



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. Leyla Cárdenas T.

Instituto de Ciencias Ambientales y
Evolutivas
Facultad de Ciencias.

Profesor Co-Patrocinante

Dra. Isabel Valdivia

Instituto de Ciencias Ambientales y
Evolutivas
Facultad Ciencias.

**CARACTERIZACIÓN POR TAXONOMÍA MOLECULAR DE
NEMATODOS QUE PARASITAN TRES ESPECIES DE PECES
DE LA ANTÁRTICA.**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

DANYELA SIMONETTE ARCE LIZAMA

VALDIVIA – CHILE

2017

Dedicado a:

1. Siempre has sido mi fortaleza y mi tristeza, te prometí hace 5 años que por los dos alcanzaría este logro, fuiste un apoyo incondicional, aunque estés en el cielo cuidándome, te dedico este logro mi pequeño Amigo. Eres mi luz y quien me salvo de la oscuridad.

Yhans Días Gaetes.

2. Una familia siempre es el apoyo incondicional, la fortaleza oculta, aquellos que darían todo por ti, son los primeros en cada paso y los primeros en hacerte quien eres en esta vida.

Familia Arce Lizama.

Agradecimientos.

Para comenzar, quiero agradecer al proyecto InaCh RT 22-14, por el financiamiento entregado para el desarrollo de esta tesis.

En segundo lugar agradecerle a mi querida profesora guía Dra. Leyla Cárdenas, por brindarme la confianza y el apoyo, desde el primer taller de investigación hasta el desarrollo de esta tesis, por creer en mi capacidades, por su disposición de siempre enseñar. Agradecer afectuosamente a la Dra. Isabel Valdivia por el apoyo que me brindo durante el desarrollo de este trabajo, por su disposición a enseñar.

Agradecer a mi familia, quienes siempre creyeron en mí, que apoyaron cuando decidí abandonar la seguridad del hogar, en búsqueda de una nueva aventura a más de 1900 km, que hoy se traduce a un nuevo logro alcanzado. Agradecerles a mi madre Margarita y mi padre Julian por su apoyo y su preocupación, a mis hermanas Simonette y Jislem por estar ahí cuando siempre lo necesito, por escucharme y centrarme de repente, a mi lela porque ha sido testigo de mis logros, a mis tíos y primos que siempre han estado presente. Quiero también agradecerle a mis dos amigas Daniela y Yorka, conocidas en este proceso que llame universidad, por su apoyo y confianza.

Por ultimo quiero agradecer a mi viejo, porque parte de quien soy yo se lo debo a él, la confianza y la determinación de acabar mis sueños, él me la enseñó, fui su primera nieta en entrar a una universidad y me hubiera gustado que me viera titulada, pero sé que estarás orgulloso de verme acabar esto, gracias tata por creer en mí.

GRACIAS.

Índice general

Índice Figuras	III
Índice Tablas	IV
Abreviaturas.	V
1. Resumen.	1
1.1 Summary	2
2. Introducción.	3
2.1 Generalidades del phylum nematoda.	3
2.2 Nematodos Anisakis.	6
2.2.1 Genero <i>Anisakis</i> .	9
2.2.2 Genero <i>Pseudoterranova</i> .	10
2.2.3 Genero <i>Contraecaecum</i> .	10
2.3 Antártica.	11
2.4 Marcadores moleculares en parásitos.	16
3. Hipótesis.	23
4. Objetivo general.	23
5. Objetivos específicos.	23

6. Materiales y métodos	24
6.1 Muestreo y recolección de muestra.	24
6.2 Microcopia electrónica.	24
6.3 Extracción de ADN.	25
6.4 Amplificación de ADN por PCR	25
6.5 Edición y ensamblaje de secuencias	28
6.6 Delimitación de especies.	28
6.6.1 Reconstrucción filogenética	28
6.6.2 Gap Discovery	29
6.6.3 Red de haplotipos	30
7. Resultados.	31
7.1 Resultado taxonomía clásica.	31
7.2 Resultados taxonomía molecular.	34
8. Discusión.	43
8.1 Ciclo de vida.	46
8.2 Conclusión.	49
9. Bibliografía.	50

Índice Figuras.

Figura 1. Morfología general del Phylum nematoda	5
Figura 2. Ciclo de vida de la familia Anisakidae	7
Figura 3. Imagen de microcopia electrónica (ME) de <i>Pseudoterranova sp</i>	32
Figura 4. Imagen de microcopia electrónica (ME) de <i>Anisakis sp.</i>	33
Figura 5. Reconstrucción filogenética basada en el gen <i>ssu</i>	39
Figura 6. Reconstrucción filogenética basada en el marcador ITS	41
Figura 7. Red de haplotipos para nematodos que parasitan peces antárticos utilizando gen mitocondrial <i>cox2</i> .	42
Figura 8. Representación esquemática de propuesta de ciclo de vida de nematodos <i>Pseudoterranova sp.</i> y <i>Anisakis sp.</i> encontrado en este estudio.	48

Índice Tablas.

Tabla I. Nematodos que parasitan pinnipedios Antárticos. Las letras D, E se refieren a especies descritas en la Antártica.	14
Tabla II. Nematodos que parasitan peces Antárticos.	15
Tabla III. Estadística de publicaciones encontradas en la web of Science, utilizando las palabras claves; nematodos, parasito, genetica, Antártica.	18
Tabla IV. Set de partidores, para estudio genético de nematodos.	26
Tabla V. Resumen de secuencias de nematodos obtenidas desde los tres hospedadores antárticos, para cada marcador en estudio.	35
Tabla VI. Lista de especies obtenidas desde Genbank, que son usadas para comparación en análisis filogenéticos y alineamientos.	36
Tabla VII. Modelos evolutivos obtenidos desde el programa Mega v6, para la reconstrucción filogenética.	37

Abreviaturas

AFA: Alcohol; formaldehído y ácido acético.

ARNr: ARN ribosomal.

cox1: Citocromo oxidasa subunidad 1.

cox2: Citocromo oxidasa subunidad 2.

FPA: Frente Polar Antártico.

gADN: ADN genómico.

Hd: Diversidad haplotípica.

ITS: Espaciador Transcrito Interno.

lsu: Large subunit of ribosomal (subunidad mayor del ribosoma).

mtADN: ADN mitocondrial.

Ne: tamaño efectivo de la población.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ssu: small subunit of ribosomal (subunidad menor del ribosoma).

1. Resumen

La toxonía de los nematodos se ha realizado principalmente por taxonomía tradicional (es decir, utilizando caracteres morfológicos), pero la gran similitud entre las especies llevado a una mala identificación. Para resolver este problema, en los últimos 20 años se ha vuelto importante el uso de taxonomía molecular para la correcta identificación de este phylum. En la Antártida, la familia de Anasikidae se reportado parasitando a miembros de la superfamilia pinnipedia (lobos marinos y focas) como huésped definitivo. El objetivo de este trabajo, es determinar mediante herramientas moleculares, si los nemátodos encontrados en tres especies de peces (*Notothenia rossi*, *N. coriiceps* y *Harpargifer antarcticus*) corresponden a la misma especie. Para ello, se colectaron ejemplares desde las zonas geográficas de Bahía Fildes (Islas Shetland del Sur) y Rada Covadonga (Península Antártica) para el análisis parasitológico. Los parásitos se caracterizaron morfológicamente usando microcopia electrónica y genéticamente usando 3 loci de marcadores genéticos (gen *ssu*, *cox-2* e ITS). Las reconstrucciones filogenéticas y el análisis del Gap Discovery (ABGD) demostraron que los tres peces antárticos están parasitados por las mismas especies de nematodos identificadas como *Pseudoterranova sp.* y *Anisakis simplex C.*

1.1 Abstract.

The taxonomy of nematodes has been performed mainly by traditional taxonomy (i.e. using morphological characters), but the great similarity among species leads to poor identification conclusions. To resolve this issue, in the last 20 years the use of molecular taxonomy for the correct identification of this phylum has been increased. In Antarctica, the Anisakidae family is mainly reported parasitizing members of pinnipedia (sea lions and seals) as definitive host. The aim of this work, using molecular tools, is to determine if the nematodes parasites founded in three species of fish (*Notothenia rossi*, *N. coriiceps* and *Harpagifer antarcticus*) correspond to the same species. For this, host specimens were collected from Bahia Fildes (South Shetland Islands) and Rada Covadonga (Antarctic Peninsula) to parasitological analysis. Parasites were collected and characterized using electron micrographs and genetically using 3 loci of genetic markers (*ssu* gene, *cox-2* and ITS). Phylogenetic reconstructions and Gap Discovery (ABGD) analysis showed that the three Antarctic fishes are parasitized by the same nematodes species identified as *Pseudoterranova* sp. and *Anisakis simplex* C.

2. Introducción.

2.1 Generalidades del phylum nematoda.

El phylum Nematoda es biológicamente diverso incluye parásitos tanto de plantas y animales, como taxa de vida libres (Wasmuth *et al.*, 2008). Son miembros ubicuos de la meiofauna y juegan un rol central en el reciclaje de nutrientes. Se han descrito aproximadamente 256 familia y más de cuarenta mil especies (Rohde *et al.*, 2005)

El phylum nematoda se encuentra ampliamente distribuido como parásito en diversos peces (Montiel *et al.*, 1997). En general los nematodos se caracterizan por tener un cuerpo cilíndrico alargado, el cual está cubierto por una cutícula quitinosa, la que puede estar estriada u ornamentada, esta cutícula puede ser generada por el mismo nematodo para defenderse en ambientes hostiles o también puede ser producida por el hospedador (Poinar Jr *et al.*, 1983; Montiel *et al.*, 1997).

Su sistema digestivo es simple en donde en el extremo anterior se encuentra la boca, la cual puede encontrarse provista de dientes, placas cortantes, lancetas entre otros elementos que le permitan al nematodo poder lacerar tejidos y de esta manera obtener su alimento (Poinar Jr. *et al.*, 1983). La boca se continúa con el esófago muscular, esta continuación varía según distintas especies de nematodos por lo que esta variación permite realizar una clasificación taxonómica dentro de las distintas especies, esta estructura continua al intestino que se abre cerca del extremo posterior del cuerpo.

Este phylum se caracteriza por tener sexos separados, siendo común que el macho sea más pequeño con respecto a la hembra, este fenómeno se conoce como

dimorfismo sexual (Poinar Jr *et al.*, 1983). Los machos poseen testículo, espermaducto, vesícula seminal y un conducto eyaculador muscular el cual desemboca en la cloaca en conjunto al ano (Poinar Jr *et al.*, 1983; Montiel *et al.*, 1997), además algunos poseen una espícula que le sirve para sostener a la hembra durante la copulación, está varía dentro de las distintas especies, por lo que es un rasgo morfológico de interés para la clasificación taxonómica del grupo. Las hembras poseen entre uno o dos ovarios, oviducto, entre 1 a 4 útero que se continua con la vagina la cual finalmente desemboca al exterior mediante las vulvas localizadas en diferentes zonas del cuerpo, esto dependerá al orden al que pertenezca (Poinar Jr *et al.*, 1983). Su sistema nervioso es centralizado, el cual está formado por un anillo nervioso, ubicado alrededor del esófago y cuatro cordones nerviosos, dos hacia el extremo anterior y dos hacia el extremo posterior (Montiel *et al.*, 1997; Poinar Jr *et al.*, 1983). El sistema excretor está conformado por dos cordones que se encuentran longitudinalmente en el cuerpo del parásito, estos desembocan al poro excretor ubicado al nivel del anillo nervioso (Poinar Jr *et al.*, 1983). La morfología general de un nematodo se presenta en la Figura 1.

Con respecto a su ciclo de vida, los nematodos poseen un ciclo de vida directo o monoxenico, en el cual utilizan un único hospedador para el desarrollo, no obstante otros poseen un ciclo biológico indirecto o heteroxénico en donde ocupan hospedadores intermediarios, para el desarrollo de la larva infectiva para el hospedador definitivo (Poinar Jr *et al.*, 1983).

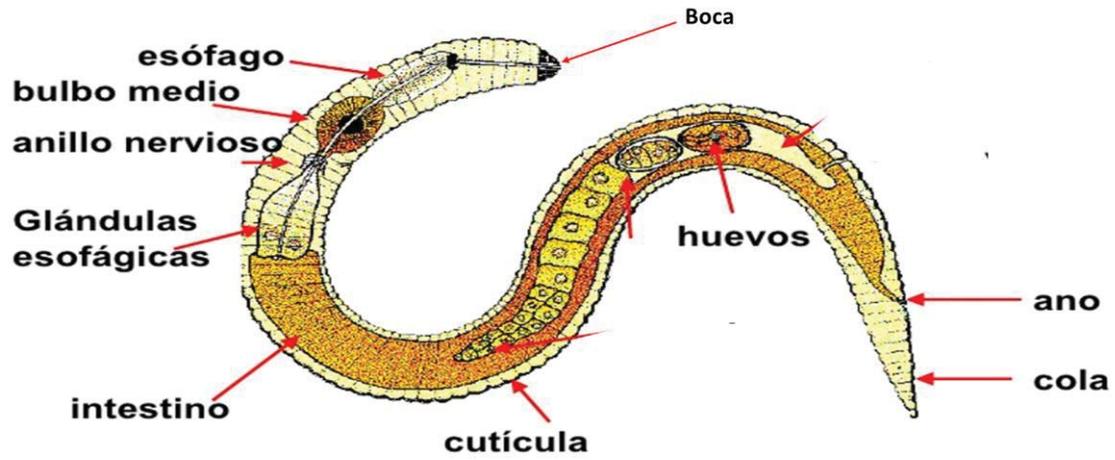


Figura 1. Morfología general del Phylum nematoda. Se señalan las estructuras más importantes dentro de la morfología del nematodo.

2.2 Nematodos Anisakis.

Los parásitos con mayor prevalencia en peces pertenecen a la familia Anisakidae, los cuales han sido descritos en variados estudios, en distintas zonas geográficas y hospedadores (Timi *et al.*, 2014).

La mayoría de los nematodos adultos descritos para la familia Anisakidae pertenece al orden ascaridida del cual se han registrado aproximadamente 52 especies (Mattiucci *et al.*, 2008). Los miembros de esta familia corresponden a los géneros de *Anisakis* (Dujardin 1845), *Pseudoterranova* (Krabbe 1878) y *Contracaecum* (Railliet y Henry 1913).

Poseen un ciclo de vida indirecto que involucra un estado en vida libre y una fase en múltiples hospedadores en los diferentes niveles de la red alimentaria (Mattiucci *et al.*, 2008), el ciclo de vida de estos parásitos se muestra en la Figura 2. El primer hospedador siempre corresponde a crustáceos, mientras que peces, calamares y otros invertebrados sirven como segundos hospedadores intermediarios o paraténicos, los hospedadores definitivos son mamíferos acuáticos y aves (Mattiucci *et al.*, 2008; Dzido *et al.*, 2009; Mattiucci *et al.*, 2014; Mattiucci *et al.*, 2015). Un hospedador intermediario le sirve al parásito para pasar de un estado larval a otro y en contraste el hospedador paraténico solo sirve como vector (el parásito no se desarrolla) y finalmente solo en el hospedador definitivo el parásito alcanzara su madurez sexual y se reproducirá (Diedrichs *et al.*, 2007).

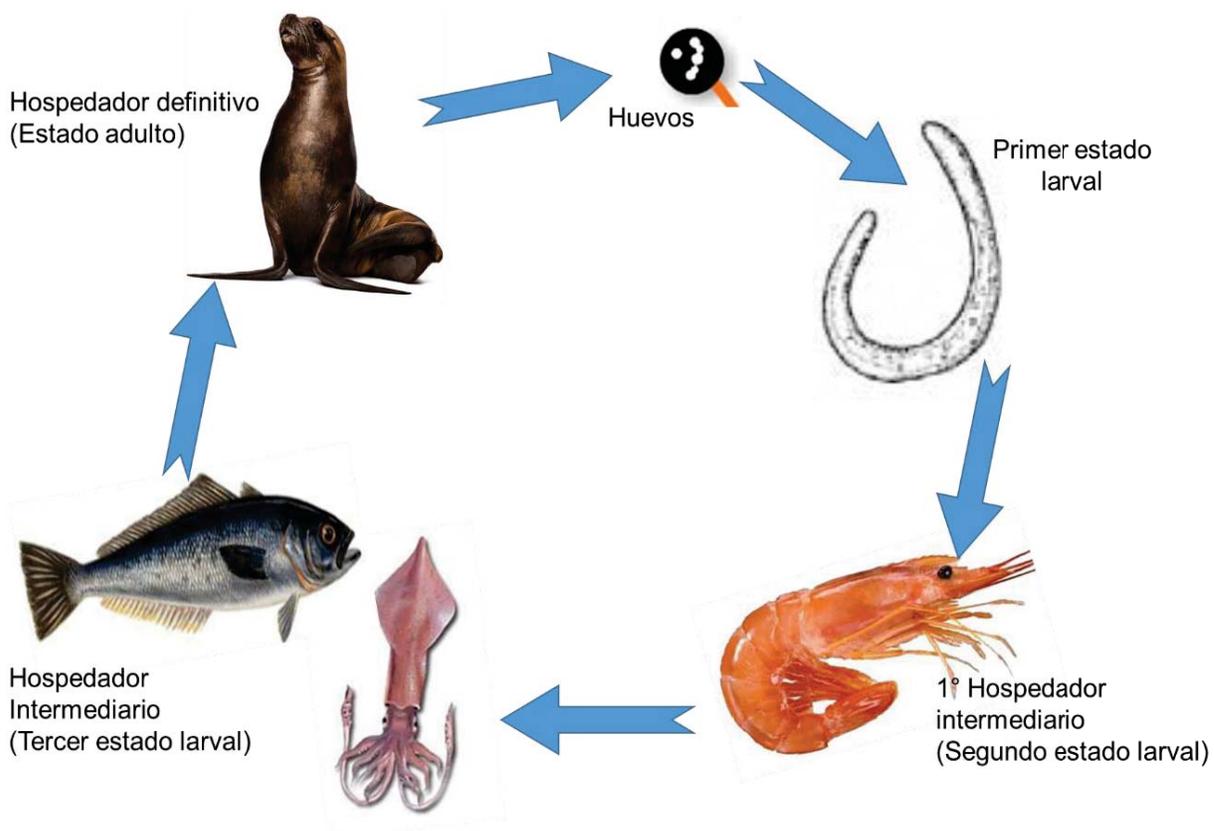


Figura 2. Ciclo de vida de la familia Anisakidae. Se muestra las dos fases del ciclo de vida de la familia Anisakidae, tanto en su estado libre, como el uso de múltiples hospedadores (figura creada a partir de Mattiucci *et al.*, 2008; Dzido *et al.*, 2009; Mattiucci *et al.*, 2014; Mattiucci *et al.*, 2015).

Al evaluar el estado taxonómico de los nematodos encontramos que la mayoría de los trabajos usan taxonomía clásica (clasificación por morfología), sin embargo la gran similitud que existe entre las distintas especies ha llevado a una mala identificación. Por lo que en los últimos 20 años ha tomado importancia el uso de herramientas moleculares para la identificación de nematodos a través de taxonomía molecular (el uso de ADN y/o ARN para inferir relaciones de parentesco).

El uso de solo taxonomía clásica es complejo debido al hecho de que los rasgos morfológicos de interés, son aplicables solo al estado adulto del nematodo y no a sus estados larvales (Mattiucci *et al.*, 2008). Sin embargo se han creado claves sistemáticas basadas en estos rasgos morfológicos para la clasificación de la familia Anisakidae. La clave de Hartwich (1974), basada principalmente en las características del “sistema excretor” y el “tracto digestivo”, subdivide a esta familia en dos subfamilias Anisakinae y Contracecinae, dentro de ambas subfamilias encontramos diversos géneros en Anisakinae encontramos *Anisakis*, *Pseudoterronova* y en Contracecinae encontramos a *Contracecum*, *Phocascaris*, *Galeiceps* (Mattiucci *et al.*, 2008).

Para la clasificación taxonómica de nematodos anisakidos, los rasgos morfológicos de importancia corresponden a las características del sistema excretor, aparato digestivo, el número y distribución de las papilas caudales masculinas, la posición de la vulva y la longitud de las espículas (Mattiucci *et al.*, 2008). Como ya se mencionó, estos rasgos son aplicables al estado adulto, además se debe tener en consideración que a menudo son también solo relacionados a los individuos del sexo masculino.

En la actualidad existen morfoespecies, o complejos de especies que se basan en especies cosmopolitas identificadas previamente (*sensu lato*), los que pueden contener más de una especie reconocida (Mattiucci *et al.*, 2008).

Lo anteriormente mencionado sobre la clasificación por taxonomía clásica para los nematodo anisakidos, llevo a que se utilizaran métodos genéticos y/o bioquímicos para su clasificación (Mattiucci *et al.*, 2008), lo que ha permitido una mejor identificación de las diversas especies representantes de estos géneros.

2.2.1 Genero *Anisakis*.

Los registro de los nematodos del genero *Anisakis* (Dujardin 1845) son polémicos y confusos, hasta la aplicación de metodología genética y moleculares, que han permitido en los últimos 20 años una taxonomía aparentemente más estable y aceptada (Mattiucci *et al.*, 2014). Uno de los descubrimiento más importante ha sido en relación al género *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809), en la actualidad tres especies biológicas se encuentran incluidas dentro del concepto de *Anisakis simplex (sl)*. Este complejo de *Anisakis simplex* está formado por: *A. pegreffii* (Campana-Rouget y Biocca, 1995), *A. simplex (SS)* y *A. simplex sp. C* (Mattiucci, 1997), la distribución geográfica y hospedadores de estas especies es diversa (Mattiucci *et al.*, 2014). *Anisakis simplex C* ha sido descrita en peces antárticos (Dzido *et al.*, 2009).

2.2.2 Genero *Pseudoterranova*.

Larvas *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe 1878) es un complejo, también conocido como "sealworms" o "codworms" (Timi *et al.*, 2014), es el segundo patógeno más frecuente reportado en humanos.

Los adultos de *P. decipiens* (sensu latu) son parásitos distribuidos en mamíferos pinnípedos. Esta morfoespecie comprende seis especies detectadas genéticamente, por primera vez utilizando aloenzimas (Mattiuci *et al.*, 2008; Timi *et al.*, 2014). Estas especies corresponden a *P. decipiens* ss (Krabbe, 1878), *P. bulbosa* (Cobb, 1888), *P. azarasi* (Yamaguti y Arima 1942) y *P. krabbei* (Paggi, 2000) encontradas en las regiones boreales y ártico-boreales (Timi *et al.*, 2014). Además se le suman otras dos especies encontradas en el hemisferio sur, *P. decipiens* sp. E de la Antártica (Bulluni, 1997) y *P. cattani* (Nascimento y Urrutia, 2000) descrito en Chile (anteriormente se describió como *decipiens phocanema*) (Timi *et al.*, 2014).

Recientemente se han descrito dos nuevas especies para el género *Pseudoterranova*, las cuales corresponden a las especies; *P. kogiae* (Mawson, 1939) desde el cachalote pigmeo y *P. ceticola* (Deardorff y Overstreet, 1981) desde el cachalote enano (Gibson, 1983) (Timi *et al.*, 2014).

2.2.3 Genero *Contracaecum*.

Larva de nematodos del género *Contracaecum* se encuentran ampliamente distribuidas en agua dulce y ambientes marinos. Han sido encontrados en la bahía de Kotor (Yugoslavia); el mar del noreste (Báltico); Hokkaido (Japón), México, Venezuela, el

Atlántico Sudoccidental, Nicaragua, el norte de Argentina y las Islas Shetland de Sur (Martins *et al.*, 2004). El parásito adulto se encuentra en el estómago o intestino delgado de aves que se alimentan de peces, mientras que Copépodos de agua dulce se infectan de larvas que nadan libremente (segundo estado larval) (Martins *et al.*, 2004).

Las especies descritas en el Ártico son; *Contraecaecum osculatum* sp. A y *C. osculatum* sp. B y *C. osculatum* ss, mientras que se han reportado dos especies en la Antártica, las cuales corresponden a *C. osculatum* sp. D y *C. osculatum* sp. E (Mattuicci *et al.*, 2015).

2.3 Antártica.

La Antártica es uno de los ecosistemas del planeta más aislado, por lo mismo es altamente endémico y sus habitantes se encuentran adaptados al frío. El aislamiento térmico e hidrogeográfico del Océano Austral, es debido a la formación del Frente Polar Antártico (FPA) el cual se formó hace 20-25 millones de años, creando la barrera natural más grande existente (Stankovic *et al.*, 2002).

La biodiversidad Antártica es más extensa de lo que se pensaba, tanto a nivel de diversidad ecológica, como de estructura biogeográfica (Chown *et al.*, 2015). La vida en la Antártida y el Océano Austral es muy diversa y a su vez es la que se encuentra en mayor amenaza por los cambios climáticos ocurridos en los últimos años (Chown *et al.*, 2015). Sumado al cambio climático encontramos la actividad económica, tales como la pesca, el turismo y la misma investigación científica, las cuales se encuentran repercutiendo en la biodiversidad de la Antártica.

Estudios recientes han mostrado una alta diversidad bentónica, incluso en las profundidades del mar. La biodiversidad comprende convencionalmente la variedad en toda la jerarquía biológica, desde los ecosistemas y su funcionalidad (Chown *et al.*, 2015). La fauna marítima de la Antártica carece de muchos de los grupos superiores típicos de los hábitats menos extremos en el mundo, algunas especies abundantes en el océano antártico son los peces teleósteos, gasterópodos, bivalvos y algunos crustáceos (Chown *et al.*, 2015; Maslen *et al.*, 2006).

El FPA ha reducido sustancialmente la migración de los peces, lo que ha facilitado el desarrollo de linajes locales, llevando a que la fauna de peces del Océano Austral sea altamente endémico, alrededor del 90% de las especies son endémicas (Stankovic *et al.*, 2002). Cercano a la mitad de las especies de peces encontrada en la Antártica corresponden al suborden Notothenioidei (Palm *et al.*, 1998) teniendo un total de 18 especies (Matiucci *et al.*, 2015). *Notothenia coriiceps*, es un pez nototenido que posee una distribución circumpolar, siendo esta una de las especies dominante del sistema intermareal submareal somero de la Península Antártica (Palm *et al.*, 1998).

Hemos mencionado ya la gran biodiversidad que se encuentra en la Antártica a nivel de diversas especies, tanto a nivel de fauna terrestre como marítima, no obstante esta no es la única biodiversidad que se encuentra en esta zona, también encontramos diversidad a nivel de parásitos que se encuentran en los peces, sin embargo existen pocos estudios que la evalúen (Walter *et al.*, 2002).

Dentro de la mayoría de los estudios del Océano Antártico con aspectos taxonómicos de la parasitología de peces, existen pocos estudios sobre la ecología del

parásito y su ciclo de vida (Walter *et al.*, 2002). Además, la mayoría de estos estudios se han realizado en nototenidos de aguas costeras poco profundas o del mar abierto (Walter *et al.*, 2002).

Algunos de los estudios sobre la biodiversidad parasitaria en la Antártica también se han realizado en pinnípedos antárticos, cuya población incluye a *Leptonychotes weddellii* (foca de Weddell), *Mirounga leonina* (elefante marino del sur), *Arctocephalus gazella* (lobo marino antártico), y *Hydrurga leptonyx* (foca leopardo), entre otros (Reeves *et al.*, 1992). Estos mamíferos se encuentran distribuidos por el continente y la península antártica. Aunque estos reportes son escasos y fragmentados describen la población parasitaria de nematodos encontrados en pinnípedos y peces antárticos (Reeves *et al.*, 1992). Principalmente se han descrito miembros de la familia Anisakidae, los cuales se detallan en la Tabla I y Tabla II.

Tabla I. Nematodos que parasitan pinnipedios Antárticos. Las letras D, E se refieren a especies descritas en la Antártica.

pinnipedios	Nematodos	Referencias
<i>Leptonychotes weddelli</i>	<i>Contracaecum osculatum</i> sp. D <i>Contracaecum osculatum</i> sp. E <i>Contracaecum radiatum</i> <i>Pseudoterranova decipiens</i> E	Mattiucci <i>et al.</i> , 2015 Rengifo-Herrera <i>et al.</i> , 2014
<i>Mirounga Leonina</i>	<i>Anisakis pegreffii</i> <i>Anisakis simplex</i> C <i>Contracaecum</i> Spp <i>Contracaecum mioroungae</i> <i>Contracaecum radiatum</i>	Rengifo-Herrera <i>et al.</i> , 2014 Dzido <i>et al.</i> , 2009
<i>Arctocephalus gazella</i>	<i>Anisakis</i> <i>Pseudoterranova</i>	Diedrichs <i>et al.</i> , 2007
<i>Hydruga leptonyx</i>	<i>Anisakis pegreffii</i>	Dzido <i>et al.</i> , 2009

Tabla II. Nematodos que parasitan peces Antárticos.

Peces	Nematodos	Referencias
<i>Chaenocephalus aceratus</i>	<i>Pseudoterranova</i>	Dzido <i>et al.</i> , 2009
<i>Notothenia rossii</i>	<i>Pseudoterranova</i> <i>Anisakis Simplex C</i>	Dzido <i>et al.</i> , 2009
<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Contracaecum Spp</i> <i>Pseudoterranova</i> <i>Anisakis Simplex C</i>	Dzido <i>et al.</i> , 2009

2.4 Marcadores moleculares en parásitos.

La identificación morfológica ha sido la base por años para la identificación de parásitos, sin embargo no siempre ha sido exacta, debido a la gran similitud que existen en los rasgos morfológicos de interés de varias especies dentro de los distintos phylum. Además de que en su mayoría es aplicable al estado adulto del parásito y no a su estado larval (Gasser *et al.*, 1995; Dorris *et al.*, 1999). Por lo que el ingreso de herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la tecnología de secuenciación de ADN, han contribuido en la identificación taxonómica correcta de los diferentes phylum de parásitos. Un ejemplo de esto, es el avance que han realizado los taxonomistas de trematodos usando estas herramientas han podido superar las limitaciones de la identificación por rasgos morfológicos (Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Estos métodos moleculares permiten la comparación de taxa diferentes utilizando la misma métrica, basada en la evolución de una sola molécula conservada (Dorris *et al.*, 1999). Datos genéticos han proporcionado a los investigadores la capacidad de reconocer a numerosas especies, aclarar la plasticidad fenotípica, relacionar las etapas de ciclo de vidas, inferir la filogenia y poder realizar una exploración de la variación geográfica más allá de lo que se podría inferir de los datos morfológicos por si solos (Blasco-Costa *et al.*, 2016, Mattuicci *et al.*, 2008). Además el uso de marcadores moleculares permite el estudio de procesos tales como: transmisión de los parásitos, la evolución de la especificidad del hospedador y los patrones de especiación (Criscione *et al.*, 2005). Por lo mismo se ha visto un aumento exponencial de publicaciones, utilizando

herramientas moleculares para la identificación y/o caracterización de diferentes especies parasitarias en los últimos años (base web of Science <https://apps.webofknowledge.com>).

Datos moleculares proporcionan información que puede contribuir a entender la plasticidad fenotípica y las especies crípticas entre los taxa de trematodos (Blasco-Costa *et al.*, 2016), lo que a su vez también es aplicable a otros parásitos, entre ellos los nematodos. No obstante las publicaciones que usan datos genéticos para la identificación de parásitos correspondiente a los nematodos encontrados en la Antártica es muy escaso, encontrando solo dos artículos en la web of Science (<https://apps.webofknowledge.com>), al realizar la búsqueda con las palabras claves “nematodos, parásito, Antártica, genética” (Tabla III).

Al momento de realizar un estudio taxonómico con marcadores moleculares, surgen algunos problemas, tales como: (a) Cuáles y cuántos marcadores se deben utilizar, y (b) cómo debemos analizarlos (Blasco-Costa *et al.*, 2016). Además se debe tener claro, cuál es la desventaja del gen(es) elegido debido a que diferentes genes evolucionan a tasas diferentes. Todos los genes acumulan mutaciones a través del tiempo, no obstante un grupo de genes tendrá una tasa más alta de cambios genéticos (por ejemplos los que no codifican para funciones) mientras que otro grupos de genes acumulara menos mutaciones (por ejemplo los que codifican para determinadas funciones biológicas) y algunos habrán llegado a un equilibrio (Blasco-Costa 2016 Mattiucci *et al.*, 2008).

Tabla III. Estadística de publicaciones encontradas en la web of Science, utilizando las palabras claves; nematodos, parasito, genetica, Antártica.

Articulo	Año de publicación	Numero de veces citado
Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hmispheres.	2007	41
Helminth parasites found in faecal samples of phocids from the Antarctic Peninsula.	2014	0

El gen escogido debe ser capaz de exhibir suficiente variación para distinguir entre taxa estrechamente relacionados, sin embargo no debe impedir poder realizar una identificación taxonómica, inferencia sistemática y/o filogenética (Dorris *et al.*, 1999; Blasco-Costa *et al.*, 2016) por lo que es ideal que las conclusiones moleculares se basen en loci independientes.

En relación al número de marcadores que se generan desde la combinación del número de marcadores para huésped-parásito-localidad (HPL) y el número de muestras individuales para los diferentes estudios sistemáticos o taxonómicos inferior, es decir a nivel de especies, intra-genérico o entre géneros estrechamente relacionados (Blasco-Costa *et al.*, 2016), se debe tener en cuenta que: (a) las secuencias del marcador más variable (marcador que detecte los polimorfismo intraespecíficos) denominado marcador A, debe ser generado a partir de 3 a 5 muestras pertenecientes a la combinación HPL, esto toma importancia cuando las diferencias entre especies son escasas y (b) el segundo gen debe ser más conservador (que muestre variación interespecífica) denominado marcador B, el cual debe ser obtenido a partir de los individuos con un mayor grado de divergencia con respecto al marcador A (Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Se recomienda el uso combinado de genes ribosomales y genes mitocondriales, usando como criterio para la elección (a) marcadores que ya estén disponibles para el grupo de interés, (b) que los marcadores respondan a las preguntas específicas que se están investigando (Blasco-Costa *et al.*, 2016). También es recomendable usar marcadores que detecten variación a nivel intraespecífica como genes mitocondriales y usar una región nuclear variable, como el espaciador transcrito interno (ITS) o la

subunidad mayor ARNr (*lsu*) para variaciones interespecificas. El uso combinado de estos marcadores es ventajosa de dos maneras (i) aumentan la secuencias de datos disponibles y (ii) linajes divergentes de un gen mitocondrial son corroborados por divergencia en los loci nucleares, para demostrar que esos linajes de ADN mitocondrial (mtADN) muestran variación de haplotipos en la población y que los linajes históricos deben ser reconocidos como especies distintas (Anderson *et al.*, 1998; Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Los genes correspondientes al ARN ribosómico (ARNr) y sus regiones espaciadoras, consisten en cientos de copias repetidas en tándem dentro del genoma nuclear de células eucariotas, gracias esto, esta región es muy informativa, ya que se cree que todas las unidades repetidas evolucionaron de manera concertada, además conserva una función similar dentro de diferentes especies (Dorris *et al.*, 1999; Blasco-Costa *et al.*, 2016). El gen correspondiente a la unidad pequeña ARNr (*ssu* o 18S), es uno de los genes con evolución más lenta dentro de los organismos vivos, por lo que se puede utilizar para inferir relaciones filogenéticas a nivel de familias, mientras que el gen *lsu* ARNr muestra un ritmo más rápido de evolución al compararlo con el gen *ssu*, no obstante igual posee regiones conservadas semejantes a las del gen *ssu* (Blasco-Costa *et al.*, 2016). Pero ambos marcadores pueden ser utilizados para inferir relaciones a nivel de familias y géneros. En el caso de los nematodos se ha mostrado que el uso del *ssu* permite resolver este tipo de relaciones filogeneticas (Anderson *et al.*, 1998; Dorris *et al.*, 1999).

Los Espaciadores Internos Transcriptos (ITS-1 e ITS2), han sido eficaces, ya sea por separado o combinados al ser ocupados en estudios taxonómicos. Por lo que es recomendable incluir al menos una región conservada (*ssu* o *lsu*) y un espaciador (ITS-1 e ITS-2), para la descripción de una nueva especie (Blasco-Costa *et al.*, 2016). En el caso de los nematodos los ITS proporcionan una gran fuente de datos moleculares para la construcción de un marco filogenético (Dorris *et al.*, 1999).

El uso de marcadores mitocondriales, posee varias ventajas con respecto a los marcadores nucleares, en primer lugar, la tasa de mutación es más alta que la observadas en genes nucleares, por lo que se genera variación genética en la población a nivel de especies, en segundo lugar, el polimorfismo de nucleótidos intraespecífica es considerado neutral y en tercer lugar, el tamaño efectivo de la población (N_e) es un cuarto del loci nucleares diploide en especies alógamas o la mitad en especies hermafroditas (Blasco-Costa *et al.*, 2016). Por lo que la frecuencia de haplotipos se puede desplazar rápidamente, lo que creara diferencias genéticas entre las poblaciones en un periodo de tiempo corto.

La proteína Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COX1) se encuentra codificada dentro del gen citocromo oxidasa subunidad 1 (*cox1*) en el mtADN, es una proteína altamente variable, la cual es ampliamente utilizada en la sistemática molecular de animales. A diferencia de ARNr, *cox1* es menos adecuado para realizar grandes reconstrucciones filogenéticas o comparaciones entre taxa alejados, debido a la posibilidad de encontrarse con sustituciones múltiples que se han producido en la

posición del mismo nucleótido dentro del codón, por lo que no es posible estimar con certeza el tiempo de divergencia (Blasco-Costa *et al.*, 2016).

También es recomendable usar más de un marcador mitocondrial en estudios de taxonomía. El gen citocromo oxidasa subunidad 2 (*cox-2*), que codifica para la proteína citocromo oxidasa subunidad 2 (COX2), en nematodos perteneciente a la familia Anisakidae, ha mostrado ser un gen muy polimórfico, pudiendo distinguir entre dos especies hermanas estrechamente relacionado (Mattiucci *et al.*, 2008; Mattiucci *et al.*, 2015), incluso en cuando marcadores nucleares no han podido distinguir entre estas dos especies estrechamente relacionadas.

3. Hipótesis.

Las especies parasitas del grupo nematoda que se encuentran en *Notothenia coriiceps*, *Notothenia rossii* y *Harpagifer antarcticus* en la Antártica, corresponderían a la mismas especies, para los tres hospedadores.

4. Objetivo general.

Caracterización por taxonomía molecular de Nematodo que parasitan a tres especies de peces de la Antártica, mediante el uso de marcadores mitocondriales y nucleares.

5. Objetivos específicos.

- I. Estandarizar protocolos para la amplificación de ADN desde Nematodos que se encuentran en tres especies de peces de la Antártica, para los marcadores mitocondriales y nucleares.
- II. Delimitar especies mediante reconstrucción filogenética y Gap Discovery de nematodos encontrado en tres especies de peces de la Antártica, utilizando marcadores mitocondriales y nucleares.

6. Materiales y métodos

6.1 Muestreo y recolección de muestra.

Los nematodos se obtuvieron desde sus hospedadores correspondiente a *Notothenia rossii*, *Notothenia coriiceps* y *Harpargifer antariticus* los cuales provenían de Bahía Fildes (Isla rey Jorge, Islas Shetland del sur) cuya coordenadas geografías son 62°15'S 58°51'O, Rada Covadonga (península antártica) cuyas coordenadas geográficas son 63°19'15"S 57°53'55"O, los que fueron recolectado en la expedición ECA 51 que se realizó en el verano del 2015 y 2016 asociados al proyecto InaCh RT 22-14.

Cada individuo recolectado desde su hospedador fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con etanol absoluto para su preservación y se le asignó un código para su identificación señalando el morfoespecie preliminar (Nem Sp1, Nem Sp2 y Nem Sp3), número del hospedador y localidad.

6.2 Microcopia electrónica.

Las muestras se fijaron en AFA, posteriormente fueron deshidratadas utilizando una batería de etanol en concentraciones crecientes hasta llegar a etanol absoluto, a continuación se procedió a secar las muestra mediante el uso del punto crítico con CO₂ líquido, como liquido intermediado en un secador Samdri-780A Tousimis. Posteriormente las muestras fueron montadas sobre un soporte cilíndrico de bronce con un adhesivo de doble faz. Finalmente se cubrieron con oro en una sombreadora Fine Coat Ion Sputter J.F.C.-100 JEOL y se observaron en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 250.

6.3 Extracción de ADN.

Se extrajo gADN utilizando el kit comercial E.Z.N.A tissue Kit Omega Bio-Tek, siguiendo el protocolo señalado por el fabricante con algunas modificaciones para obtener una correcta extracción de gADN para parásitos, para lo cual se modificó el paso de elución de gADN desde la columna, en donde la elución se realizó añadiendo 20 µl de agua ultra pura a la columna dejando incubar por 30 minutos, posteriormente se centrifugo por 1 minuto a 13000 rpm, para tomar el filtrado el cual se vuelve a pasar por la columna adicionando 10 µl de agua ultra pura, se centrifugo por 1 min a 13000 rpm (el agua ultra pura que se utiliza para la elución se encuentra a 70°C). Se evaluó la integridad del gADN por observación en un gel de agarosa al 1%.

6.4 Amplificación de ADN por PCR.

Para realizar la amplificación de la región del gen de interés, se utilizó la técnica de reacción en cadena polimerasa (PCR), utilizando el termociclador Multigene OPTIMAX TCL y los genes correspondientes a genes nucleares ITS y ssu, además de un gen mitocondrial *cox-2*. Se utilizaron partidores para las muestras de nematodos de genes nucleares, *ssu* (400pb) según lo señalado por Valderrama *et al.*, 2014, ITS (930pb) según lo señalado por Timi *et al.*, 2014 y para el gen mitocondrial *cox-2* (530pb) según lo señalado por Seesao *et al.*, 2014. Los detalles de cada partidore utilizado en el estudio se señalan en la Tabla IV.

Tabla IV. Set de partidores, para estudio genético de nematodos.

Gen	Sentido	Secuencia	Referencia
<i>ssu</i>	Forward	5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3'	Valderrama et al., 2014
	Reverse	5'- GCCTGCTGCCTTCCTTGGA-3'	
ITS	Forward	5'- GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3'	Timi et al., 2014
	Reverse	5' -TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'	
<i>cox2</i>	Forward	5'-GGTGTTCCTT TCTTTTGTTTCTG-3'	Seesao et al., 2014
	Reverse	5'-ATA AAACATATGGTTAGCCCCA C-3'	

La amplificación del gen *ssu* se realizó siguiendo lo señalado por Valderrama *et al.*, (2014), modificando el mix según lo indicado más adelante. Para ITS, la amplificación se realizó siguiendo lo señalado por Timi *et al.*, (2014), realizando las siguientes modificaciones; se aumentaron los ciclos de 30 a 37 y se modificó las condiciones de “annealing” cambiando la temperatura 55°C por 30 seg a 56°C por 1 min, el gen mitocondrial *cox-2*, la amplificación del gen se realizó según Timi *et al.*, (2014), realizando las siguientes modificaciones; la desnaturación inicial se realizó a 94° por 30 seg en vez de 95° por 10 min, se redujeron los ciclos de 45 a 34, la desnaturación se realizó 94°C por 30 seg en vez de 95°C por 20 seg, el “annealing” se llevó acabo a 46°C por 60 seg en vez de 45°C por 15 seg, la extensión se realizó a 72°C por 90 seg en vez de 72°C por 45 seg y la elongación final se llevó acabo a 72°C por 10 min en vez de 72°C por 3 min.

Para los tres genes se preparó el siguiente protocolo de mix a un volumen final de 12,5 µl, 1,25 µl de Buffer 5X color fluo, 1 µl de MgCl₂ (25mM), 2,5 µl de dNTPs (2,5 mM), 1 µl de partidore forward (10 p/mol), 1 µl de partidore reverse (10p/mol) y 0,15 µl de Gold Taq ADN polimerasa (5U/ul) Invitrogen y 3,6 µl de H₂O ultrapura.

El producto final de PCR se visualizó en geles de agarosas al 2% para ver el éxito de la amplificación, estos geles se corrieron a 100 Volt por 30 minutos, usando Buffer TAE 1X como solución amortiguadora. Aquellas muestras que muestran bandas claras y defendidas fueron purificadas usando kit de purificación comercial E.Z.N.A Cycle-Pute Kit, siguiendo el protocolo señalado por el fabricante, obteniendo un volumen final de 30 µl de muestra. El final del proceso se visualizó en un gel de agarosa 2% corrido a 100

Volt por 30 minutos. Todas las muestras amplificadas y purificadas fueron enviadas a secuenciar en Macrogen, Seoul, Korea.

6.5 Edición y ensamblaje se secuencias

Las secuencias fueron editadas y alineadas creando un conting, utilizando los programas Proseq v2.9 (Filatov, 2002) y Bioedit (Hall *et al.*, 1999) respectivamente.

6.6 Delimitación de especies.

6.6.1 Reconstrucción filogenética

Para efectuar la reconstrucción filogenética se utilizó el programa Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013), en el cual se ocuparon las secuencias ya editadas de nematodos en estudio y secuencias obtenidas desde genBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se ocupó las aproximaciones de Maximum Composite Likelihood (ML) y Neighbor Joining (NJ) (Tamura & Nei, 1993) con 1000 bootstrap de réplicas como soporte de nodo, antes se realizó la búsqueda del mejor modelo evolutivo que mejor se adaptó a nuestros datos usando el programa Mega v6.0.

Para enriquecer los árboles se trabajó con secuencias liberadas en la base de datos de NBI, las cuales se ocuparon como grupos internos (aquellos que pertenecen a la familia de parásito en estudio) y grupos externos (aquellos que pertenecen a un grupo hermano de la familia en estudio).

6.6.2 Gap Discovery

La metodología de código de barras genéticos (ADN barcoding) puede ser utilizada para asignar organismos dentro de especies putativas. De aquí que un set de código de barras puede ser usado para delimitar especies mediante el análisis de la diferencias genéticas pareadas entre organismos y el descubrimiento de los “espacios de código o “Barcode gap”.

Se utilizó el programa Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012), se debe detectar el primer barcode gap, en el que el límite en las distancias (distlimit) es estadísticamente más probable de ser intraespecífica (el valor en que el primer barcode gap es mayor que el valor distlimit). distlimi corresponde a la tasa de mutación de la población, obtenida a partir de un set de datos. Se estima una partición preliminar del set de datos con un umbral P (P es la divergencia máxima como a priori intraespecífica diversidad). En segundo lugar tomando el umbral igual al barcode gap calculado anteriormente, se calcula una partición primaria en donde los grupos son las primeras especies candidatas. En tercer lugar, para tener en cuenta la variabilidad de la tasa de mutación a través de los taxa y la superposición de intra e interespecífica de la diversidad, se debe completar ABGD después de haber realizado los dos primeros pasos para cada partición primaria. Esto divide la recursividad de la partición primaria en particiones secundarias y así sucesivamente hasta que no se encuentren nuevos desdoblamientos.

6.6.3 Red de haplotipos.

Debido al alto polimorfismo detectado con el gen *cox-2* y a que permite analizar diferencias intraespecíficas se procedió a construir una red de haplotipos. La genealogía en red de haplotipo basada en el gen mitocondrial *cox-2* fue realizada usando el programa hapView (versión java) (Barrett *et al.* 2005). Para lo cual se utilizó una matriz fasta que contenía las secuencias en estudios y la utilización de un árbol UPGMA, utilizando como modelo p-distancia y sin bootstrap, creado en Mega v6.

7. Resultados.

7.1 Resultado taxonomía clásica.

Basado en la observación en microscopía óptica se clasificaron los nematodos encontrados en los tres hospedadores en estudios en tres morfos que se identificaron como Sp1, Sp2 y Sp3.

Se tomaron muestras de cada morfo y se analizaron por microscopía electrónica, encontrándose dos géneros de la familia Anisakidae. Tanto el morfo Sp1 y Sp3 presenta tres lóbulos y una boca en forma de “V” en su parte anterior y en su parte posterior presenta un mucron en forma de lanceta, en conjunto a la presencia de una abertura hacia el extremo posterior del cuerpo, lo que concuerda con la descripción en literatura par el género *Pseudoterranova* (Figura 3), mientras que el morfo Sp2 no presenta lóbulos en su parte anterior y muestra un mucron en forma de lanceta, lo que coincide con la descripción para el género *Anisakis* (Figura 4).

El resto de muestras recolectadas se analizaron por biología molecular, para obtención de datos genéticos y posterior comparación con los resultados obtenidos por taxonomía clásica.

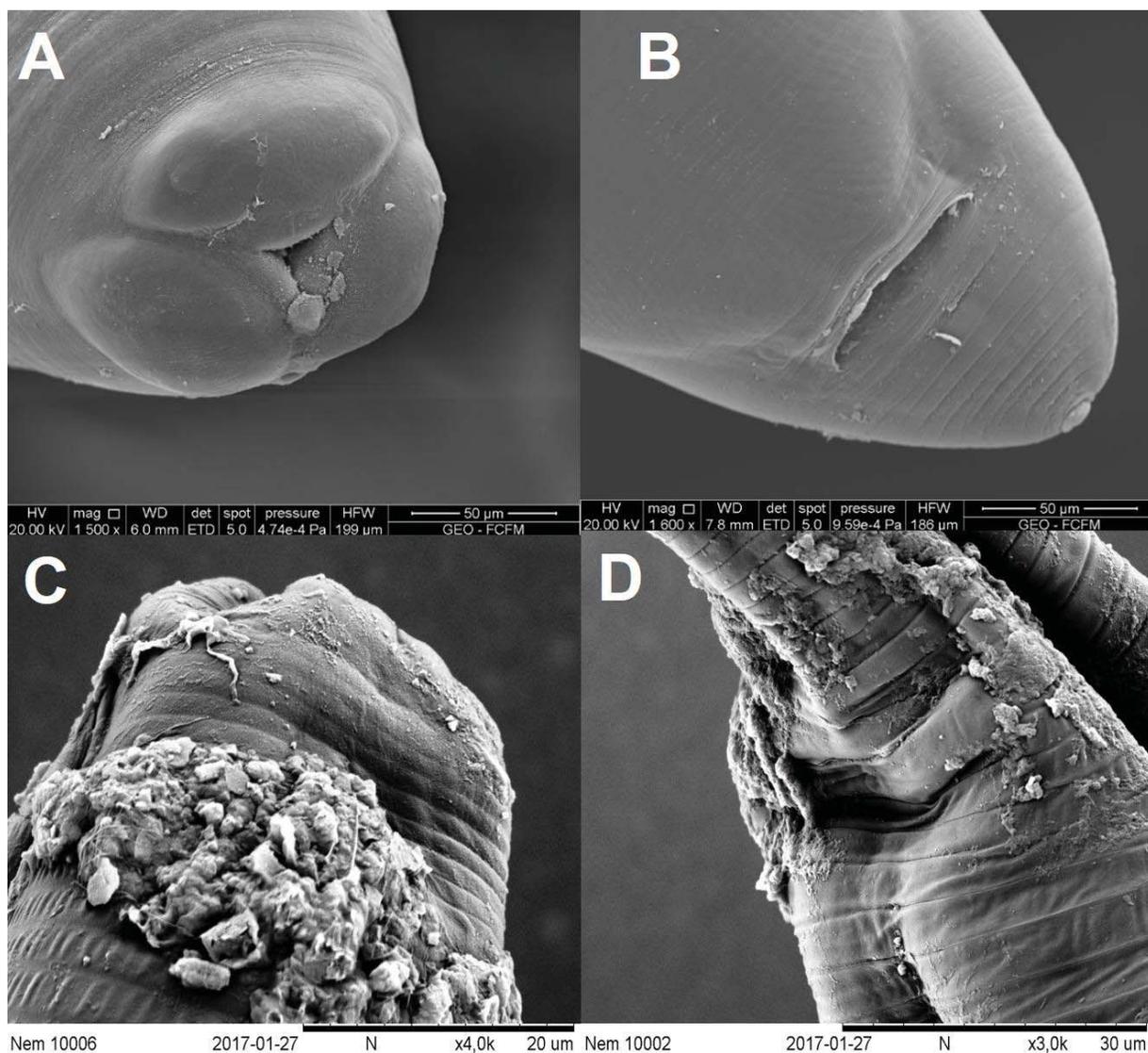


Figura 3. Imagen de microcopia electrónica (ME) de *Pseudoteranova* sp. A y B corresponde al individuo preliminarmente identificados como morfo Sp1, mientras que C y D corresponde a individuo identificado preliminarmente como morfo Sp3, ambos se obtuvieron desde *Notothenia coriiceps*, de Bahía Fildes, Antartica. **A y C.** Parte anterior del nematodo. **B y D.** Parte posterior del cuerpo.

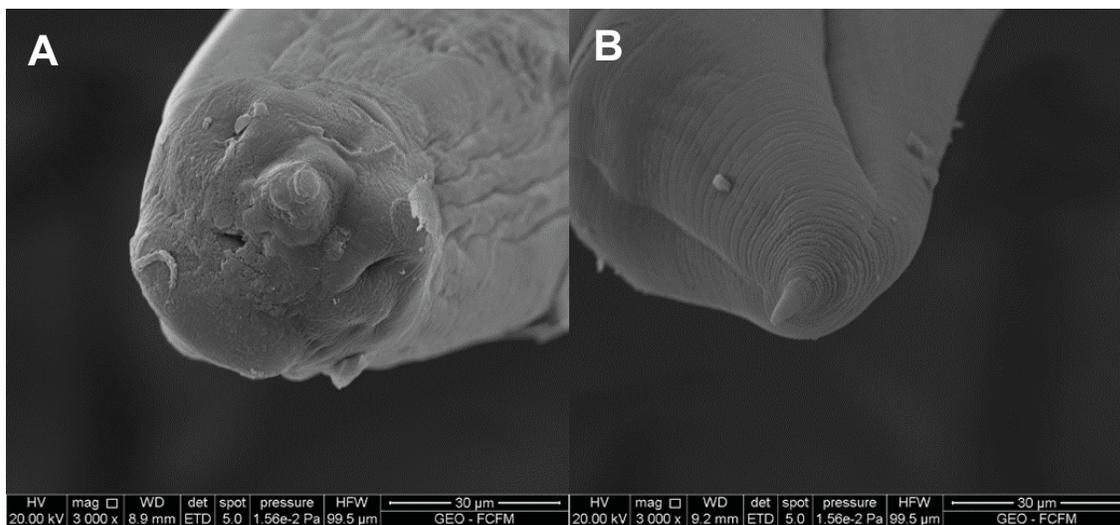


Figura 4. Imagen de microscopía electrónica (ME) de Anisakis sp. El individuo preliminarmente identificados como morfo Sp2, se obtuvo desde Notothenia coriiceps, de Bahía Fildes, Antártica. A. Parte anterior del nematodo. B. Parte posterior del cuerpo.

7.2 Resultados taxonomía molecular.

De los nematodos clasificados preliminarmente como Sp1, se obtuvieron un total de 37 secuencias para el gen *ssu*, 20 secuencias para ITS y 37 secuencias para *cox2*. Para el morfo Sp2 se obtuvieron un total de 11 secuencias para el gen *ssu*, 1 secuencia para ITS y 2 secuencias para *cox2*, mientras que para el morfo Sp3 se obtuvieron un total de 3 secuencias para el gen *ssu*, 1 secuencia para ITS y 3 secuencias para el *cox2*. El resumen de las secuencias obtenidas por cada hospedador se muestra en la Tabla V.

Desde Genbank se obtuvieron secuencias de la familia Anisakidae de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, cuyos hospedadores son antárticos, las que fueron utilizada como grupo internos y secuencias de *Caenorhabditis elegans* como grupo externos, ambos set de secuencias fueron utilizados para las reconstrucciones filogenéticas y el set de grupo externo se utilizó para el análisis de Gap Discovery para los tres marcadores en estudio (Tabla VI).

Los modelos evolutivos que fueron calculados para nuestro set de datos y que posteriormente fueron utilizados para las reconstrucciones filogenéticas se señalan en la Tabla VII, para cada marcador utilizado en este estudio.

Al realizar las reconstrucciones filogenéticas basadas en las aproximaciones Maximum Composite Likelihood (ML) y Neighbor Joining (NJ), para el marcador *ssu* con un largo de secuencia de 307 pares de bases (Pb), mostro una topología que fue congruentes entre ambas aproximaciones mostrando la formación de 3 clados en los que se encuentran secuencias obtenidas desde el estudio y aquellas adquiridas de

Tabla V Resumen de secuencias de nematodos obtenidas desde los tres hospedadores antárticos, para cada marcador en estudio.

Morfo	Hospedador	Localidad	Marcador		
			<i>ssu</i>	ITS	<i>cox2</i>
Sp1	<i>Notothenia rossii</i>	Base Fildes	4	2	9
	<i>Notothenia coriiceps</i>	Base Fildes	17	8	13
		Rada Covadonga	11	6	10
	<i>Harpargifer antariticus</i>	Base Fildes	5	4	5
Sp2	<i>Notothenia coriiceps</i>	Base Fildes	6	1	2
	<i>Harpargifer antariticus</i>	Base Fildes	2	0	0
		Rada Covadonga	3	0	0
Sp3	<i>Notothenia coriiceps</i>	Base Fildes	3	1	3

Tabla VI Lista de especies obtenidas desde Genbank, que son usadas para comparación en análisis filogenéticos y alineamientos.

Marcador	Especie	Numero de acceso GenBank
ITS	<i>Pseudoterranova dicipiens E</i>	KM273086
	<i>Pseudoterranova cattani</i>	KF781284
	<i>Anisakis simplex C</i>	JX535519
	<i>Anisakis simplex</i>	JN968904
	<i>Anisakis typica</i>	JQ798962
	<i>Anisakis typica</i>	AB551660
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	EU131007
ssu	<i>Pseudoterranova dicipens</i>	U94380
	<i>Anisakis sp.</i>	U9465
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	AY268117

Tabla VII Modelos evolutivos obtenidos desde el programa Mega v6, para la reconstrucción filogenética.

Marcador	Modelo evolutivo	Distribución
<i>ssu</i>	Kimura 2- parameter	Invariant site(I)
ITS	Kimura 2- parameter	Invariant site (I)

GenBank, el primer clado posee un sustento de nodo de 53% (ML) y 55% (NJ), este clado está formado por secuencias correspondiente a 2 morfos en estudio y una secuencia obtenida de GenBank correspondiente a *Pseudoterranova dicipens*, el siguiente clado muestra un soporte de nodo de 68% (ML) y 67% (NJ), en el que se encuentran tres secuencias del morfo Sp2 correspondiente al *hospedador Notothenia coriiceps* de Bahía Fildes y una secuencia obtenida de GenBank de *Anisakis sp.*, el clado 3 está formado por secuencias del morfo Sp2 con un soporte de nodo del 100% (ML) y 99% (NJ) para cada aproximación, en conjunto a las reconstrucciones filogenéticas se realizó un análisis de Gap Discovery utilizando el programa ABGD, con los parámetros distancia simple y las secuencias obtenidas en el estudios como desde GenBank para grupos internos y grupo externo. En el caso del gen *ssu* se obtuvieron cuatro grupos distintos representados por las barras de colores al lado derecho del árbol obtenido, el primer grupo está formado por 42 secuencias, el segundo grupo por 4 secuencias, el tercer grupo por 6 secuencia y el cuarto grupo conformado por 1 secuencia (figura 5). Para el marcador ITS de un largo de secuencia de 615 Pb, tanto la aproximación Maximum Composite Likelihood (ML), como Neighbor Joining (NJ), la topología fue congruentes entre ellas, entregando un soporte de nodo del 100% para ambas aproximaciones en el clado conformado por las secuencias en estudio de los morfo Sp1 y Sp3. También se obtuvo un clado constituido por la secuencia del morfo Sp2 correspondiente al hospedador *Notothenia coriiceps* de Bahía Fildes que se agrupa con 2 secuencias obtenidas desde GenBank correspondiente a *A. simplex* y *A. simplex C*, cuyo soporte de nodo es del 100% para ambas aproximaciones. El análisis de gap Discovery se realizó de igual manera que para el gen *ssu*, en este caso se obtuvo

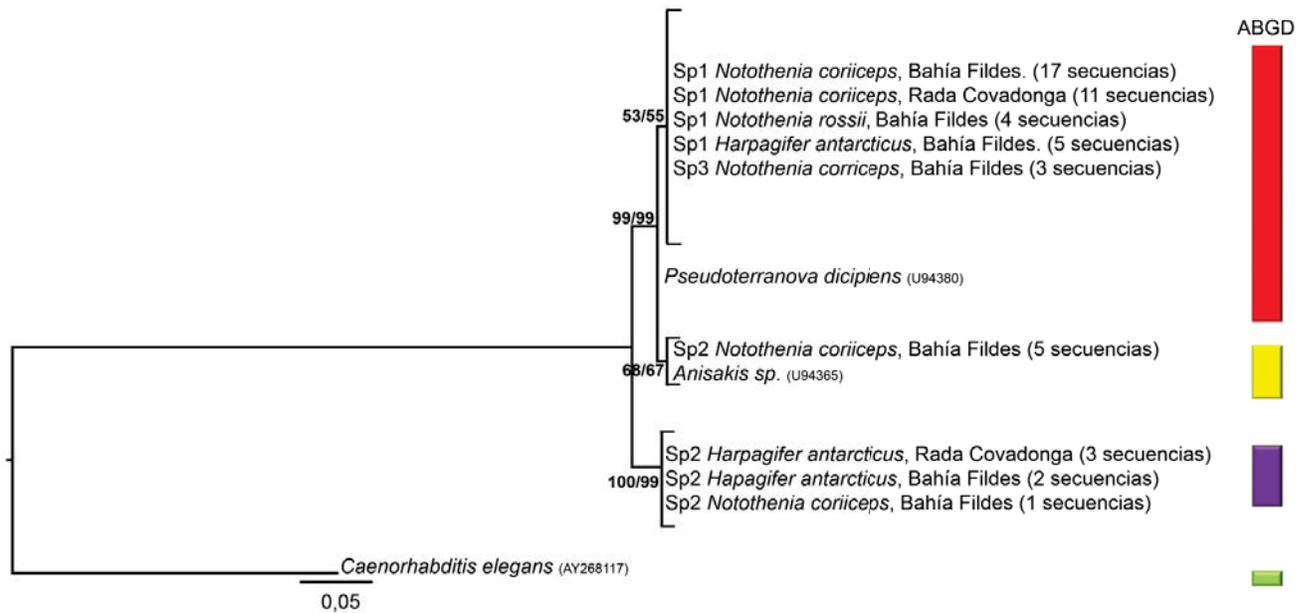


Figura 5. Reconstrucción filogenética basada en el gen *ssu*. Topología consenso de máxima likelihood (ML) y distancia (NJ), sobre los nodos se muestra el soporte estadístico para ML en izquierda y para NJ derecha. Las barras de colores indican los grupos formados a partir del análisis de Gap Discovery en proporción al número de secuencia reunida en cada grupo. Muestras obtenidas desde genbank tienen entre paréntesis su número de acceso.

4 grupos, el primer grupo está formado por 23 secuencias, el segundo grupo 3 secuencias y los grupos 3 y 4 por una secuencia (Figura 6).

Se procedió a la obtención de una red de haplotipo basada en el gen *cox2*, en la cual se analizaron 42 individuos. La red mostro un total de 23 haplotipo con 79 sitios polimórficos y una diversidad haplotípica de 0,911. Se obtuvieron 2 haplotipos centrales, H2 conformado por 10 secuencias y H3 constituido por 8 secuencias, en ambos se encuentran secuencias de los tres hospedadores y de las 2 localidades en estudio. El haplotipo que mostro mayor número de sitios polimórfico (48 sitios) fue el haplotipo 1 (H1) perteneciente al morfo Sp2 de Bahía Fildes. La red de haplotipo mitocondriales basada en el gen *cox2* se muestra en la Figura 7.

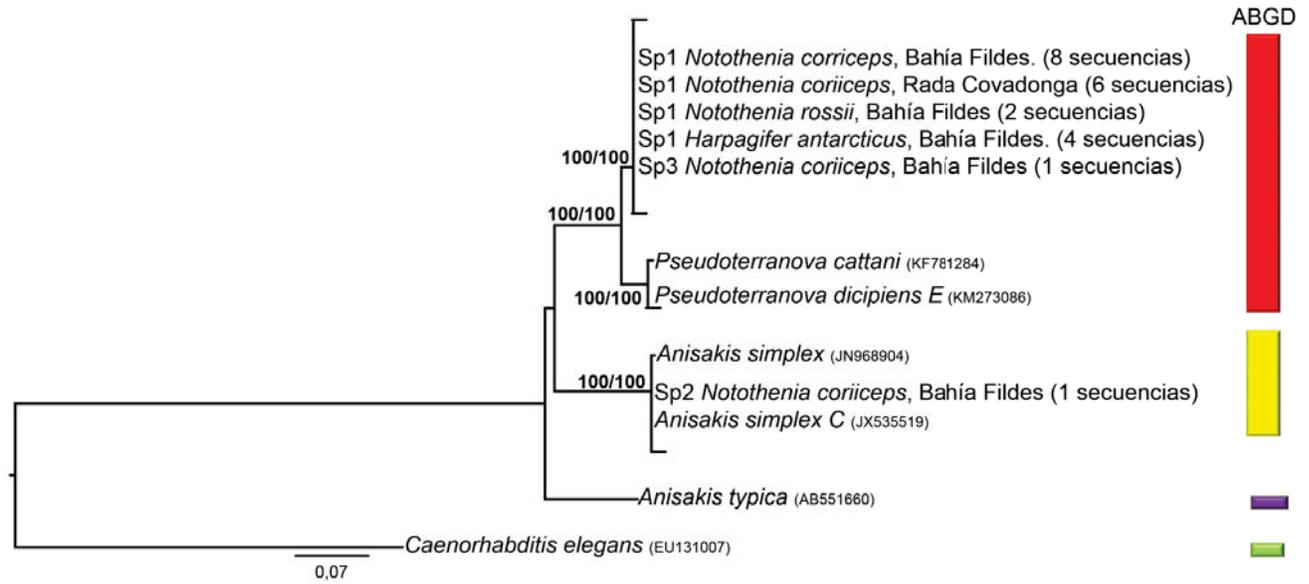


Figura 6. Reconstrucción filogenética basada en el marcador nuclear ITS. Topología consenso de máxima likelihood (ML) y distancia (NJ), sobre los nodos se muestra el soporte estadístico para ML en izquierda y para NJ derecha. Las barras de colores indican los grupos formados a partir del análisis de Gap Discovery en proporción al número de secuencia reunida en cada grupo. Muestras obtenidas desde genbank tienen entre paréntesis su número de acceso.

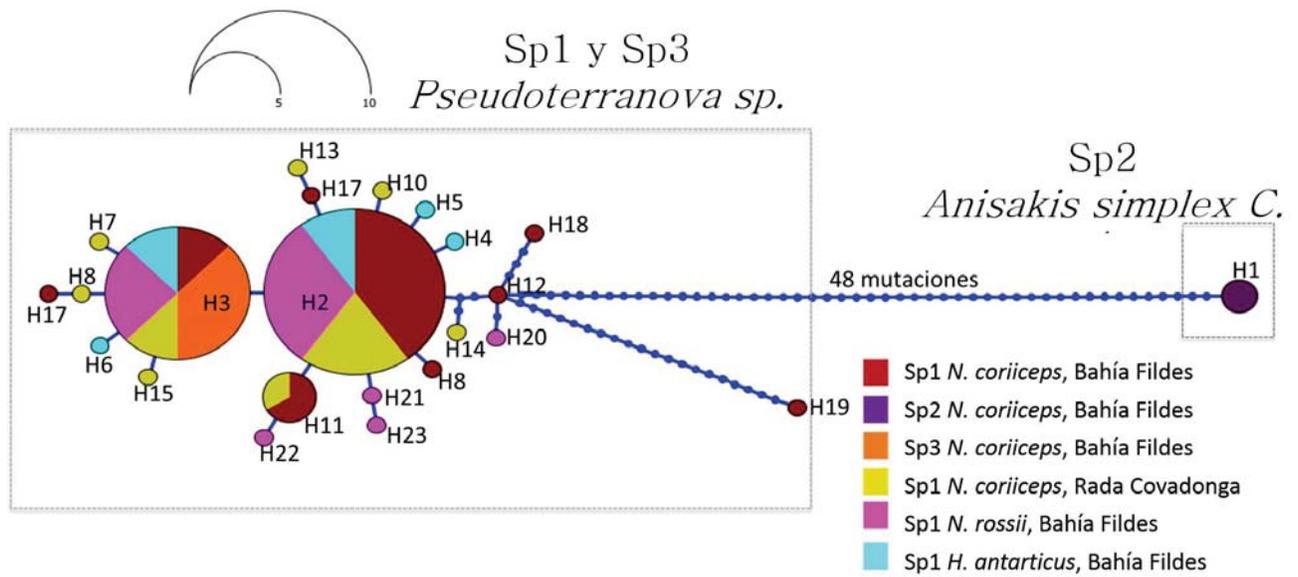


Figura 7. Red de haplotipos para nematodos que parasitan peces antárticos utilizando gen mitocondrial *cox-2*.

En total se analizaron 42 individuos y se obtuvieron 23 haplotipos.

8. Discusión.

El estudio realizado en esta investigación, proporciona nueva información sobre la caracterización de parásitos del phylum nematoda en tres especies de peces de la Antártica, mediante la utilización de herramientas moleculares (reconstrucción filogenética y Gap Discovery), posterior a identificación morfológica (taxonomía clásica). Los datos obtenidos en este estudio contribuyen a los escasos datos encontrados en literatura, en estudios similares.

Los resultados obtenidos mediante taxonomía clásica (morfológica) indican que desde los tres morfos identificados preliminarmente se encuentran dos especies distintas que pertenecen a la familia Anisakidae. Siendo los morfos identificados como Sp1 y Sp3 la misma especie, cuya identificación en base a marcadores moleculares corresponde al género *Pseudoterranova*, mientras que el morfo 2 (Sp2) fue identificado como *Anisakis simplex* C. El análisis de taxonomía molecular confirmó la clasificación taxonómica de estos parásitos, revelando que un análisis exhaustivo de la morfología y la variación genética entregan robustez a cualquier análisis sistemático. Recientes estudios enfatizan la necesidad de integrar análisis moleculares al estudio de la relación parásito-hospedador debido a que incorporan la historia evolutiva de las especies (Froeschke & von der Heyden 2014).

Nematodos del complejo Anisakidae que han sido reportados en la Antártica corresponden a los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* descritos por Dzido et al. (2009), Rengifo-Herrera et al. (2014), Timi et al., (2014) y Mattuicci et al., (2015), en distintos hospedadores. Sin embargo, el complejo Anisakidae ha permanecido

en continua revisión debido a la gran similitud morfológica que existe entre los representantes de los diversos géneros de la familia (Mattiucci *et al.*, 2008; Mattiucci *et al.*, 2014; Timi *et al.*, 2014). La incorporación de datos moleculares a la clasificación taxonómica de Nematodos ha permitido avanzar en la delimitación de especies. Por ejemplo, recientemente Mattiucci *et al.*, (2014) utiliza el marcador molecular ITS y el gen *cox-2* para distinguir 3 especies crípticas dentro del complejo Anisakidae que parasitan diferentes especies de cetáceos. Además, Mattiucci *et al.* (2015) utiliza marcadores moleculares para describir y completar el ciclo de vida de dos especies de nematodos del género *Contracecum* que parasitan peces antárticos. En esta tesis, se ha avanzado en la descripción de la biodiversidad de nematodos en la Antártica al incorporar información genética con 3 marcadores moleculares (ITS, *cox-2* y *ssu*) y en 3 especies de peces hospedadores intermediarios. Logrando identificar a nivel de especie una de las taxa obtenidas (clasificada preliminarmente como Sp2) la cual corresponde a *Anisakis simplex* C, mientras que las otras taxa encontradas corresponden a un miembro del género *Pseudoterranova*.

Cook *et al.* (2010) propone que la identificación de una nueva especie, debería realizarse siempre mediante datos genéticos, ya que datos morfológicos y genéticos no son excluyentes entre ellas, sino más bien favorecerían a una mejor identificación de nuevas especies. En este estudio, mediante el análisis morfológico se determinó que se estaba en presencia de los géneros *Pseudoterranova* y *Anisakis*.

Dzido *et al.*, (2009) reporta por primera vez la presencia de la especie *Anisakis simplex* C en los peces nototénidos, *Notothenia coriiceps* y *Notothenia rossii*. Desde la

base de datos del genbank se obtuvieron secuencias correspondientes al género *Anisakis* encontrados en hospedadores antárticos. Para el gen *ssu* se obtuvo una secuencia de *Anisakis sp.* (código de acceso U94365), que no presento sitios polimórficos con respecto a las secuencias obtenidas para el morfo 2 (Sp2). Del mismo modo, las secuencias obtenidas en este estudio con el marcador ITS no presentaron sitios polimórficos con respecto a la secuencia depositada en GenBank para la especie *Anisakis simplex C* (código de acceso JX535519). En conclusión, ambos marcadores indican que se está en presencia de taxa correspondiente a *Anisakis simplex C*.

En la reconstrucción basa en el marcador *ssu*, se encuentra la presencia de un clado conformado por seis secuencias obtenidas desde los morfo Sp2 para *Hapagifer antarcticus* y *Notothenia coriiceps*, estas secuencias se encuentran solo con este marcador, por lo que se necesita trabajar estas muestras con los otros dos marcadores (ITS y *cox2*) en estudio, para comprobar si se observa la formación de este mismo clado o si es un clado conformado solo con este marcador. Estas secuencias presentan 7 sitios polimórficos con respecto al clado conformado por tres secuencias del morfo Sp2 para *Notothenia coriiceps* y *Ansakis sp.* (obtenida desde genbank). Estas 6 secuencias podrían corresponder a taxa del género *Contracaecum*, del cual no se tiene información en bases de datos con este marcador, por lo que se hace importante obtención de secuencias con los otros marcadores en estudio, de los cuales si hay información en las bases de datos. Otra posibilidad es que este set de secuencias corresponda a una nueva taxa para el género *Anisakis* en la Antártica.

Para *Pseudoterranova*, también se obtuvieron secuencias del género para hospedadores antárticos. Para el gen *ssu*, la secuencia de *Pseudoterranova dicipiens* (código de acceso U94380) presentó un sitio polimórfico (i.e. una sustitución) con respecto a las secuencias del morfo Sp1 y Sp3; mientras que para el marcador ITS, la secuencia de *Pseudoterranova dicipiens E* (código de acceso KM273086), muestra la presencia de 17 sitios polimórficos con respecto a secuencias obtenidas para este estudio.

A partir del resultado de la red de haplotipos basada en el gen *cox-2* se observan dos grandes grupos separados por 48 mutaciones, uno corresponde a *Pseudoterranova* y el otro a *Anisakis simplex C*, confirmando lo que se ha resuelto con los otros marcadores. En el caso de *Pseudoterranova* sp. se secuenciaron 40 individuos reportándose 22 haplotipos con dos haplotipos de alta frecuencia localizados en todos los hospedadores y localidades mientras que los otros haplotipos son de menor frecuencia y distante solo un paso mutacional de los anteriores, sugiriendo alto flujo genético en las poblaciones de parásitos en la antártica. El gen *cox-2* es altamente polimórfico entre especies de anisakidos (Matuicci *et al.*, 2008; Timi *et al.*, 2014; Matuicci *et al.*, 2015), por lo mismo se puede utilizar en estudios futuros de estructura genética de poblaciones y en la filogeografía de estas especies.

8.1 Ciclo de vida.

Los resultados presentados en este trabajo mostraron la presencia de dos especies antárticas de nematodos correspondiente a los géneros *Pseudoterranova* (Krabbe 1878) y *Anisakis* (Dujardin 1845) en los tres peces (hospedadores) capturados

en las dos localidades de muestreo (Base Fildes y Rada Covadonga). Ambas especies de nematodos se encuentran en los tres hospedadores y en ambas zonas geográficas.

Existen factores que afectan la distribución y prevalencia de estos nematodos que a su vez se ven relacionados con el ciclo de vida de estos parásitos. Uno de los factores bióticos más importante es la distribución del hospedador definitivo, ya que este factor está en relación a la dispersión de los parásitos (Timi *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto, es que la proximidad de una población de hospedadores definitivo aumenta los niveles de parasitismo por *Pseudoterranova spp.* en peces (Timi *et al.*, 2014). Otro factor tiene relación con los hábitos ecológicos y la dieta de los diversos hospedadores en su ciclo de vida (Mattuicci *et al.*, 2015). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos factores y los hábitos alimenticios y ecológicos de los peces en estudio, además de la información recopilada en hospedadores definitivos antárticos, se puede proponer un posible ciclo de vida para las dos especies encontradas en este estudio (Figura 8). Debido a que peces *Notothenidos* tienen hábitos alimenticios omnívoros y oportunistas (Moreno *et al.*, 1980), se propone como primer hospedador intermediado a invertebrados bentónicos como anfípodos y poliquetos, como hospedadores intermediarios secundarios o paraténicos a *Notothenia rossii*, *Notothenia coriiceps* y *Hapagifer antarticus*, finalmente para completar el ciclo de vida, se propone como hospedador definitivo especies de pinnípidos como *Leptonychotes weddelli* y *Mirounga Leonina*.

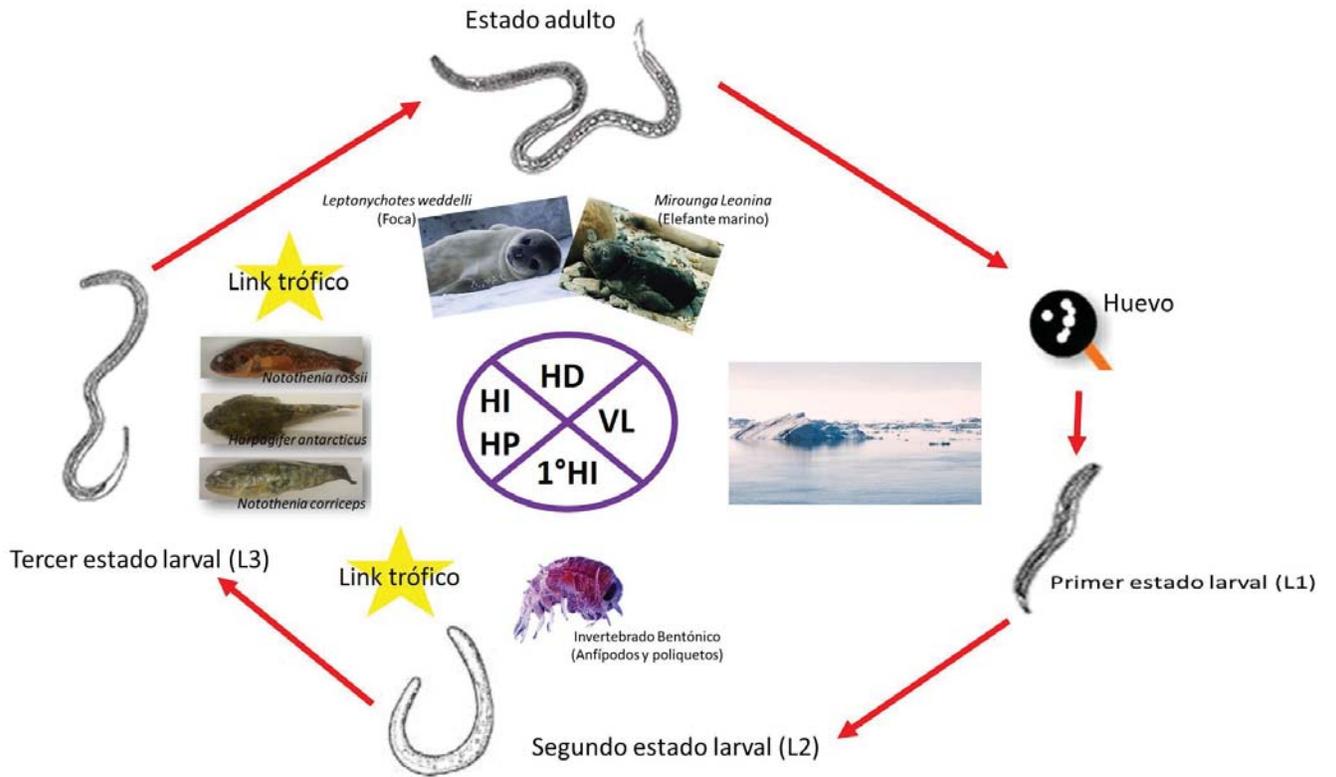


Figura 8. Representación esquemática de propuesta de ciclo de vida de nematodos *Pseudoterranova sp.* y *Anisakis sp.* encontrado en este estudio. HD= Hospesador definitivo, VL= Vida libre, 1°HI= Primer Hospesador intermediario, HI= Hospesador intermediario, HP= Hospesador paratenico.

8.2 Conclusión.

Del presente estudio se desprenden las siguientes conclusiones:

- A.** De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que las especies de peces antárticos *Notothenia coriiceps*, *Notothenia rossii* y *Harpagifer antarticus* comparten las mismas especies de parásitos nematodos.
- B.** Se determinó la presencia de un taxón ya reportado en la Antártica que corresponde a la especie de *Anisakis simplex C*, en *Notothenia coriiceps*.
- C.** Se informa la presencia, de una nueva especie del genero *Pseudoterranova*, que parasita a *Notothenia coriiceps*, *Notothenia rossii* y *Harpagifer antarticus*, que habita en ambas zonas geográficas en estudio.
- D.** Los datos obtenidos desde este estudio contribuyen al conocimiento con respecto a parásito de este grupo en el ecosistema de la Antártica.

9. Bibliografía.

Anderson, T. J., Blouin, M. S., & Beech, R. N. (1998). Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Advances in parasitology*, 41, 219-283.

Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. D. M. J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265.

Blasco-Costa, I., Cutmore, S. C., Miller, T. L., & Nolan, M. J. (2016). Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. *Systematic parasitology*, 93(3), 295-306.

Chown, S. L., Clarke, A., Fraser, C. I., Cary, S. C., Moon, K. L., & McGeoch, M. A. (2015). The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, 522(7557), 431-438.

Criscione, C. D., Poulin, R., & Blouin, M. S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular ecology*, 14(8), 2247-2257.

Cook, L. G., Edwards, R. D., Crisp, M. D., & Hardy, N. B. (2010). Need morphology always be required for new species descriptions?. *Invertebrate systematics*, 24(3), 322-326.

Diedrichs, C. (2007). Identificación de parásitos nemátodos del lobo fino antártico (*Arctocepalus gazella*) (Peters, 1875) en Cabo Shirreff, Isla Livingston, Antártica. Tesis Universidad Austral.

Dorris, M., De Ley, P., & Blaxter, M. L. (1999). Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology today*, 15(5), 188-193.

- Dzido, J., Kijewska, A., Rokicka, M., Świątalska-Kosedá, A., & Rokicki, J. (2009). Report on anisakid nematodes in polar regions—preliminary results. *Polar Science*, 3(3), 207-211.
- Feldman, C. R., & Spicer, G. S. (2002). Mitochondrial variation in sharp-tailed snakes (*Contia tenuis*): evidence of a cryptic species. *Journal of Herpetology*, 648-655.
- Gasser, R. B., & Hoste, H. (1995). Genetic markers for closely-related parasitic nematodes. *Molecular and cellular probes*, 9(5), 315-319.
- Hall, K. A., Cribb, T. H., & Barker, S. C. (1999). V4 region of small subunit rDNA indicates polyphyly of the Fellodistomidae (Digenea) which is supported by morphology and life-cycle data. *Systematic Parasitology*, 43(2), 81-92.
- Martins, M. L., Onaka, E. M., & Fenerick, J. (2005). Larval *Contraecaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhao, Brazil. *Veterinary parasitology*, 127(1), 51-59.
- Maslen, N. R., & Convey, P. (2006). Nematode diversity and distribution in the southern maritime Antarctic—clues to history?. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3141-3151.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Clanchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L., & Bullini, L. (1997). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *The Journal of parasitology*, 83(3), 401-416.

Mattiucci, S., & Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host—parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology*, 66, 47-148.

Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., & Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *The Journal of parasitology*, 100(2), 199-214.

Mattiucci, S., Cipriani, P., Paoletti, M., Nardi, V., Santoro, M., Bellisario, B., & Nascetti, G. (2015). Temporal stability of parasite distribution and genetic variability values of *Contracaecum osculatum* sp. D and *C. osculatum* sp. E (Nematoda: Anisakidae) from fish of the Ross Sea (Antarctica). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 356-367.

Montiel, A., Sosa, L., Medrano, C., & Romero, D. (1997). Nematodos fitoparásitos en plantaciones de plátano (*Musa AAB*) de la margen izquierda del río Chama, Estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 14(2).

Moreno, C. A., & Zamorano, J. H. (1980). Selección de los alimentos en *Notothenia coriiceps neglecta* del cinturón de macroalgas de Bahía South, Antártica. *Ser Cient Inst Antárt Chil*, 25(26), 33-44.

Palm, H. W., Reimann, N., Spindler, M., & Plötz, J. (1998). The role of the rock cod *Notothenia coriiceps* Richardson, 1844 in the life-cycle of Antarctic parasites. *Polar Biology*, 19(6), 399-406.

Poinar Jr, G. O. (1983). *The natural history of nematodes. The natural history of nematodes.*

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.

Rengifo-Herrera, C., Ferre, I., Ortega-Mora, L. M., Rojo-Montejo, S., García-Moreno, F. T., García-Párraga, D., & Pedraza-Díaz, S. (2014). Helminth parasites found in faecal samples of phocids from the Antarctic Peninsula. *Polar biology*, 37(5), 685-695.

Reeves, R., Stewart B. S., and Leatherwood, S. (1992) *The Sierra Club Handbook of Seals and Sirenians.* San Francisco, pp 359.

Rohde, K. (Ed.). (2005). *Marine parasitology.* Csiro Publishing.

Seesao, Y., Audebert, C., Verrez-Bagnis, V., Merlin, S., Jerome, M., Viscogliosi, E., & Gay, M. (2014). Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of Anisakidae nematodes. *Journal of microbiological methods*, 102, 69-72.

Sutin, N. (1977). Provided for non-commercial research and education use. Not for reproduction, distribution or commercial use!.

Stankovic, A., Spalik, K., Kamler, E., Borsuk, P., & Weglenski, P. (2002). Recent origin of sub-Antarctic notothenioids. *Polar Biology*, 25(3), 203-205.

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(3), 512-526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

Timi, J. T., Paoletti, M., Cimmaruta, R., Lanfranchi, A. L., Alarcos, A. J., Garbin, L., ... & Mattiucci, S. (2014). Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Veterinary parasitology*, 199(1), 59-72.

Valderrama-Aravena, N., Pérez-Araneda, K., Avaria-Llautureo, J., Hernández, C. E., Lee, M., & Brante, A. (2014). Diversidad de nematodos marinos de Chile continental y antártico: una evaluación morfológica y molecular. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(1), 147-155.

Walter, T., Palm, H., Piepiorka, S., & Rückert, S. (2002). Parasites of the Antarctic rattail *Macrourus whitsoni* (Regan, 1913) (Macrouridae, Gadiformes). *Polar Biology*, 25(9), 633-640.

Wasmuth, J., Schmid, R., Hedley, A., & Blaxter, M. (2008). On the extent and origins of genic novelty in the phylum Nematoda. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(7), e258.