

**BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL OCTOCORAL
ANTITROPICAL DE PROFUNDIDAD *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758)**

Claudia Liliana Agudelo Piñeros

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR MARINA, BIOMMAR
2008**

**BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL OCTOCORAL
ANTITROPICAL DE PROFUNDIDAD *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758)**

**TRABAJO DE GRADO PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN
BIOLOGÍA**

Presentado por:

Claudia Liliana Agudelo Piñeros

Director

Juan Armando Sánchez Muñoz. Ph.D.

Profesor Asociado

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR MARINA, BIOMMAR
2008**

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	1
PREFACIO.....	2
PRIMER AISLAMIENTO DE LOCI MICROSATÉLITES PARA EL OCTOCORAL ANTITROPICAL DE PROFUNDIDAD <i>Paragorgia arborea</i> (Linnaeus, 1758)	4
EVOLUCIÓN EN CONCIERTO A UNA ESCALA GLOBAL: EL ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO 2 (ITS2) EN EL OCTOCORAL ANTITROPICAL DE PROFUNDIDAD <i>Paragorgia arborea</i> (Linnaeus, 1758)	
Introducción	12
Métodos	14
Resultados	15
Discusión	18
Agradecimientos	20
Referencias	20

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A Dios por mi vida y por la oportunidad que me dio de continuar mi formación profesional.

A mi esposo Mauricio por su respaldo en cada uno de los pasos que di durante este proceso y en mi vida personal. Por ser mi fuerza en los momentos de dificultades.

A mis padres Gladys y Armando y mi hermana Catalina por su apoyo tanto en mi vida académica como en mi vida personal.

A mi director de tesis Juan Armando Sánchez por su apoyo durante la realización de mi trabajo de grado y sus oportunas correcciones. Por su respaldo en los momentos difíciles durante este proceso y por abrirme las puertas a mi crecimiento profesional.

A Marthica por su incondicional ayuda y enseñanzas que junto con mis compañeros del grupo de microsatélites Victor y Kmi me permitieron sacar adelante este proyecto a pesar de las dificultades en el camino. A santi por su ayuda y aportes que permitieron el desarrollo de este proyecto

A cada uno de los integrantes de BIOMMAR por su apoyo, consejos y ayuda y al LAMFU y cada uno de sus integrantes, en especial a Adriana Bernal por su apoyo y conocimientos en los protocolos.

A Carlitos Mora y Mauricio por su ayuda en el secuenciador y el documentador.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, el Laboratorio de Biología Molecular Marina BIOMMAR y Colciencias por su apoyo y financiación de este proyecto. Al *Smithsonian National Museum of Natural History-NMNH collection* (Washington, DC, USA) y *National Institute of Water & Atmospheric Research* (NIWA, New Zealand), por proporcionarnos el material genético y por su colaboración.

Y a cada uno de los que de alguna forma colaboraron en el desarrollo y culminación de este trabajo.

PREFACIO

Recientemente la comunidad científica ha despertado el interés en conocer y explorar los ambientes marinos extremos, encontrando una gran diversidad de especies que viven a grandes profundidades y con distribuciones bastante heterogéneas. Esto ha motivado el desarrollo de nuevas tecnologías y herramientas que han permitido el estudio de varios aspectos de su biología como en el caso de los corales de profundidad.

Paragorgia arborea (Linnaeus, 1758), es un coral de profundidad presente en todos los océanos del mundo, excluyendo los trópicos, donde se encuentra distribuido hacia los polos en un rango de profundidades bastante amplio (50-3000 m). Hasta hace pocos años, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como los VORs (Vehículos operados a control remoto) y la posibilidad de realizar arrastres de trineo bentónico a mayores profundidades, se ha conocido más sobre su hábitat, distribución, y crecimiento. Sin embargo, pocos estudios se han reportado a nivel filogeográfico y sistemático.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento científico de esta especie, teniendo una de las distribuciones mas disparatadas entre todos los invertebrados marinos y además siendo un organismo de profundidad muy vulnerable ante las actividades de las pesquerías de arrastre, se realizó la búsqueda de marcadores moleculares para obtener herramientas que permitan inferir relaciones a diferentes niveles taxonómicos y poder establecer información evolutiva, genética y ecológica con propósitos de conservación.

Una de las herramientas moleculares que ha cobrado gran fuerza debido a la información que puede proporcionar a diferentes escalas taxonómicas, a pesar de la dificultad y costos que implica su aislamiento y más aún si no se tiene un ADN inicial de buena calidad, son las secuencias microsatélites o SSRs que se encuentran distribuidas con alta frecuencia tanto en regiones codificantes como

no-codificantes del genoma nuclear y en su mayoría son especie-específicas. Es por esta razón que en este trabajo se realizó por primera vez el aislamiento de 3 loci microsatélites para la especie *P. arborea*, mediante el protocolo FIASCO, abriendo la puerta para el conocimiento de su biología y genética.

Continuando con la búsqueda de herramientas moleculares para futuros estudios de esta especie, se obtuvieron secuencias del ITS2 ADNr, que es uno de los pocos genes nucleares que presenta variación en octocorales y aunque se ha demostrado en numerosos estudios que en general puede presentar múltiples copias para un individuo, se encontró que *P. arborea*, presenta una única copia, producto de la homogenización causada por la evolución concertada, con 8 haplotipos distribuidos a nivel global sin ningún patrón de distribución geográfica. Esto permite disminuir el ruido de variación intragenómica al momento de establecer relaciones filogenéticas.

Finalmente, es importante recalcar que el desarrollar estas nuevas herramientas moleculares para esta especie permitirá corroborar resultados obtenidos empleando genes mitocondriales, en investigaciones en curso, y desarrollar estudios que resuelvan preguntas ecológicas y demográficas a una escala más fina. Sin embargo, está claro que es necesario continuar este trabajo con la genotipificación de los loci microsatélites aislados e intentar un nuevo aislamiento, empleando diferentes enzimas de restricción, para tener una cantidad considerable de microsatélites polimórficos que permitan realizar estudios poblacionales y genéticos, y junto con los datos obtenidos con secuencias de distintos genes a diferentes niveles taxonómicos, poder establecer resultados claves para la conservación de esta especie.

Primer aislamiento de loci microsátélites para el octocoral antitropical de profundidad *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758)

Aunque la existencia de corales de aguas profundas ha sido conocida hace bastante tiempo (ver revisión en Roberts *et al.*, 2006), solo hasta hace poco se ha incrementado el interés por explorar este tipo de ambientes. Todo esto, gracias al reciente desarrollo y popularización de tecnologías como los vehículos operados a control remoto (ROVs por su sigla en inglés) y los sumergibles, que han permitido la exploración a grandes profundidades. Debido a esto, poco se ha conocido acerca de las especies de corales de profundidad y menos aún de su reproducción e historia de vida, siendo este un aspecto muy importante para el entendimiento de la biodiversidad en grandes profundidades (Roberts *et al.*, 2006). Este es el caso de *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758), un octocoral de profundidad con una distribución antitropical fuera de lo común, habitante de todos los océanos del mundo (Mortensen & Mortensen, 2005; Broch, 1957) entre 50- 3000 m de profundidad (Mortensen & Mortensen, 2004; Strycher, 2005). Actualmente, pocos estudios enfocados a esta especie se han realizado. Sin embargo, se han publicado algunos aspectos de su morfología, crecimiento (Mortensen & Mortensen, 2005; Sánchez, 2005) y distribución (Broch, 1957; Tendal, 1992). Muy poco se ha trabajado sobre la diversidad genética y conectividad poblacional de estos corales, a pesar del reciente incremento de las pesquerías y el muestreo en hábitats de profundidad (Sánchez, 2005). Por esta razón y más aún con el interés de indagar sobre la extraordinaria y disparatada distribución de esta especie de coral, es necesario el desarrollo de herramientas moleculares para poblaciones de corales de aguas frías como un acercamiento eficaz para hacer posible el estudio de estos aspectos hasta ahora desconocidos o poco estudiados (Roberts *et al.*, 2006).

Los marcadores microsátélites o secuencias simples repetitivas (SSRs por su sigla en inglés) se han convertido en una poderosa e importante herramienta molecular para trabajar a diferentes escalas taxonómicas. Son secuencias

repetidas en tandem presentes en regiones codificantes y no-codificantes del genoma nuclear de la mayoría de taxa y aparecen con una alta frecuencia (Selkoe & Toonen, 2006). Los microsatélites tienen los componentes más deseados para un marcador genético que permita realizar estudios de diversidad genética y genética poblacional, como ser muy polimórficos, co-dominantes, sus alelos se designan sin ambigüedad, de evolución generalmente neutral, y son altamente replicables, además de fácil amplificación y automatización por PCR (Selkoe & Toonen, 2006). No obstante, estos marcadores son en general especie-específicos y por esta razón su desarrollo y aislamiento debe hacerse de *novo* para cada especie (Zane et al., 2002). Además, para su aislamiento es indispensable tener ADN de alta calidad (Ceron-Souza et al. 2006) y para especies de corales como los acropóridos existen reportes de las dificultades que se han presentado para su aislamiento (Marquez *et al.*, 2000).

Dada la importancia de esta herramienta para realizar estudios que permitan el conocimiento y posterior conservación de esta especie de coral, y a pesar de las dificultades que puedan presentarse en el aislamiento para este tipo de corales, partiendo de un ADN degradado, reportamos por primera vez el aislamiento de tres loci microsatélites para el coral gorgonáceo *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758), como una puerta para ampliar el conocimiento acerca de su biología y genética.

Se obtuvieron muestras de ADN de *Paragorgia arborea* de diferentes localidades del Océano Atlántico Norte, Océano Pacífico Norte y Océano Atlántico Sur, provenientes de museos como *Smithsonian National Museum of Natural History-NMNH collection* (Washington, DC, USA), que fueron extraídas por medio de extracción automática con fenol-dorofomo en el robot AutoGene965, y del *National Institute of Water & Atmospheric Research* (NIWA, New Zealand) cuya extracción se hizo siguiendo el protocolo propuesto por Coffroth *et al.* (1992).

El aislamiento de los loci microsatélites fue basado en el protocolo FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) desarrollado por Zane *et al.* (2002), que en términos generales es un método simple y rápido en el cual se han eliminado pasos innecesarios de protocolos anteriores. Consistió en una digestión de 250-500ng de ADN total genómico, de un individuo de la especie, con la enzima de restricción *MseI* y simultáneamente una ligación con adaptadores *MseI*-AFLP (5'-TACTCAGGACTCAT-3'/5'-ACGATGAGTCCTGAG-3') usando *T4*. La mezcla obtenida de la reacción digestión-ligación fue diluida (1:10) y amplificada con el primer *MseI*-N (5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3') por 14, 17, 20, 23 y 26 ciclos siguiendo el protocolo FIASCO y se escogió el mejor ciclo de amplificación. La hibridización se realizó usando las sondas biotiniladas (TAGA)₆, (TAGC)₆, (AAAT)₆, y (AAT)₈, y para capturar selectivamente el complejo ADN+Sonda se usaron partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina (*Promega*). Se realizaron tres lavados no-astringentes y tres astringentes como está descrito en Zane *et al.* (2002). El ADN recuperado del último lavado astringente, el último lavado no astringente y los pasos de denaturación, fue amplificado por una reacción PCR y luego usado para generar una librería genómica de microsatélites clonando en el vector pCR2.1-TOPO, usando el Kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

Se obtuvieron 23 clones positivos (blancos) y fueron amplificados por PCR usando primers *M13* (5'-CTGGCCGTCGTTTTAC-3'/5'-CAGGAAACAGCTATGAC3'). Para obtener las secuencias de los clones que contenían el inserto, se usó el kit BigDyeTM Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado ABI 310 (Applied Biosystems).

Tabla 1*. Características para 3 loci microsatélites aislados del octocoral de profundidad *Paragorgia arborea*.

Locus	Repetición	Primers	MgCl ₂	Ta	Rango	A
Parb4-1	(GC) ₄	F: TACTTTGAGTGGAGCTTGCCA R: CTCGTTCAATTCTAGCTCTCCAA	3.0	60	205	1
Parb1-3	(AT) ₉	F: ACATTCGGGTTATCACCAGC R: TCTTTCGCTTCAACCGTACC	3.0	54.5	275 – 283	5
Parb1-11	(AAGT) ₁₁ (AAGTGAGT) ₄ (GAGT) ₁₆	-	-	-	282	-

*La información incluida en la tabla corresponde al nombre del locus, motivo de la repetición observada en el don, secuencias de primers 5' – 3' forward (F) y reverse (R), concentración de MgCl₂ (mM) para amplificación por PCR, temperatura de anillaje °C, rango de tamaños del producto y número de alelos. Los alelos fueron determinados en una población de 10 individuos de *Paragorgia arborea*.

De los 23 dones positivos obtenidos, únicamente 4 contenían una secuencia repetida en tandem . Para el diseño de los pares de primers de estas secuencias se emplearon los software FastPCR (Kalendar, 2008) y Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (Tabla 1). Se lograron diseñar para dos de los loci (Parb4-1 y Parb1-3) los primers correctamente y fueron probados en 10 individuos de una misma población. Para el locus Parb4-1 solamente se encontró un polimorfismo mientras que para el Parb1-3 se encontraron 5 polimorfismos. Esto permite deducir que esta última puede ser una secuencia polimórfica que permitirá inferir datos genéticos de estas poblaciones en investigaciones futuras. No obstante, dos de las secuencias obtenidas (no contenían una región flanqueante que permitiera el diseño de primers para amplificarlos; por esta razón se intentó la recuperación de esta región mediante PCR inverso (IPCR), que es un método de amplificación rápida *in vitro* de secuencias de ADN que flanquean una región de secuencia conocida (Ochman *et al.*,1988). Este método usa la reacción de PCR pero con primers orientados en la dirección opuesta a la dirección original y permite la amplificación de la región flanqueante del extremo 5', 3' o ambos. Para nuestro caso se buscó recuperar ambos extremos; con este fin se realizó una digestión del ADN total con las enzimas de restricción *CfoI* y *MspI* (Promega) que no tienen sitios de corte dentro de nuestra secuencia conocida (Secuencia repetida en tandem). Posteriormente se realizó la circularización de

los fragmentos obtenidos con ligasa *T4* (Promega) y empleando los primers diseñados orientados en la dirección reversa a la original (1-11F 5'-CCTGACTCAGGACTTATC-3'/1-11R 5'-GTTACTCAGGACTCATCA-3' y S3F 5'-CTCAGGACTCATCAATCG-3'/S3R 5'-TTTTACTCAGGACTCATCA-3'), de tal forma que la extensión ocurre hacia afuera de la región central. Se realizó una reacción de PCR con un volumen final de 20ul (Buffer PCR 1X, dNTPs 0.2mM, MgCl₂ 3mM, Taq polimerasa 0.5U, primer 0.15uM; Promega) empleando el siguiente programa de amplificación: 94°C por 2min, 30 ciclos de 94° por 30s, 47.7° por 1min, 72° por 4 min y una extensión final de 72°C por 10min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de poliacrilamida (8%, TBE 1X, 150V, 45min) y las diferentes bandas obtenidas fueron cortadas, reamplificadas bajo las mismas condiciones y secuenciadas. Se diseñaron de nuevo primers en el sentido 5'- 3' original para amplificar la región repetitiva en diferentes individuos. Sin embargo, no fue posible recuperar la región flanqueante empleando esta técnica aunque se obtuvieron secuencias de nuevas regiones genómicas en *P. arborea*, y una secuencia repetitiva minisatélite de 21bp que al poder obtener su región flanqueante podría contener información valiosa para esta especie (ver anexos).

Para continuar el proceso de la obtención de esta importante herramienta molecular, es necesario recuperar las regiones flanqueantes de las secuencias repetitivas obtenidas en este trabajo para *Paragorgia arborea* mediante IPCR empleando varias enzimas de restricción que no tengan sitio de corte dentro de la secuencia conocida, así como intentar una nueva clonación con una mayor eficiencia que permita obtener un número mayor de clones y así nuevas secuencias repetitivas. Sin embargo, es importante resaltar que pese a que solo se pudo aislar 3 loci microsatélites en esta primera aproximación, este es un resultado muy significativo para esta especie poco estudiada, teniendo en cuenta las grandes dificultades que se presentaron, la baja eficiencia de la clonación y la dificultad que se ha presentado en otros corales para su aislamiento como lo reportan Márquez *et al.* (2000), quienes intentaron el

aislamiento de microsatélites en acropóridos empleando 6 diferentes técnicas como detección convencional de dones en librerías genómicas, enriquecimiento de microsatélites mediante cromatografía de afinidad, “strand extension” usando sondas marcadas con biotina, PCR con microsatélites sintéticos y aislamientos de fragmentos RAPD, y únicamente lograron aislar 1 locus microsatélite.

Finalmente, es necesario realizar la genotipificación con los loci obtenidos, en varias poblaciones, para determinar el grado de polimorfismo y heterocigosidad de estos. Esto permitirá responder interrogantes con relación al flujo genético y poder determinar si las poblaciones boreales y australes de *P.arborea* están o no conectadas genéticamente, saber si existe un flujo genético suficiente para que no exista estructura suficiente entre las poblaciones del Norte y del Sur y poder establecer otros aspectos claves de su ecología y genética con propósitos de conservación

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, el Laboratorio de Biología Molecular Marina, BIOMMAR y COLCIENCIAS por su apoyo y financiación de este proyecto. Al *Smithsonian National Museum of Natural History-NMNH collection* (Washington, DC, USA) y *National Institute of Water & Atmospheric Research* (NIWA, New Zealand), por proporcionarnos el material genético y por su colaboración. Y al Laboratorio de Micología y Fitopatología LAMFU, en especial a Adriana Bernal por su apoyo en los protocolos.

Referencias

- Broch, H. (1957) The Northern Octocoral, *Paragorgia arborea* (L.), in Subantarctic Waters. *Nature* 179 : 1356
- Cerón-Souza, I. Rivera-Ocasio, E., Funk, S.M. & Mcmillan, W. O. (2006). Development of six microsatellite loci for black mangrove (*Avicennia germinans*). *Molecular Ecology Notes*, 6: 692–694

- Coffroth, M.A., Lasker, H.R., Diamond, M.E., Bruenn, J.A., Bermingham, E. (1992) DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for detecting clonal structure in a vegetative species. *Mar Biol.* 114: 317-325
- Kalendar, R. (2008) FastPCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. (www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm)
- Márquez, L. M., MacKenzie, J.B., Takabayashi, M., Smith, C.R., Chen, C.A., (2000). Difficulties in obtaining microsatellites from acroporid corals. *Proceedings 9 International Coral Reef Symposium. Bali, Indonesia I*: 139-143
- Mortensen, P. & Mortensen, L.B. (2005) Morphology and growth of the deep-water gorgonians *Primnoa resedaeformis* and *Paragorgia arborea*. *Marine Biology* 147 : 775-788
- Ochman, H., Gerber, A., Hartl, D., (1988). Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. *Genetics*. 120: 621-623.
- Roberts, J.M., Wheeler, A.J., Freiwald, A. (2006) Reefs of the Deep : The Biology and Geology of Cold-Water Coral Ecosystems. *Science* 312 : 543
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. *Humana Press*, Totowa, NJ, pp 365 – 386
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide using and evaluating microsatellites markers. *Ecology Letters* 9: 615 – 629
- Sánchez, J.A. (2005) Systematics of the bubblegum corals (Cnidaria : Octocorallia : Paragorgiidae) with description of new species from New Zealand and the Eastern Pacific. *Zootaxa* 1014 :1-72
- Tendal, O.S. (1992) The North Atlantic distribution of the octocoral *Paragorgia arborea* (L.,1758) (Cnidaria, Anthozoa). *Sarsia* 77 : 213-217
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1 – 16

ANEXOS

Tabla 2*. Características de los *primers* diseñados para diferentes loci de *P.arborea* como resultado de la reacción IPCR.

	Primer	MgCl₂	Ta	Rango
P.arbS3-1	F: CGATTGATGAGTTCCTGAGTA R: TGGTGGCATGCCTTATATGT	3.0	57.4	250 - 300bp
P.arb1-11-1	F: GATGAGTCCTGAGTCAGGGT R: GCGATGAGTCCTGAG	3.0	42.5	600 - 650 bp
P.arbS3-2	F: CGATTGATGAGTTCCTGAGTA R: ACTAGTGATTGATGAGTCCTG	3.0	53.7	250 - 300bp
P.arb1-11-2	F: ACATTCGGGTTATCACCAGC R: TCTTTCGCTTCAACCGTACC	3.0	55.0	250 -300bp
P.arb1-2-1	F: CCTGAGTAAGGCCGTCTTTG R: CGCGGATGAGTCCTGAG	3.0	46.7	300 - 400bp
P.arb1-2-2	F: CCTGAGTAAGGCCGTCTTTG R: GATGAGTCCTGAGTAATAC	3.0	46.0	450 -500bp
P.arb1-11-3	F: GATGAGTCCTGAGTAACTTAC R: GATGAGTCCTGAGTAAGGGT	3.0	51.6	300 - 350bp

*Secuencias de primers 5' – 3' forward (F) y reverse (R), concentración de MgCl₂ (mM), temperatura de anillaje °C, rango de tñamos de los productos obtenidos.

Tabla 3*. Características de la secuencia minisatélite obtenida para el octocoral de profundidad *Paragorgia arborea*.

Locus	Repetición	MgCl₂	Ta	Rango	A
ParbS3	(AAAATAAAAAGTTGAAACGC) ₁₁	-	-	276	-

*La información incluida en la tabla corresponde al nombre del locus, motivo de la repetición observada en el don, rango de tamaños del producto obtenido en el don.

Evolución en concierto a una escala global: el espaciador transcrito interno 2 (ITS2) en el octocoral antitropical de profundidad *Paragorgia arborea* (Linnaeus, 1758)

Diversos estudios han reportado la alta variabilidad que presenta la región del espaciador transcrito interno 2 (ITS2 por su sigla en inglés) en especies de octocorales en algunos casos incluso a nivel intra-específico e intra-genómico con múltiples copias del gen en un mismo individuo (Aguilar & Sánchez, 2007a; Sánchez & Dorado, 2008; Granados *et al.*, unpubl.; Manrique *et al.*, unpubl). El ITS2 ha sido empleado comúnmente para realizar análisis filogenéticos a nivel de género y especie (Coleman, 2003) e incluso parece tener información valiosa para realizar inferencias filogenéticas a niveles más altos como familia y orden al utilizarse su estructura secundaria (Coleman, 2003; Schlotterer, 1994). Sin embargo, es conocido que el ITS2, una región ribosomal nuclear organizada en tandem, presente en todos los eucariotas, está sujeta a evolución concertada (Coleman, 2003; Ainouche & Bayer, 1997; Liao, 1999). Este es un proceso de homogenización de secuencias repetitivas de ADNr que ocurre mediante mecanismos como conversión génica y/o entrecruzamiento desigual (revisado por Elder & Turner, 1995; Álvarez & Wendel, 2003), permitiendo que múltiples copias de un mismo gen tiendan a homogenizarse en una sola copia, de tal forma que la similaridad intra-específica sea mayor. De esta manera, en algunas especies de octocorales donde los individuos presentan varias copias diferentes de este gen, el proceso de evolución en concierto parece aún no completarse por razones aún desconocidas.

Paragorgia arborea (Linnaeus, 1758) es uno de los pocos octocorales en el mundo con una distribución extraordinaria, solamente antitropical en aguas profundas. Esta característica lo convierte en una especie deseable para desarrollar estudios a diferentes niveles por las siguientes razones; es un coral de profundidad, presente en todos los océanos del mundo con una distribución hacia los polos (Horridg, 1956; Broch and Horridge, 1957; Tendal, 1992), en un

rango de profundidades muy amplio (50-3000 m, 3° a 8°C) (Mortensen & Mortensen, 2004; Strycher, 2005) pero sin presencia tropical en aguas profunda. Este octocoral se caracteriza por su morfología arborescente y su gran tamaño (más de 3m de alto y 7m de ancho), lo que lo hace bastante vulnerable a los disturbios y a las actividades de pesquería de arrastre (e.g., Heifetz, 2002). Gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como los vehículos operados a control remoto (VORs) que han superado la barrera de las profundidades, ha sido posible acceder a imágenes y muestras de diferentes especímenes, permitiendo ampliar el conocimiento de aspectos como su morfología, crecimiento (Mortensen & Mortensen, 2004) y distribución (Broch, 1957; Tendal, 1992) reportados previamente. Sin embargo, poco se ha reportado a nivel filogeográfico y sistemático (Sánchez, 2005). Reportes de un estudio realizado con secuencias de 18S ADNr, revelan diferencias y similitudes entre especímenes de *P.arborea* distribuidas en diferentes localidades (Strycher, 2005), e investigaciones en curso con marcadores mitocondriales (COI, ND2 y 16S) muestran a *P.arborea* como la única especie monofilética de este género (Santiago Herrera, pers. comm.).

¿Estarán las poblaciones boreales y australes de *P. arborea* conectadas genéticamente? ¿Es el flujo genético suficiente como para no presentar estructura genética entre Norte y Sur? Para contestar estos interrogantes y teniendo en cuenta la importancia de estudiar este octocoral para establecer aspectos claves de su ecología, evolución y sistemática con propósitos de conservación, fue necesaria la búsqueda de una región universal de ADN que proporcionara información valiosa y permitiera corroborar los datos encontrados con marcadores mitocondriales. Para esto, la región del ITS2 se convirtió en un buen candidato basándose en los antecedentes de variación obtenidos para los octocorales. Partiendo de esto, el objetivo de este estudio fue determinar el nivel de variación intra-genómica e intra-específica de la región del ITS2 para la especie *P.arborea* analizando secuencias de ADN de diferentes individuos,

como una herramienta para establecer su utilidad en futuros análisis moleculares a diferentes escalas taxonómicas.

Métodos

Se obtuvieron muestras de *Paragorgia arborea* para diferentes localidades del Océano Atlántico Norte, Océano Pacífico Norte y Océano Atlántico Sur, provenientes de museos como *Smithsonian National Museum of Natural History-NMNH collection* (Washington, DC, USA), que fueron extraídas por medio de extracción automática con fenol-cloroformo en el robot AutoGene965, y del *National Institute of Water & Atmospheric Research* (NIWA, New Zealand) cuya extracción se hizo siguiendo el protocolo propuesto por Coffroth *et al.* (1992). Este protocolo consiste en una lisis de células con CTAB, seguida de una digestión de proteínas con proteinasa K. La purificación del ADN se realiza con fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol (25:24:1) y Cloroformo: Isoamil alcohol (24:1), y luego se precipita con etanol al 96% y 70%. Finalmente el ADN es resuspendido en buffer TE y almacenado a -80°C. La extracción se visualizó en geles de agarosa para confirmar la calidad de ADN (0.8%, TBE 0.5X, 80V, 30min).

Se realizó una reacción de PCR con un volumen final de 15ul (Buffer PCR 1X, dNTPs 0.2mM, MgCl₂ 3mM, Taq polimerasa 1U, primer 0.15uM. Reactivos PROMEGA), usando los *primers* diseñados por Aguilar y Sánchez (2007a) (5.8S-436 5' AGC ATG TCT GTC TGAGTG TTG G 3' and 28S-663 5' GGG TAA TCT TGC CTG ATC TGA G 3'). El programa de amplificación consistió en: 1 ciclo de 94°C por 2min, 35 ciclos de 94° por 30s, 55.7° por 1min, 72° por 1 min y una extensión final de 72°C por 2min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa (1%, TBE 0.5X, 110V, 30min), purificados con Exosap (Fermentas) y secuenciados directamente por ambos sentidos (5' y 3') usando el Kit BigDye 3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado ABI 310 (Applied Biosystems).

Todas las secuencias fueron ensambladas usando el software Geneious 3.6.1 (Biomatters Ltd.) y fueron alineadas en *Muscle* (Edgar, 2004). Adicionalmente, se hicieron predicciones de estructuras secundarias basadas en el modelo de *Corallium reginae* para ITS2 (Ardila & Sánchez, en preparación), usando las regiones conservadas para doblar la estructura en el servidor MFold (Zuker, 2003). Esto permitió corroborar que las secuencias obtenidas no mostraran inserciones o deleciones que pudieran impedir la formación de algunas hélices y por lo tanto, al menos en teoría, impedir la funcionalidad del gen.

Para determinar el nivel de flujo genético entre la población del norte (Océano Atlántico Norte, Océano Pacífico Norte) y la población del sur (Océano Atlántico Sur), se usó el índice de fijación (F_{ST}) (Hudson *et al.* 1992) a partir de los haplotipos encontrados, disponible en el software DnaSP (Rozas *et al.* 2003). Los indels fueron tomados como quinta base, y para evaluar la significancia de los valores F_{ST} se realizaron 1000 permutaciones de haplotipos entre poblaciones (población norte y población sur)

Resultados

La amplificación por PCR de muestras de individuos de *P.arborea* distribuidas en diferentes localidades (norte–sur) a nivel global, evidenció una sola banda reflejo de la presencia de una sola copia del gen ITS2 en los individuos de esta especie. Esto fue corroborado con secuenciación directa de estos amplificados, obteniendo un 99% de eficiencia en la secuenciación. Se obtuvieron 4 polimorfismos cuyas combinaciones resultaron en 8 haplotipos diferentes en *P. arborea* (Tabla1).

Tabla 1. Distribución de haplotipos en el gen nuclear ITS2 para individuos de *Paragorgia arborea*.

Posición en el consenso (299bp)		1 2 2 2 9 0 6 7 2 4 2	
Consenso Haplotipos	Frecuencia	T A T T	Localidades
H1	4	- • - •	Pacífico Norte, Atlántico Norte
H2	1	• • - -	Atlántico Sur
H3	1	- • • -	Pacífico Norte
H4	1	• • - •	Pacífico Norte
H5	2	- - - -	Atlántico Norte
H6	1	- - • -	Atlántico Norte
H7	11	• - • -	Pacífico Norte, Atlántico Norte, Atlántico Sur
H8	6	• - - -	Pacífico Norte, Atlántico Norte

La posición del cambio en los haplotipos está numerada en columnas verticales de acuerdo a la secuencia consenso. Las localidades corresponden a la distribución de los haplotipos de la especie.

Los haplotipos encontrados se distribuyeron a nivel global tanto en el norte como en el sur. Sin embargo, en la población del sur únicamente se presentan dos de estos (Fig.1). El estimativo F_{ST} (Hudson *et al.* 1992), que indica la cantidad de diferenciación genética entre poblaciones basada en frecuencias de alelos, evidenció significativamente la presencia de estructura poblacional ($F_{ST}=0.32072$; $P<0.01$) al comparar las poblaciones norte (Océano Pacífico Norte y Océano Atlántico Norte) y sur (Océano Atlántico Sur), con un número de migrantes por generación $Nm= 0.53$.



Fig.1. Mapa de distribución de los haplotipos encontrados para el gen ITS2 en individuos de *P.arborea*. Los haplotipos están marcados como H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 respectivamente. Cada las estrellas de un mismo color muestran la frecuencia del haplotipo.

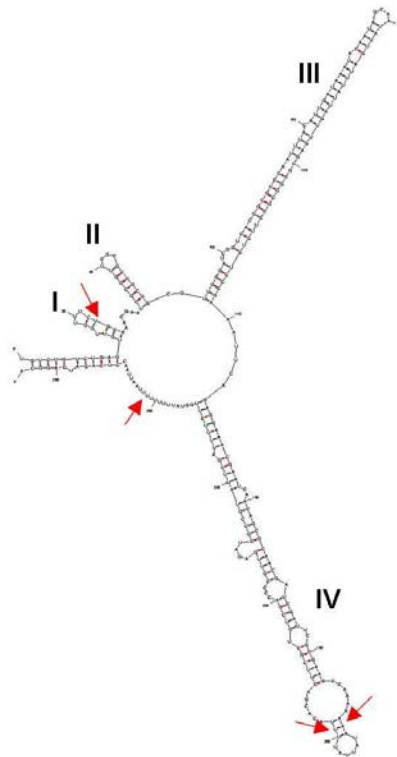


Fig.2. Estructura secundaria predicha de ITS2 para *P.arborea*. Las flechas indican las posiciones donde ocurren los cambios de longitud por la inserción o deleción de una base nudeotídica según el haplotipo. Cada hélice está numerada I,II, III y IV respectivamente

Discusión

A pesar de la sorprendente variación que puede llegar a presentar la región del ITS2 en algunas especies de octocorales, en otras parece que el proceso de evolución en concierto ha logrado completarse como en el caso de *P.arborea*, que fue nuestra especie de estudio, donde encontramos una única copia del ITS2 para cada individuo estudiado, y 8 haplotipos dados por 4 polimorfismos, en una población a nivel global. Esto demostró niveles muy bajos de variación intra-genómica e intra-específica para esta especie tal como podría esperarse para un gen de ADNr, de acuerdo a estudios realizados para evaluar el nivel de variación dentro de esta región ribosomal que han reportado una muy baja variación dada por evolución concertada logrando una homogenización eficiente para mantener las repeticiones casi idénticas (Gangley & Kobayashi, 2007). Este mecanismo de homogenización al parecer hace parte de un requerimiento de la célula para mantener una homogeneidad de secuencias dentro de las familias multigenes como esta (Liao, 1999). Una de las formas más simples utilizadas para corroborar la baja variación como se pudo observar para esta especie, es la secuenciación directa bajo el supuesto que una secuenciación exitosa indicaría que no hay variación del ADNr del individuo (Hunter, 1997). Partiendo de esto y teniendo en cuenta que evolución concertada incompleta puede ser responsable de la variación a nivel intra-específico e intra-genómico, tal como se ha estudiado en plantas (Alvarez & Wendel, 2003), es posible asumir que en *P.arborea* ocurrió una homogenización de las copias gracias al proceso de evolución concertada dada la variación intragenómica baja que presenta para este gen (Gangley & Kobayashi, 2007). Por otro lado, es claro que *P. arborea*, una especie establecida por todo el mundo, sea una especie con antigüedad suficiente para que el proceso de evolución en concierto se haya completado a una tasa mayor que la de generación de mutaciones.

La presencia de los 8 haplotipos en *P. arborea* y su distribución permitió visualizar el alto nivel de estructura poblacional norte-sur para esta especie. Esto

era algo que podría esperarse teniendo en cuenta las enormes barreras geográficas a las que está sometida por su distribución atípica a nivel global hacia los polos, excluyendo los trópicos (Horridg, 1956; Broch & Horridge, 1957; Tendal, 1992). Esa falta de flujo genético al parecer ha permitido en esta especie que exista un alto grado de homogenización de los haplotipos en poblaciones que están aisladas. Sin embargo, esto debería corroborarse con análisis de coalescencia que permitan determinar la dirección del flujo existente entre las poblaciones de *P.arborea*, las tasas de migración y el tiempo de divergencia entre las diferentes poblaciones (e.g., Lessios & Robertson, 2006). Entre las poblaciones del norte al parecer aún sigue habiendo flujo y por lo tanto no se presenta ninguna correspondencia aparente de los haplotipos presentes con alguna región geográfica.

Finalmente, las estructuras secundarias predichas para los haplotipos de esta especie presentaron las características reportadas previamente (e.g., Aguilar & Sánchez, 2007a; 2007b) para estructuras en ribosomas, con un anillo helicoidal rodeado de 5 hélices para este caso. Sin embargo, aunque en especies de octocorales se ha encontrado una alta variación entre las hélices (Aguilar & Sánchez, 2007; Grajales *et al.* 2007), en el caso de *P.arborea* se encontró baja variación intra-específica evidenciada con estructuras muy conservadas, producto del proceso de evolución concertada que ha sufrido este gen ribosomal para esta especie. Esto permitió evidenciar que las secuencias obtenidas, al menos en teoría, son de genes funcionales dada la importancia de la correcta formación de la estructura secundaria, una característica muy importante en la formación del ribosoma (Veldeman *et al.*, 1981; Van Nues *et al.*, 1995). Los cambios únicamente se evidenciaron en la longitud de las hélices I y IV ó en nucleótidos libres, debido a la inserción o deleción de una base nucleotídica en cada caso (Fig. 2).

En conclusión, *P. arborea* presenta un bajo nivel de variabilidad a nivel intragenómico e intra-específico en la región ribosomal nuclear del ITS2, debido

a que este gen ha sufrido el proceso de evolución concertada. Esta homogenización de las copias facilitó la reconstrucción filogenética más exacta en esta especie a niveles taxonómicos más altos, gracias a la eliminación del ruido de las múltiples copias, que en muchos casos ha complicado la reconstrucción de la historia filogenética de las especies.

Agradecimientos

Especiales agradecimientos a la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, el Laboratorio de Biología Molecular Marina BIOMMAR y COLCIENCIAS por su apoyo y financiación de este proyecto. Al *Smithsonian National Museum of Natural History-NMNH collection* (Washington, DC, USA) y *National Institute of Water & Atmospheric Research* (NIWA, New Zealand), por proporcionarnos el material genético y por su colaboración.

Referencias

- Aguilar, C., Sánchez, J.A. (2007a) Phylogenetic hypotheses of gogoniid octocorals according to ITS2 and their predicted RNA secondary structures. *Mol Phylogenet Evol* 43:774 – 786
- Aguilar, C., Sánchez, J.A. (2007b) Molecular morphometrics: contribution of ITS2 sequences and predicted RNA secondary structures to octocoral systematics. *Bull Mar Sci* 81(3): 335 –349
- Ainouche, M.L., Bayer, R.J. (1997) On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genome*. 40(5): 730-743.
- Álvarez, I., Wendel, J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 417-434
- Ardila, N., Sánchez, J. (2008) Systematics of the precious corals (Cnidaria: Octocorallia: Coralliidae) with emphasis in the fauna from New Zealand Seamounts. *Memories International Deepsea Coral Symposium*. Wellington, NZ.

- Broch, H. (1957) The Northern Octocoral, *Paragorgia arborea* (L.), in Subantarctic Waters. *Nature*. 179: 1356
- Coffroth, M.A., Lasker, H.R., Diamond, M.E., Bruenn, J.A., Bermingham, E. (1992) DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for detecting clonal structure in a vegetative species. *Mar Biol*. 114: 317-325
- Coleman, A.W (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet* 19: 370-375
- Dorado, D., Sánchez, J.A. Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) variation in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata* at Belize and Panama populations. *In prep.*
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797
- Elder, J.F., Turner, B.J., (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quart. Rev. Biol.* 70: 297-320
- Granados, C., Marriqué, N., Ardila, N., and Sánchez, J.A. Interspecific and intragenomic variation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2, rDNA) and their consequence in the evolution of the eastern Pacific octocorals. *In prep.*
- Heifetz, J., (2002). Coral in Alaska: distribution, abundance, and species associations. *Hydrobiologia*. 471: 19-27
- Hudson, R.R., Slatkin, M., Maddison, W.P. (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequences data. *Genetics*. 132: 583-589
- Liao, D., (1999) Concerted Evolution: Molecular Mechanisms and Biological Implications. *The American Society of Human Genetics*. 64: 24-30
- Marriqué N., Granados C., Ardila N., Sánchez J.A. Phylogenetic reconstruction of the genus *Pacifigorgia* (Gorgoniidae: Octocorallia) using the Internal Transcribed Spacer ITS2. *In prep.*
- Mortensen, P.B., Mortensen, L.B., (2004) Crustaceans associated with the deep-water gorgonian corals *Paragorgia arborea* (L., 1758) and *Primnoa resedaefomis* (Gunn., 1763). *Journal of Natural History*. 38: 1233-1247

- Mortensen, P.B., Mortensen, L.B., (2005) Morphology and growth of the deep-water gorgonians *Primnoa resedaeformis* and *Paragorgia arborea*. *Marine Biology*. 147: 775-788
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003) DnasSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics Applications Note*. 19: 2496-2497
- Sánchez, J.A., (2005) Systematics of the bubblegum corals (Cnidaria: Octocorallia: Paragorgiidae) with description of new species from New Zealand and the Eastern Pacific. *Zootaxa*. 1014: 1-72
- Schlötterer, C., Hauser, M.T., Haeseler, A.V., Tautz, D., (1994) Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 11(3):513-522
- Strychar, K.B., Hamilton, L.C., Kenchington, E.L., Scott, D.B. (2005) Genetic circumscription of deep-water coral species in Canada using 18S rRNA. *In: A Freiwald, JM Roberts (Eds) Cold-water Corals and Ecosystems. Springer, Berlin*. Pp 679-690
- Tendal, O.S., (1992) The North Atlantic distribution of the octocoral *Paragorgia arborea* (L., 1758) (Cnidaria, Anthozoa). *Sarsia*. 77: 213-217
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31: 3406-3415