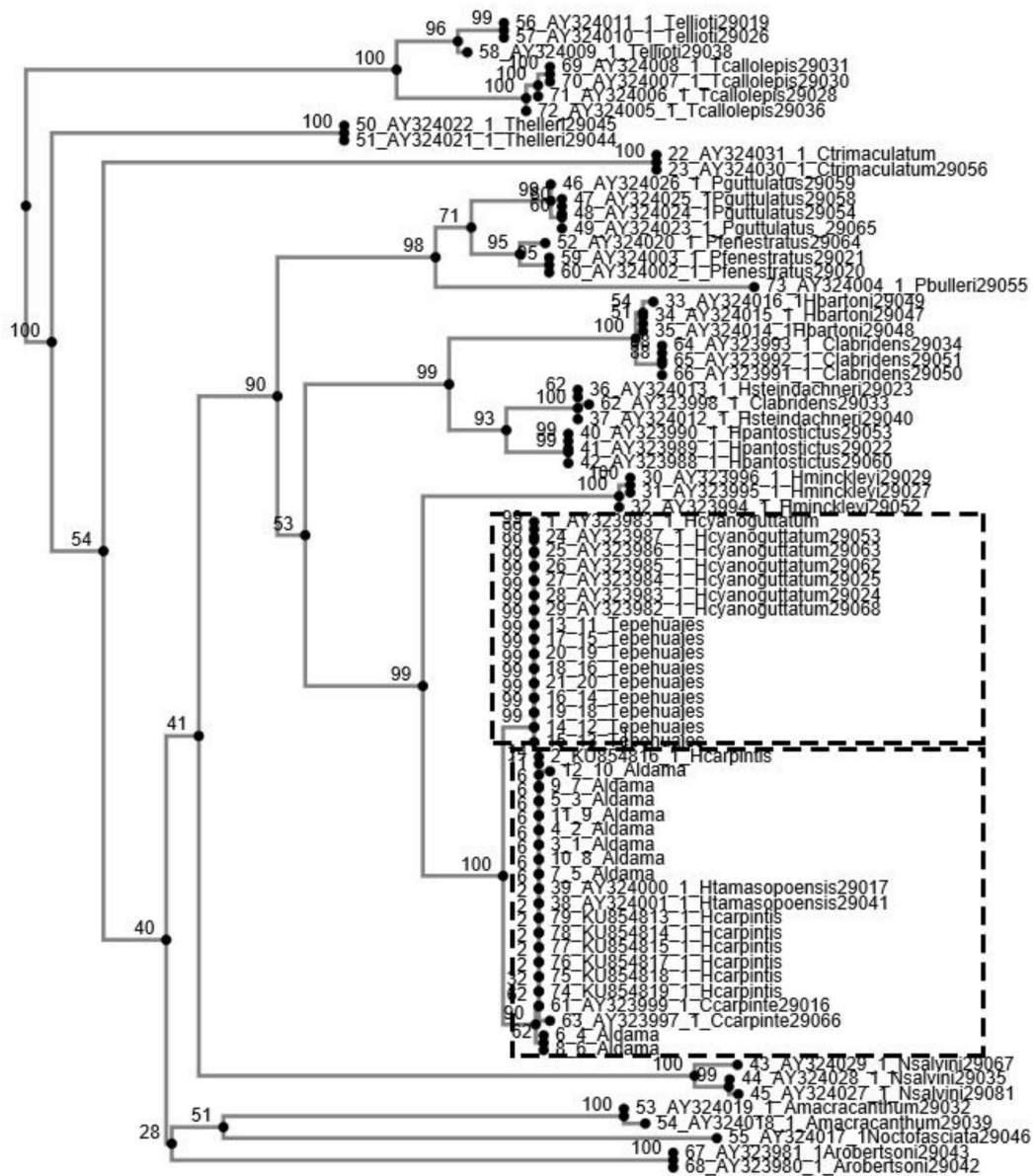


Figura 1. Árbol filogenético considerando las regiones conservadas mediante Neighbor Joining de diferentes especies de cíclidos americanos utilizando el gen Citocromo B mitocondrial.

identificadas como *H. carpintis*, con un promedio de identidad del 99%.

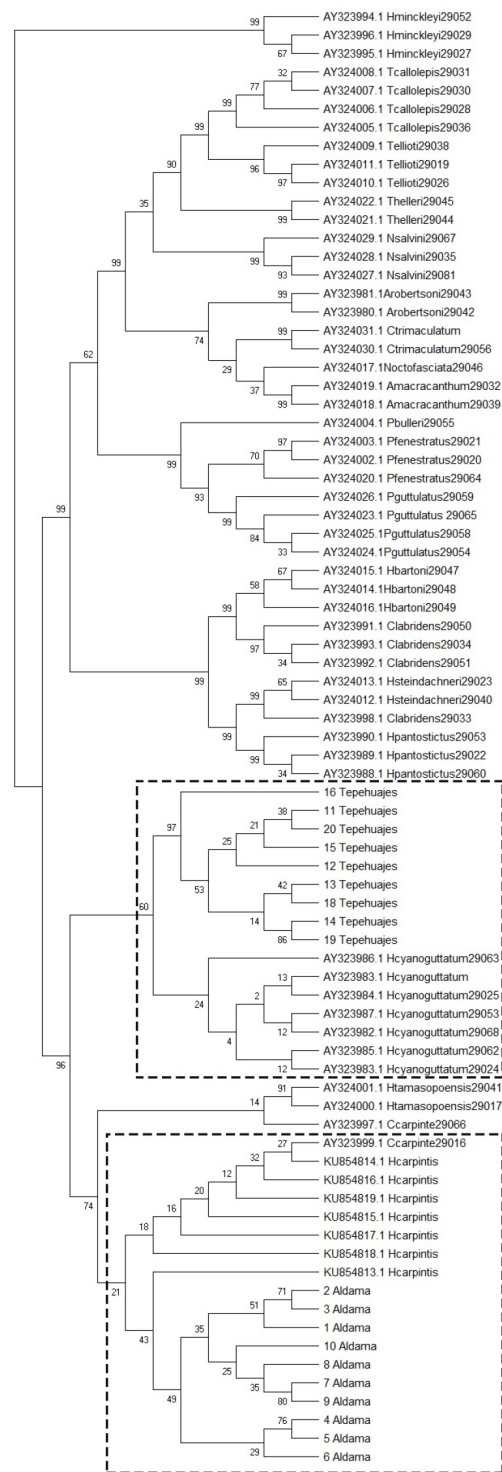
En la Figura 1, se muestra el árbol filogenético considerando las regiones conservadas mediante Neighbor Joining de diferentes especies de cíclidos incluyendo las muestras analizadas en el presente estudio. En particular se observa que existe

una importante relación filogenética entre las muestras estudiadas (Figura 1); sin embargo, las muestras de Tepehuajes se agrupa primordialmente con *H. cyanoguttatus*, y las de Aldama como un clado parafilético estrecho con *H. carpintis* y *H. tama-sopoensis* con quienes comparten el clado más específico. Por su parte, el árbol consenso de inferencia

evolutiva (Figura 2), muestra dos clados monofiléticos aislados de *H. minckleyi*, de los cuales, en el plano inferior, se observan dos subdivisiones parafiléticas de las muestras estudiadas, correspondientes al clado de *H. carpintis* y las muestras de Aldama, compartiendo el clado *H. tamasopoensis*, y en la parte superior el clado de *H. cyanoguttatus*, compartida con las muestras de Tepehuajes.

Aunque se han observado algunas limitaciones en peces Neotropicales como las del género *Herichthys*, el gen mitocondrial *CitB* es ampliamente utilizado en estudios sistemáticos para resolver divergencias a diferentes niveles taxonómicos (Farias *et al.* 2001), también ha sido propuesto para la identificación genética de especies de peces en productos de pescado (Pepe *et al.* 2005) y particularmente utilizado para inferir relaciones filogenéticas en diferentes especies, entre ellas cíclidos americanos (Lydeard y Roe 1997, Martin y Bermingham 1998, Hulsey *et al.* 2004, Pérez-Miranda *et al.* 2018).

Se observó que los análisis filogenético y de consenso evolutivo fueron efectivos para identificar la relación genética entre las especies estudiadas. De manera general, se observó una correspondencia entre las muestras del sitio Tepehuajes y *H. cyanoguttatus*, y las muestras de Aldama con *H. carpintis*. Adicionalmente, los patrones de agrupamiento de acuerdo a sus distancias genéticas identificadas corresponden a los sugeridos por Pérez-Miranda *et al.* (2018) quienes lograron encontrar patrones filogenéticos confiables al utilizar las secuencias de *CitB*, comparados con los resultados de COI y confirmaron los dos clados monofiléticos entre los grupos de *H. cyanoguttatus* y *H. labridens*. De la misma manera, los árboles estimados son similares a los reportados por Hulsey *et al.* (2004). Un hallazgo interesante fue el patrón filogenético estrecho entre *H. carpintis* y *H. tamasopoensis*, similar al encontrado por Pérez-Miranda *et al.* (2018) quienes reportan patrones filogenéticos entre *H. carpintis* y *H. tamasopoensis* que sugieren la posibilidad de hibridación entre las especies, e incluso entre especies de cíclidos de los diferentes grupos monofiléticos.



**Figura 2:** Árbol consenso de inferencia evolutiva de diferentes especies de cíclidos americanos utilizando el gen Citocromo B mitocondrial.

El estudio permitió identificar de forma efectiva una especie no esperada en el muestreo de los dos sitios en los que presumiblemente solo se encontraría la especie *H. cyanoguttatus*. Dada la evidencia que sugiere que *H. cyanoguttatus* y *H. carpintis* posiblemente se hibriden en secciones de la cuenca del río Soto la Marina (Miller *et al.* 2005), los estudios de caracterización genética de las especies presentes en las cuencas del estado de Tamaulipas son necesarios. El hecho de que se estén realizando proyectos de repoblamiento enfocados a la especie conocida como Mojarra Copetona o Guapota a presas y cuerpos de agua del estado de Tamaulipas (Aguilar 2018), realza la importancia de su caracterización para discriminar entre especies simpátricas que tienen características morfológicas similares que solamente pueden ser diferenciadas mediante códigos taxonómicos en estadios adultos. También se desconoce la tasa de extracción de estas especies, pero se sabe que son especies de alto valor

para las poblaciones locales tanto para uso recreacional o de subsistencia. Realizar más estudios de las especies de cíclidos de la región ayudaría a comprender mejor su distribución y evitar la introducción de otras especies que pudieran afectar la historia evolutiva de las especies nativas. De la misma manera el uso de otros marcadores moleculares ayudaría a confirmar la posible hibridación de especies.

A pesar de que la mayoría de los estudios de identificación genética hacen referencia al uso del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI o COX), el presente estudio sugiere que el CitB es efectivo para la identificación y discriminación entre especies del género *Herichthys*, específicamente entre *H. cyanoguttatus* y *H. carpintis*. La combinación de CitB y otros marcadores moleculares incluyendo la caracterización morfológica podrían ayudar a caracterizar posibles polimorfismos y divergencias entre las especies estudiadas y otras nativas de cuencas cercanas.

#### LITERATURA CITADA

- Aguilar TMF (2018) Crece acuacultura en Tamaulipas. Panorama Acuícola Magazine. <https://panoramaacuicola.com/2018/10/26/crece-acuacultura-en-tamaulipas/>. Fecha de consulta: 29 de enero de 2020.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Artigas-Azas JM (1998) *Herichthys minckleyi*, part 1. *Buntbarsche Bulletin* 185: 16-21.
- Artigas-Azas JM (2005) La Mojarra de Tamasopo. *Herichthys tamasopoensis*. *Cichlid News Magazine* 15: 18-25.
- Baird S, Girard C (1854) Description of new species of fishes collected by John H. Clark on the V.S. and Mexican boundary survey, and in Texas, by Captain Stewart Vliet. *Proceedings of Academy Natural Sciences Philadelphia* 7: 24-29
- De la Maza-Benignos M, Ornelas-García CP, de Lourdes Lozano-Vilano M, García-Ramírez ME, Doadrio I (2015) Phylogeographic analysis of genus *Herichthys* (Perciformes: Cichlidae), with descriptions of *Nosferatu* new genus and *H. tepehua* n. sp. *Hydrobiologia* 748: 201-231.
- Farias IP, Ortí G, Sampaio I, Schneider H, Meyer A (2001) The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53: 89-103.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Heckel JJ (1840) Johann natterer's neue flussfische Brasiliens nach den Beobachtungen und Mittheilungen des Entdeckers beschrieben (Erste Abtheilung, Die Labroiden). *Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte* 2: 325-471.

- Hulseley CD, de León FJG, Johnson YS, Hendrickson DA, Near TJ (2004) Temporal diversification of Mesoamerican cichlid fishes across a major biogeographic boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 754-764
- IUCN (2019) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>. Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2019.
- Jordan DS, Snyder JO (1899) Notes on a collection of fishes from the rivers of Mexico, with description of twenty new species. *Bulletin of the US Fish Commission* 19: 115-147.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Lydeard C, Roe KJ (1997) The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. *Molecular Systematics of Fishes* 1: 285-303.
- Martin AP, Bermingham E (1998) Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 192-203.
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM (2005) *Freshwater fishes of Mexico*. Chicago and London: Museum of Zoology, University of Chicago Press. USA. 490p.
- Pepe T, Trotta M, Di Marco I, Cennamo P, Anastasio A, Cortesi ML (2005) Mitochondrial cytochrome b DNA sequence variations: an approach to fish species identification in processed fish products. *Journal of Food Protection* 68: 421-425.
- Pérez-Miranda F, Mejía O, Soto-Galera E, Espinosa-Pérez H, Piálek L, Říčan O (2018) Phylogeny and species diversity of the genus *Herichthys* (Teleostei: Cichlidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56: 223-247.
- Rozewicki J, Li S, Amada KM, Standley DM, Katoh K (2019) MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Research*. 47: W5-W10.
- Tamura K, Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Taylor JN, Miller RR (1983) Cichlid fishes (genus *Cichlasoma*) of the Río Pánuco basin, eastern Mexico, with description of a new species. *Occasional papers of the Museum of Natural History, the University of Kansas* 104: 1-24.