

# Diversidad de nematodos marinos de Chile continental y antártico: una evaluación morfológica y molecular

Diversity of marine nematodes from Continental and Antarctic Chile:  
A morphological and molecular assessment

Natalia Valderrama-Aravena<sup>1</sup>, Karla Pérez-Araneda<sup>1</sup>, Jorge Avaria-Llautureo<sup>2</sup>,  
Cristián E. Hernández<sup>2</sup>, Matthew Lee<sup>3</sup> y Antonio Brante<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile. [abrante@ucsc.cl](mailto:abrante@ucsc.cl)

<sup>2</sup>Laboratorio de Ecología Evolutiva y Filoinformática, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile

<sup>3</sup>Centro i-mar, Universidad de Los Lagos, Camino a Chiquihue km.6, Puerto Montt, Chile

**Abstract.** Free-living nematodes are an important component of the marine benthos. In Chile there have been few studies on this group, and the majority has focused on the morphological aspect only. In this study, ribosomal 18S RNA and mitochondrial COI genes were used as genetic markers to complement morphological analyses to study the continental and Antarctic Chilean marine nematofauna. Different protocols for fixing, extracting and amplifying DNA were also tested. Not all the possible combinations produced good results. In fact, only the 18S gene showed consistently results. Phylogenetic analyses showed some discordance between classical taxonomy (*i.e.*, based on morphology) and molecular data. These results suggest that taxonomic classification using integrative approaches including morphological characteristics and molecular information is needed to study the diversity and evolution of this complex group.

**Key words:** Meiofauna, COI, 18S, nematode

---

## INTRODUCCIÓN

Los nematodos de vida libre son uno de los grupos de invertebrados más diversos del mundo y componente importante en los ecosistemas bentónicos marinos, desempeñando un papel fundamental en los procesos de descomposición y reciclado de nutrientes (Creer *et al.* 2010), siendo reconocidos por su potencial como bioindicadores (Bhadury *et al.* 2008). En sistemas marinos, es uno de los grupos más abundante y diverso dentro de la meiofauna distribuyéndose desde el supralitoral hasta las profundidades abisales del océano (Platt *et al.* 1984). En Chile, los nematodos marinos han sido escasamente estudiados. Hasta la fecha, se han reconocido un poco más de 300 especies, mayoritariamente de la zona intermareal de la costa continental (Lee *et al.* 2008).

Una de las principales limitaciones del estudio de los nematodos, es la estimación de su real riqueza y diversidad de especies debido a que su reducido tamaño, alta similitud y complejidad morfológica dificultan su reconocimiento taxonómico (Pereira *et al.* 2010).

Durante la última década, los marcadores moleculares han sido utilizado como una herramienta complementaria

para el estudio de la diversidad intra y interespecífica en diferentes grupos taxonómicos (*e.g.*, Hebert *et al.* 2003, Hebert & Gregory 2005, Bucklin *et al.* 2011). En particular, el código de barras de ADN ha impulsado estudios ecológicos de la biodiversidad en ambientes acuáticos y terrestres (Valentini *et al.* 2009), así como la investigación sobre la sistemática de organismos marinos utilizando criterios filogenéticos moleculares (Canales-Aguirre *et al.* 2011). De esta forma, el uso de marcadores moleculares se convierte en una herramienta práctica y eficiente para el estudio de la diversidad y evolución de nematodos marinos, permitiendo implementar una aproximación taxonómica integrada, utilizando información de rasgos morfológicos y moleculares (Bhadury *et al.* 2006a, b, Grant & Linse 2009).

El gen ribosomal 18S del ARN y la región de Folmer (Folmer *et al.* 1994) del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) han sido ampliamente utilizados como códigos de barra genéticos en invertebrados marinos en general (*e.g.*, Blankenship & Yayanos 2005, Costa *et al.* 2007). En el grupo de los nematodos de vida libre, ambos

genes han sido utilizados, aunque los genes ribosomales han presentado mayor éxito (*e.g.*, Bhadury *et al.* 2006a, Derycke *et al.* 2010). Sin embargo, los protocolos de fijación, extracción y amplificación del ADN presentan gran variabilidad en su grado de éxito, por lo que ciertas metodologías y análisis deben ajustarse de acuerdo al grupo taxonómico en estudio. En el caso de los nematodos marinos, el reducido tamaño de los individuos dificulta la extracción y éxito de amplificación del ADN. Adicionalmente, los protocolos de extracción de ADN utilizados tradicionalmente conllevan largos tiempos de procesamiento (*e.g.*, Floyd *et al.* 2002, Bhadury *et al.* 2006a). Los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar un protocolo simple y de reducido tiempo que permita la fijación de las muestras, así como la extracción y amplificación de su ADN; y evaluar el uso de los genes 18S y COI como potenciales marcadores genéticos útiles para el estudio de la diversidad molecular y taxonomía de especies de nematodos marinos de vida libre, provenientes de la costa centro-sur de Chile continental y del intermareal en la Antártica chilena.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SITIO DE MUESTREO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los especímenes de nematodos fueron obtenidos a partir de muestras de sedimento provenientes de la zona intermareal de Iquique (20°14'S; 70°8'O), Las Cruces (34°35'S; 72°2'O), Caleta Lengua (36°45'S; 73°9'O), Desembocadura del río Biobío (36°48'S; 73°10'O), Calfuco (39°46'S; 73°23'O) y Carelmapu (41°45'S; 73°44'O). En la Antártica se muestrearon los sitios de Elefantera (62°11'S; 58°59'O) y Escudero (62°11'S; 58°57'O) ubicados en la Isla Rey Jorge, Islas Shetland del Sur. Los muestreos se llevaron a cabo entre marzo 2011 y abril 2012. Algunas muestras fueron fijadas en etanol absoluto el cual presenta gran efectividad para conservar el ADN, pero que sin embargo afecta negativamente la morfología de los nematodos, dificultando su posterior caracterización morfológica. De esta forma, un segundo grupo de muestras fueron fijadas en solución DESS (DMSO/EDTA/saturated NaCl solution; Seutin *et al.* 1991). El DESS, además de conservar el ADN, en muchos casos ha mostrado éxito en mantener las características morfológicas de los individuos, lo que permite realizar los análisis genéticos sobre los mismos individuos que se realizó la caracterización morfológica y clasificación taxonómica (Yoder *et al.* 2006). Dado que se utiliza todo el organismo para los análisis genéticos, las muestras fueron

previamente transportadas a los laboratorios del Centro i~mar, de la Universidad de los Lagos para su clasificación taxonómica mediante caracteres morfológicos y posterior etiquetado. La identificación taxonómica se realizó bajo microscopio (Olympus® BX51 con DIC) según los criterios utilizados por Wieser (1953, 1954, 1956) y las claves de Platt & Warwick (1983, 1988) and Warwick *et al.* (1998). En la mayoría de los casos sólo se logró llegar hasta el nivel de género (Tabla 1).

Una vez clasificados morfológicamente, los individuos fueron trasladados a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para realizar los análisis genéticos. Los especímenes provenientes de la Desembocadura del río Biobío, dada la cercanía al laboratorio, fueron adicionalmente identificados taxonómicamente y su ADN fue extraído en fresco, para compararlos con las muestras fijadas. Por lo general, se utilizaron 3 individuos por género por cada tratamiento de almacenamiento (etanol absoluto, DESS y en fresco) para ensayar diferentes protocolos de extracción y amplificación en los genes 18S y COI. Finalmente, con los protocolos que resultaron amplificaciones positivas, se secuenciaron un total de 53 individuos de las especies más representativas de nematodos continentales y antárticos encontrados en sus respectivas muestras.

### EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando 4 protocolos distintos: (1) Modificación al método de Floyd *et al.* (2002), (2) protocolo de Higuchi (1989), (3) protocolo modificado de Higuchi (1989) y (4) kit comercial de extracción (Kit EZNA® Tissue DNA Omega Biotek®). Para el primero, se utilizó HCl 1M, Tris-HCl 0.5M (pH 8.0) y Triton® X-100 e incubación en frío por 8-9 h a -20°C. Posteriormente se incubaron por 12 h a 60°C, calentados por 3 min a 99°C y luego enfriados a temperatura ambiente. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 16000 g por 30 s. El protocolo de Higuchi consistió en 100 µl de Buffer de Higuchi y 5 µl de proteinasa K (10 mg ml<sup>-1</sup>) con una incubación de 4 h a 60°C, seguido de 15 min a 94°C. El protocolo modificado de Higuchi (1989) consistió de 25 µl de Buffer de Higuchi y 1,25 µl de proteinasa K (25 mg ml<sup>-1</sup>) incubando por 60 min a 65°C, seguido de 15 min a 94°C. Para la fabricación del buffer de Higuchi se utilizó KCl 0.5M, Tris (pH 8.0) 1M, MgCl<sub>2</sub> 0.5M, Nonidit P40, Tween 20, Gelatin y agua destilada autoclavada. Se incubó por 60 min a 65°C seguido de 15 min a 94°C (Denovan *et al.* 1999). Los protocolos se aplicaron en nematodos almacenados en DESS, etanol absoluto y en fresco (Desembocadura del