

TRABAJO DE GRADO

BIOLOGIA

**DANIEL GUILLERMO DORADO NAVARRETE
CODIGO 199921830**

Título:

**Uso del Espaciador Trascrito Interno 2 (ADNr) como marcador
molecular de especies de Octocorales**

**Dirección: Juan A. Sánchez
Co-Dirección: Jenny Dussan**

**Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Ciencias Biológicas
Bogota, Colombia**

CONTENIDO

Agradecimientos

Resumen

1. Introducción	6
2. Objetivos	9
3. Justificación	10
4. Marco Teórico	
4.1 Marcadores moleculares y técnicas para su estudio	11
4.2 ADN ribosomal e ITS2	15
4.3 Antecedentes	17
5. Metodología	
5.1 Muestreo	19
5.2 Identificación de Octocorales	20
5.3 Extracción ADN	20
5.4 PCR	
5.4.1 Primers y condiciones reportadas	21
5.4.2 Estandarización concentración ADN y MgCl ₂	21
5.4.3 Temperatura de anillaje	22
5.4.4 Condiciones finales	22
5.5 RFLPs	22
5.6 DGGE	23
6. Resultados	
6.1 Muestreo	24
6.2 Identificación Octocorales	24
6.3 Extracción ADN	24
6.4 PCR	
6.4.1 Estandarización concentración ADN y MgCl ₂	26
6.4.2 Temperatura de anillaje	27
6.4.3 Condiciones finales	28
6.5 RFLPs	30
6.6 DGGE	31
7. Análisis de resultados	36
8. Conclusiones	40

9. Bibliografía 42

10. Anexos

10.1 Especies de octocorales colectados en muestreos 47
10.2 Mapa de lugares de muestreos 48
10.3 Éxito del PCR 49
10.4 Base de datos muestras amplificadas 50

Apéndice

Manuscrito para ser sometido a una revista indexada internacional 51

Dirección, codirección y financiación

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular Marina (BIOMMAR) de la Universidad de los Andes (J-309), bajo la dirección del doctor Juan Armando Sánchez director del mismo, y con la codirección y soporte de Jenny Dussan directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC) de la Universidad de los Andes. El estudio fue financiado por BIOMMAR con recursos provenientes de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Las salidas de campo, reactivos e insumos fueron financiados parcialmente gracias a los proyectos “Ecología molecular y del paisaje aplicados al diseño de áreas protegidas marinas en los arrecifes coralinos aledaños a Cartagena, Colombia.” Financiación: COLCIENCIAS (120409-16825) y “Uso sostenible de recursos arrecifales y valoración económica en el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNN-CRSB).” Financiación: COLCIENCIAS (1204-09-17774).

Agradecimientos

Dedico este estudio a toda mi familia, especialmente a mi madre quien realizó innumerables sacrificios para lograr que yo estudiara en una de las mejores Universidades del país, además por su apoyo en todos los momentos difíciles y por su fe en mí, por lo cual este estudio es tan mío como de ella aunque no entienda lo que dice. A mi hermano y padre quienes están presentes en todas las cosas que hago. Agradezco en especial a mi novia Laura de Zubiría por apoyarme y aconsejarme a través de todo el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al doctor Juan A. Sánchez director de este estudio, por permitirme participar en el proyecto multidisciplinario de investigación y enseñanza en que se ha convertido el laboratorio BIOMMAR de la Universidad de los Andes, porque este estudio fue posible gracias a sus esfuerzos en la materialización de este laboratorio. A Jenny Dussan Codirectora de este estudio y directora del CIMIC por su gran apoyo incondicional y por creer en mí en todo momento. Agradezco a todos los integrantes de BIOMMAR por su gran colaboración y sobretodo a aquellos vinculados en los proyectos de Bioeconomía y zooxantelas de Colciencias, porque gracias a su trabajo este estudio obtuvo gran parte de la financiación. Agradezco a los integrantes del CIMIC que me brindaron ayuda en el momento de necesitarla, especialmente a Lucía Lozano y Martha Vives. También expreso la gran gratitud que siento por todos aquellos profesores y maestros que contribuyeron en mi formación académica en mi paso por la universidad sin lo cual este trabajo no sería posible.

Resumen

Los octocorales o corales blandos es un grupo de organismos de gran importancia en el mar Caribe por su gran diversidad y abundancia. Sin embargo, debido en parte a su complicada identificación, estos han recibido poca atención en su ecología y filogenia comparativamente con los corales escleractíneos. Por tal razón el uso de técnicas moleculares se presenta como una alternativa confiable y práctica para la identificación y estudio de los octocorales. Para el desarrollo de estas técnicas en éste grupo de organismos, se han propuesto en trabajos anteriores diferentes marcadores moleculares, dentro de los cuales se destaca el Espaciador Trascrito Interno 2 (ITS2) del ADN ribosomal, cuya aplicación es estandarizada y evaluada en este estudio en 13 especies de octocorales mediante electroforesis en geles con gradiente denaturante (DGGE). Se obtuvieron resultados positivos al observar gran variabilidad en todos los niveles (intragenómica, intraespecífica e interespecífica) en los patrones de bandeo, lo cual ya había sido reportado previamente en otros grupos de organismos. Las variaciones intragenómicas fueron observadas como múltiples bandas en una misma muestra, explicado posiblemente por presencia de pseudogenes mientras las variaciones intraespecíficas se observaron como patrones de bandeo no conservados dentro de una misma especie, lo cual probablemente se explica por varios alelos, eventos de especiación reciente, purificación incompleta de linajes, hibridización o por analizar diferentes especies crípticas.

Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del ITS2 como marcador molecular en octocorales para resolver relaciones entre especies cercanas ó poblacionales y del DGGE como técnica replicable para examinar su gran variabilidad. Esto sumado, al amplio rango de aplicabilidad de estas técnicas, al obtener resultados positivos en más del 95% de las especies estudiadas. Sin embargo, este estudio generó nuevas preguntas acerca de la hipervariabilidad del ITS2 y su evolución.



Fotografía de *Plexaurella* sp. tomada durante la salida de campo de septiembre del 2005, en Isla Tesoro, Islas del Rosario, Cartagena, Colombia.

1. Introducción

Los octocorales o corales blandos pertenecen al Phylum Cnidaria el cual incluye medusas, anémonas y corales duros. La simetría de los cnidarios es radial y se pueden encontrar en dos formas básicas, polipoide y medusoide. La primera sésil y la segunda de natación libre, en ambos casos existe una boca central rodeada por tentáculos cuya función es facilitar la alimentación. Este grupo se caracteriza por ser diblasticos es decir que sólo cuentan con dos capas germinales -ectodermo y endodermo-, el endodermo da origen a la gastrodermis o epitelio interno que recubre a la cavidad gastrovascular y el ectodermo da origen a la epidermis, entre estos dos epitelios se encuentra un espacio denominado mesoglea que puede o no contener algunos tipos de células. La epidermis y gastrodermis presentan una gran variedad de células con funciones especializadas como los son las células nerviosas, células mucosas, células nutritivo musculares, células epiteliomusculares las cuales son las mas abundantes en la epidermis y los cnidocitos que son las células características de los cnidarios cuya función es atrapar e inmovilizar a presas y generalmente se encuentran ubicados en los tentáculos (Caims 1976).

Los octocorales pertenecen a la clase Anthozoa, la cual esta constituida por cnidarios pólipoides solitarios o coloniales y constituye la clase mas abundante con mas de 6000 especies conocidas. El pólipo de este grupo se diferencia por poseer una faringe entre la boca y la cavidad gastrovascular y por presentar septos en esta última. En la clase Anthozoa encontramos varias subclases donde se dividen las anémonas, corales hermatípicos (Hexacorallia) y octocorales (Octocorallia). Dentro de la subclase Octocorallia encontramos formas comunes como plumas de mar, abanicos y látigos de mar. Los pólipos coloniales de los octocorales siempre tienen ocho tentáculos pinnados o con ramas laterales y a su vez poseen ocho septos completos cada uno en la base o lado de cada tentáculo (ver Fig. 1). Los octocorales al igual que los corales hermatípicos tienen una relación simbiótica con microalgas denominadas zooxantelas, las cuales brindan fotosintatos al coral permitiéndole un desarrollo eficiente.

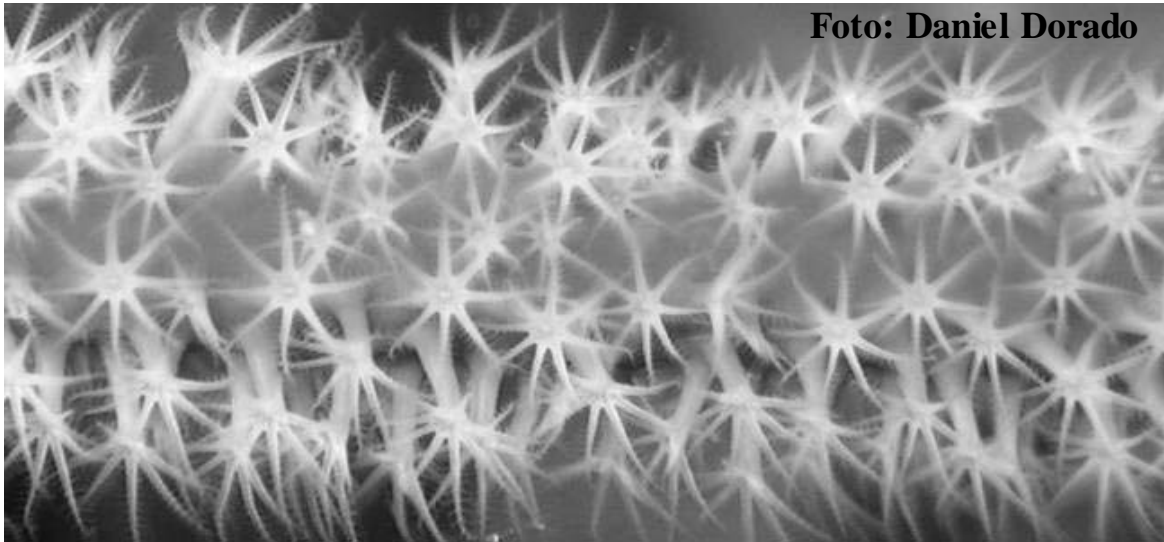


Foto: Daniel Dorado

Fig. 1. Pólipos típicos en la subclase Octocorallia (*Ctenocella* sp.), se observa en cada uno de los pólipos ocho tentáculos pinados todos ubicados alrededor de un esqueleto flexible.

Los pólipos de los octocorales están conectados por el cenénquima que es una masa de tejido perforada por tubos gastrodermicos ó solenia uniendo a las cavidades gastrovasculares de todos los pólipos de la colonia. El cenénquima está recubierto por epidermis que llega hasta la parte superior de los pólipos, permitiendo que sólo una pequeña parte de éstos asome al exterior. El interior del cenénquima esta compuesto de mesoglea, donde existen células especializadas o amebocitos que secretan material calcáreo que permite el sostén de la colonia, el esqueleto esta compuesto de escleritos unidas por un material corneo que junto con el bastón axial compuesto de gorgonina hacen que el esqueleto sea fuerte pero flexible.

En el mar Caribe encontramos una gran abundancia y diversidad de octocorales, donde se destacan formas coloniales que van desde los muy ramificados abanicos de mar hasta los poco ramificados látigos de mar. A pesar de su gran distribución e importancia ecológica en el Caribe, su sistemática y taxonomía permanece en gran medida sin resolver aún cuando frecuentemente son reportadas nuevas especies (Sánchez y Wirshing 2005), lo cual puede ser debido en parte por las complicaciones en la identificación de especies en este grupo en razón al parecido morfológico entre distintas especies y la carencia de herramientas efectivas de identificación, o el también llamado impedimento taxonómico (Lipscomb et al. 2003). Actualmente la herramienta más usada para la identificación de Octocorales es la observación y comparación de los escleritos por microscopía, permitiendo reconocer las especies de este grupo dado que en la mayoría de los casos los escleritos son únicos para cada especie (Aguilar y Sánchez, en prensa) (Ver Fig. 2).

Desde los comienzos de la secuenciación del ADN se postuló la posibilidad de usar el código genético para determinar las relaciones entre las especies y poder de este modo superar los problemas de la taxonomía tradicional. Por esta razón poco a poco genes o regiones del ADN fueron candidatizados como excelentes marcadores moleculares para

distintos objetivos. De esta forma proyectos como el “DNA barcoding” pretenden identificar a nivel de especie cualquier organismo con el uso de segmentos estandarizados del genoma (Hajibabei et al. 2005), obteniendo resultados sobresalientes como el descubrimiento de especies crípticas en insectos al usar genes como el Citocromo C Oxidasa (Hebert et al. 2004). También encontramos dentro de los marcadores moleculares mas frecuentemente usados los genes ribosomales, donde se destaca el uso del 16s en procariotes (Woese et al. 1985) y las secuencias ITS1 e ITS2 en los eucariotas (Coté et al. 2001). Precisamente, en este estudio se evalúa y se estandariza el uso del ITS2 como marcador molecular de amplio espectro en Octocorales, contribuyendo a resolver las relaciones inter e intraespecíficas en este grupo.

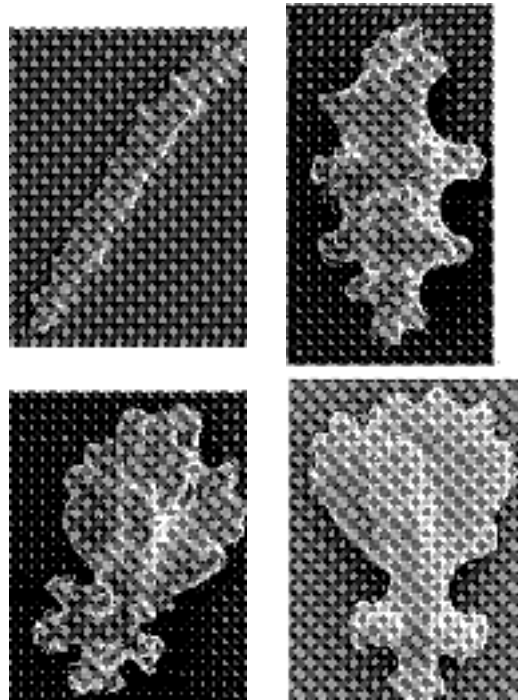


Fig. 2. Ejemplos de diferentes tipos de escleritos de *Eunicea sp.* usados para la identificación de especies.
Fotografías tomada con SEM Tomado de Sánchez (sometido).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Evaluar el uso de la secuencia de ADNr ITS2 como marcador molecular en especies representativas de octocorales del Caribe Colombiano mediante amplificación por PCR y su posterior análisis en electroforesis de gel en gradiente denaturante (DGGE).

2.2 Objetivos específicos:

- Realizar muestreos algunas especies representativas de octocorales en el área comprendida entre Cartagena, Isla Barú e Islas del Rosario.
- Estandarizar la extracción de ADN y la amplificación de ADNr por medio de PCR.
- Estandarizar la técnica de DGGE, donde se busca encontrar patrones de bandeo específicos para cada una de las especies muestreadas.

3. Justificación

La taxonomía actual de los octocorales esta basada en su forma, tamaño, color, textura superficial y el análisis microscópico de los escleritos; sin embargo, la identificación de especies y su filogenia usando estos métodos puede llegar a ser complicada e impractica (Sánchez et al. 2004). Por tal razón el uso de técnicas moleculares en éste y otros grupos de organismos para la identificación y filogenia de especies es una alternativa confiable y práctica.

Dentro de las técnicas moleculares más usadas se encuentra la amplificación por medio de PCR del ADNr ITS2 ampliamente usado como marcador molecular en eucariotes, realizando su posterior visualización y análisis por medio de electroforesis en un gel de gradiente denaturante (DGGE), donde se pueden observar patrones de bandeo con una resolución muy alta, distinguiendo incluso diferencias intragenómicas en algunos genes, y por ende diferencias intra e interespecíficas (Blaxter 2004). La estandarización de esta técnica en Octocorales facilitará estudios posteriores donde se requieran marcadores moleculares, destacándose su utilidad en la identificación de especies y poblaciones donde no existe una diferenciación muy clara cuando son usadas herramientas de la taxonomía clásica, incluso llegando a poder ser una pieza clave para la descripción de nuevas especies.

4. Marco Teórico

4.1 Marcadores moleculares y técnicas para su estudio

Las técnicas de biología molecular usadas en estudios poblacionales, generalmente buscan observar y detectar polimorfismos en secuencias o regiones de ADN denominados marcadores moleculares, los cuales son seleccionados dependiendo de la resolución necesaria en cada estudio. Cuando los estudios se realizan entre organismos estrechamente relacionados se usan marcadores moleculares con una alta variabilidad, permitiendo obtener polimorfismos incluso intraespecíficamente. Estos marcadores se caracterizan en general por presentar selección neutral lo que conlleva a su hipervariabilidad, dentro de éstos encontramos marcadores moleculares como los mini y microsátélites, los cuales son secuencias repetidas en tandem de diferentes longitudes (microsátélites de 2 pb - 6 pb) ubicados a lo largo del genoma de todos los seres vivos, estos marcadores tienen una sensibilidad tan alta que permiten establecer incluso relaciones de paternidad (Zane et al. 2002). En el otro extremo encontramos marcadores moleculares conservados los cuales permiten establecer relaciones filogenéticas entre grupos distantes, en general estos marcadores son secuencias con funciones altamente específicas por lo que se encuentran bajo una fuerte selección, como ejemplo tenemos al ADNr 18s en eucariotas y 16s en procariotas, los cuales han permitido establecer las relaciones filogenéticas generales de todos los grupos de organismos (Woese et al. 1985). Al mismo tiempo pueden existir marcadores moleculares con variabilidad intermedia los cuales pueden ser informativos en grupos con distancias medias, es decir entre especies, géneros o familias de un mismo clado, este grupo de marcadores pueden presentar funciones biológicas importantes pero con una presión de selección menor permitiendo algunas variaciones.

Para una gran cantidad de usos y aplicaciones de los marcadores moleculares es necesario su amplificación por medio de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ó Reacción en cadena de la polimerasa). El PCR consiste en una amplificación específica del marcador, al utilizar primers o iniciadores diseñados exclusivamente para éste. La reacción de PCR consta de tres pasos los que son repetidos de 25 a 35 veces o número de ciclos (ver Fig. 3). El primer paso es denaturación, donde las dos cadenas del ADN son separadas al subir la temperatura a más 90°C; el segundo paso es el anillaje, donde los primers se unen específicamente a su región complementaria al bajar la temperatura (45°C - 65°C); una vez los primers han anillado la temperatura es subida de nuevo a aproximadamente 72°C, temperatura a la cual la Taq Polimerasa realiza la extensión (Saiki et al. 1985). Cada vez que termina un ciclo el número de amplicones o copias de la región amplificada se dobla, por lo cual el número total de copias obtenidas crece de manera exponencial. Una vez amplificado el marcador molecular, su análisis se realiza a través de técnicas que permiten observar cambios o polimorfismos. La sensibilidad para detectar estos cambios varía dependiendo de la técnica seleccionada. Dentro de las técnicas más usadas encontramos los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* ó Polimorfismos en longitud del fragmento de restricción), técnica basada en la detección de patrones diferenciales de bandeos de restricción en geles de agarosa o poliacrilamida. Estos patrones son observados al digerir el amplificado utilizando una o más endonucleasas con sitios específicos de corte, los sitios de corte pueden cambiar si existen diferencias en las secuencias a estudiar (Ver Fig. 4). La

frecuencia de cortes depende del tamaño del amplificado, enzima de restricción escogida y tipo de marcador molecular. En general esta técnica permite observar polimorfismos marcados, pero debido a que muchos cambios en la secuencia pueden no llevar directamente a cambios en los sitios de restricción (Myers et al. 1985, Kan & Dozy 1978), la sensibilidad de esta técnica es relativamente baja. Aunque cabe anotar que esta técnica es útil para ciertos estudios donde no se requiere un grado de sensibilidad demasiado alto.

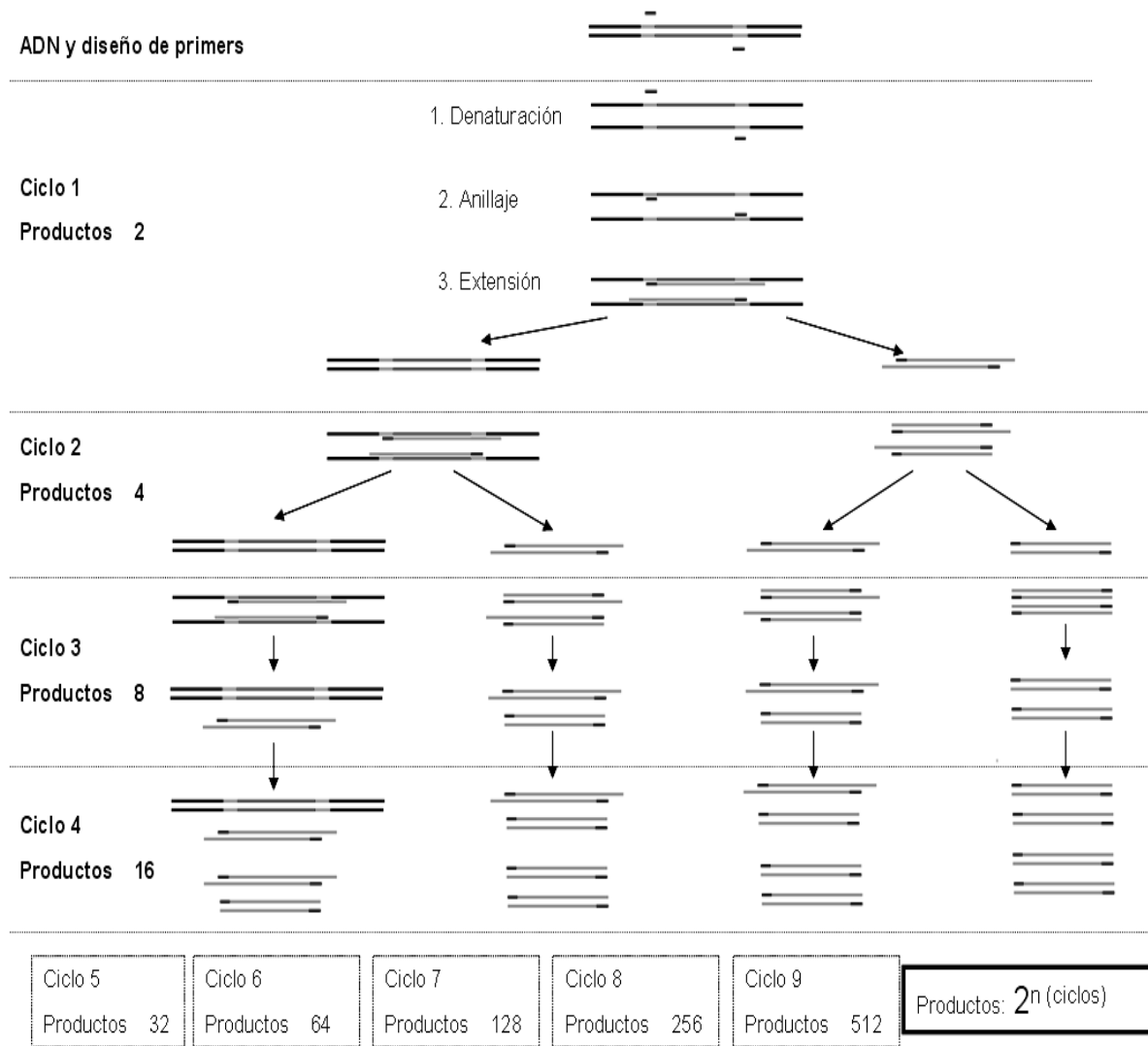


Fig. 3. Pasos y Ciclos de PCR (Polimerase Chain Reaction). En rojo región de ADN de interés; en verde región conservada flanqueante a partir de la cual se diseñan los primers, en azul primers, en naranja ADN polimerizado en el PCR. A. Obtención de ADN y su secuencia para el diseño de los primers y posterior amplificación. B. Los tres pasos del PCR y resultado del primer ciclo. C. Numero de amplicones obtenidos al final de cada ciclo, los datos mostrados es asumiendo una sola secuencia como templado original.

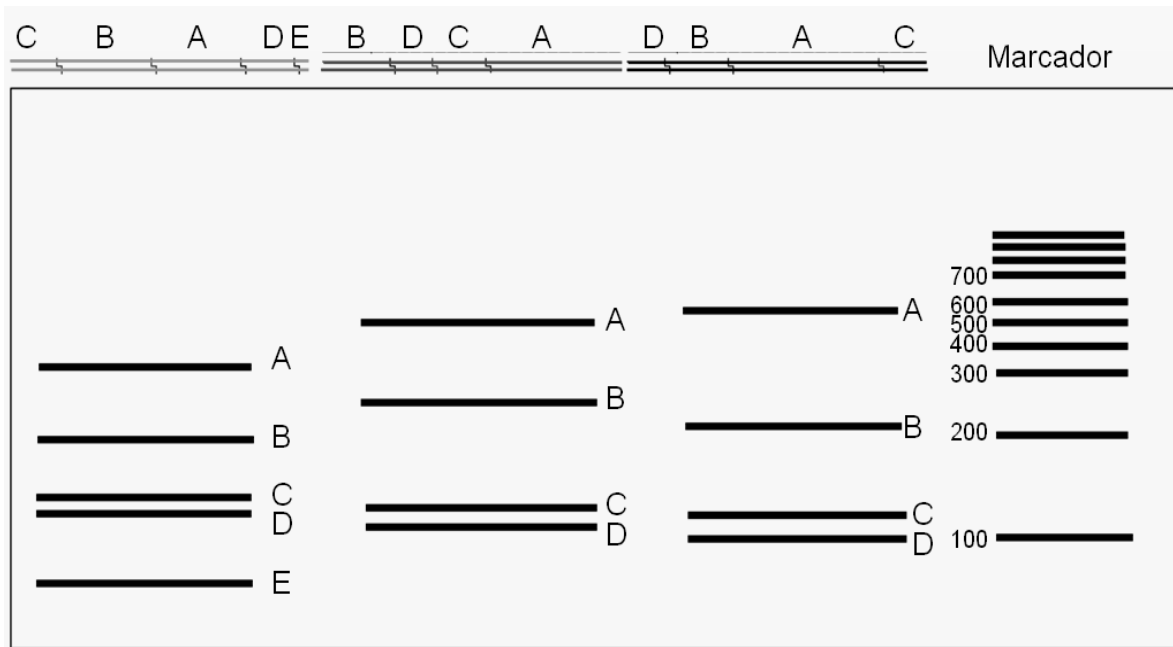


Fig. 4 Ejemplo demostrativo de RFLPs con tres amplificados distintos del mismo marcador molecular con una longitud de 1000 pares de bases y usando 2 enzimas de restricción, los sitios de restricción están marcados en los demostrativos de bandas superiores con azul y rojo para distinguir las dos enzimas, el marcador usado es de 1000 pb. Se observan los patrones diferenciales para distinguir a cada uno de los amplificados.

Los amplificados que presentan diferencias en una sola base pueden ser físicamente separados por un procedimiento denominado Electroforesis en Gradiente Denaturante o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Wartell et al. 1990). En el cual, el ADN es corrido a través de una electroforesis en un gel de poliacrilamida con un gradiente denaturante en aumento de Urea y Formamida. Por ende, en este tipo de electroforesis, la distancia de corrido del ADN no depende de su peso molecular sino de su punto de denaturación, donde el ADN que más migra en el corrido es aquel que tiene un punto de denaturación mayor. La denaturación depende del punto de fusión de la cadena de ADN el cual es el paso de ADN doble cadena a ADN de cadena sencilla inducido por los agentes denaturantes y temperatura. Es importante aclarar también que la temperatura usada en el DGGE es bastante alta (Aprox. 60°C) para facilitar la denaturación por agentes químicos (Abrams & Stanton 1992) (ver fig. 5).

El punto de fusión de una secuencia depende de factores intrínsecos como el porcentaje de C y G, dado que estas bases están unidas por puentes de hidrógeno triples, mientras que A y T están unidas por puentes de hidrógeno dobles, por lo cual, una mayor cantidad de C y G en la composición de un fragmento lo hace mucho mas estable y menos susceptible a la denaturación. Por otro lado es importante aclarar que la denaturación de una de secuencia de ADN es un proceso dado por etapas (y no un evento inmediato) determinado por la presencia de segmentos discretos en el ADN de aproximadamente 100 pb denominados dominios de fusión, cada uno de los cuales presenta un punto de fusión diferencial, donde el dominio con el punto de fusión más bajo es el primero en denaturarse y así sucesivamente (Ver fig. 5). Una vez el primer dominio de fusión se denatura la velocidad

de migración es reducida notablemente por el impedimento esférico que el ADN de cadena sencilla genera. Si la molécula de ADN presenta varios dominios de fusión, el ADN migra mas lento cada vez que uno de éstos es denaturado. Sin embargo, una vez que el ADN esta completamente abierto vuelve a migrar con respecto a su peso pero en forma de cadena sencilla. Por lo anterior, la resolución del DGGE esta limitada a la denaturación de todos los dominios de fusión del fragmento menos uno (Ver fig. 5), para lo cual, en la mayoría de casos los primers son diseñados con un dominio de fusión adicional denominado CLAMP, el cual es muy rico en C y G asegurando que tenga el mayor punto de fusión, permitiendo que el análisis pueda realizarse teniendo en cuenta todos los dominios de fusión presentes en el fragmento (Myers et al. 1985b).

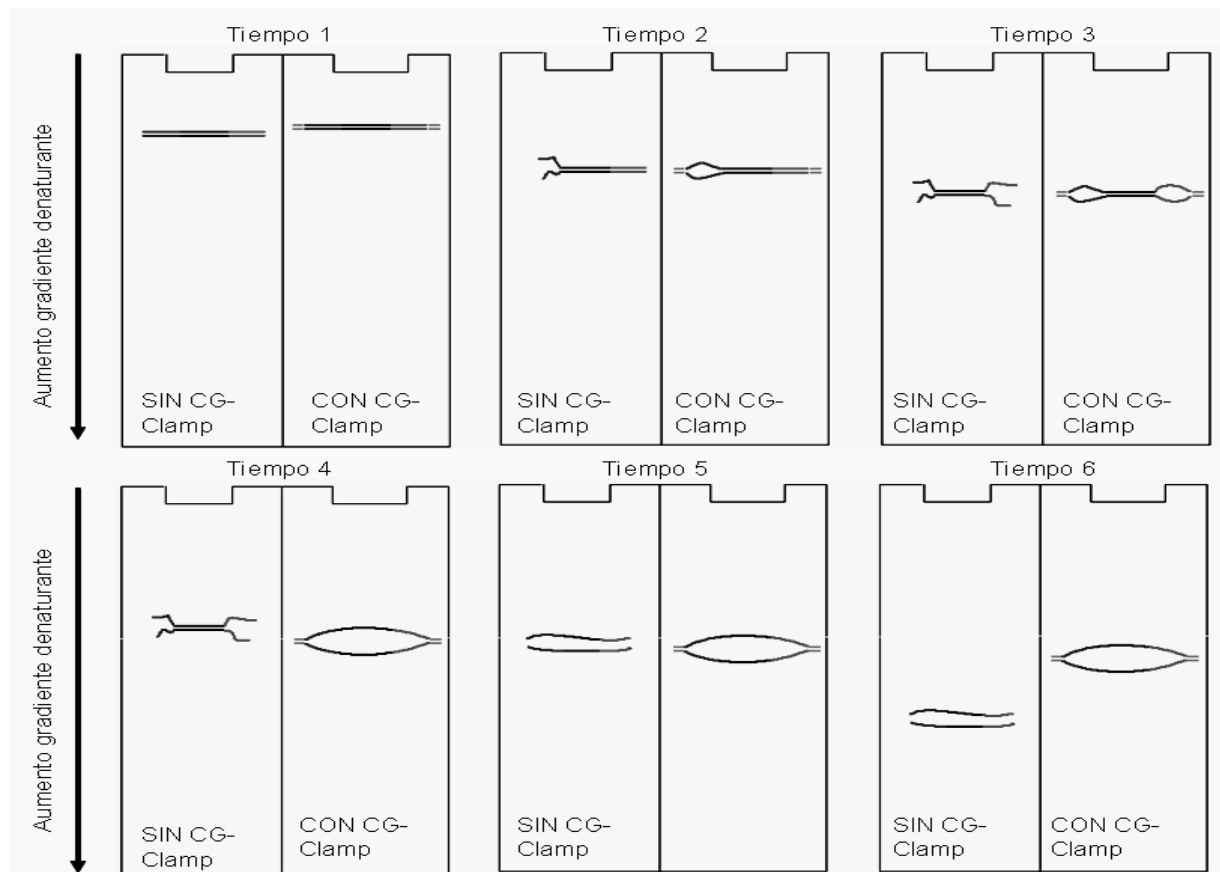


Fig. 5 Ilustración del DGGE con respecto al tiempo. Se ilustra en todos los casos el mismo fragmento con y sin CG-clamp. El fragmento ilustrado es de 300 pb con tres dominios de fusión, donde el azul tiene la Tm mas baja seguido por el rojo y el negro. La coloración naranja en los extremos representa el CG-Clamp. En el T1 se ilustra el corrido electroforetico por peso molecular hasta llegar al punto de denaturación de dominio con el Tm mas bajo ilustrado en T2, en este punto el corrido se vuelve muy lento. En T3 el segundo dominio es denaturado, causando una velocidad de corrido aún menor. En T4 y T5 se observa como el fragmento con Clamp migra un poco mas rápido llegando primero al punto donde se denaturan los 3 dominios. Una vez el fragmento sin clamp llega a este punto se denatura completamente el ADN, llegando al punto máximo de sensibilidad del DGGE sin clam, de en este momento en adelante el fragmento de cadena sencilla migra de nuevo por peso. El fragmento con Clamp permite la denaturación de los 3 dominios, aumentando su sensibilidad.

Otro factor importante, secuencia-específico, del fragmento que influye en el DGGE es la interacción de distribución o colocación, la cual contribuye en la estabilidad de la doble

hélice, esta fuerza es el resultado de la suma de las interacciones entre nucleótidos adyacentes en la misma cadena. El orden en que se encuentran las bases determinan el grado de estabilidad local, y cambios muy pequeños incluso de una base, pueden alterar significativamente el grado de estabilidad por colocación. Este mismo tipo de interacción es el que se ve afectado con la presencia de heteroduplex, causando una desestabilización general incluso por un solo “mismatch”, de ahí que el recorrido de los heteroduplex sea mucho menor que el de las secuencias originales (Myers et al. 1987). Es así que el DGGE se convierte en una herramienta ultrasensible y además flexible por su practica estandarización al permitir manipular fácilmente condiciones como T°, concentración de agentes denaturantes y voltaje. El grado de sensibilidad de esta técnica es tal, que se ha reportado que inclusive detecta cambios en estados de metilación de las bases.

4.2 ADN ribosomal e ITS2

En los eucariotes, los ribosomas están formados por cuatro moléculas de RNA de las cuales tres (18s, 5.8s y 28s) son sintetizadas a partir de un solo transcrito, los tres genes están separados entre sí por dos regiones espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) (Coté et al. 2001) (Ver Fig 6). El ADN ribosomal (ADNr) que codifica para estas tres moléculas se encuentra arreglado en repeticiones en tandem separados entre sí por secuencias separadoras intergénicas (IGS) y por separadores transcritos externos (ETS), llegando a haber hasta cientos de copias en un solo cromosoma, todas estas copias permanecen con aparentemente poca variación dado que este tipo de familias multigénicas evolucionan en concierto, resultando en la homogenización de todas las repeticiones (Harris et al. 2000, Hillis et al. 1988). Sin embargo, en gran cantidad de organismos se han reportado diferencias considerables en un mismo individuo causado tal vez por una especiación más rápida que la evolución concertada de las repeticiones (Coté et al. 2001, Harris et al. 2000), o por la presencia de pseudogenes (Marquez et al. 2003).

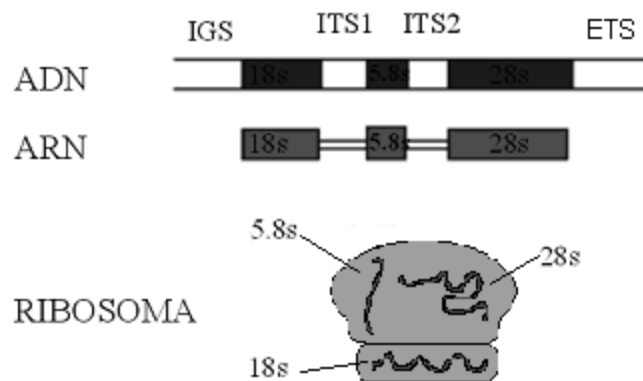


Fig. 6. Estructura general del ADNr en eucariotes, correspondencia de las secuencias en ADN, RNA y ribosoma.

El proceso de maduración del ARNr para poder llegar a formar el ribosoma es complejo y requiere la intervención de varios factores *cis* y *trans* (Venema et al. 1999) entre los cuales se han reportado como esenciales algunas secuencias del ITS2, involucradas en la formación de estructuras secundarias requeridas para el procesamiento y maduración del

trascrito. Lo anterior ha sido demostrado, dado que en ausencia parcial o total de las estructuras secundarias del ITS2, la producción de ARNr 25s es inhibida (Cote et al. 2002). Por tal razón en la mayoría de los eucariotas estas estructuras secundarias interesantemente siguen un modelo conservado (Coté et al. 2001) compuesto por 5 o 6 hélices, el cual también ha sido descrito en Octocorales (Aguilar y Sánchez, en prensa) (Ver fig. 7).

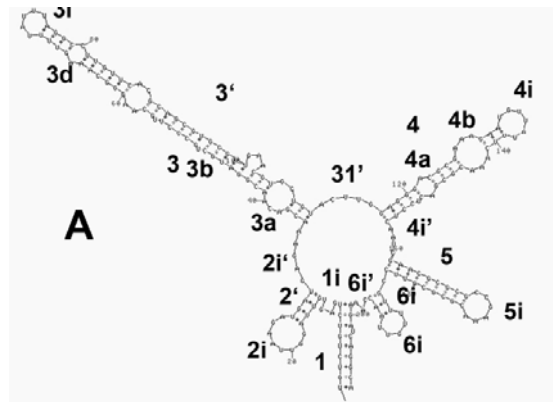


Fig. 7. Modelo de la estructura secundaria del ITS2 en octocorales, se observa la estructura característica compuesta en octocorales por 6 hélices. Figura tomada de Aguilar y Sánchez (en prensa).

En los últimos años se ha encontrado que el ITS2 es apropiado como marcador molecular para diferir relaciones entre organismos eucariotes basales, dado a que el tamaño, secuencia y complejidad varía considerablemente entre especies, incluso entre especies cercanas donde otros marcadores son invariables (Lajeunesse 2001, Shearer et al. 2002), exceptuando en raras ocasiones donde hallan ocurrido eventos de especiación bastante recientes (Coté et al. 2001, Odorico et al. 1997). Sin embargo, su utilidad también ha sido discutida debido a la extrema variación intragenómica de esta secuencia y a la gran cantidad de INDELS presentes (Fabry et al. 1999); por lo cual se propone utilizar análisis de estructuras secundarias (Sánchez et al. 2003b), brindando información morfológica que un alineamiento simple no puede dar.

El uso de esta secuencia como marcador molecular ha sido diverso e incluye aplicaciones de técnicas como: patrones de restricción (RFLPs), Gel en gradiente denaturante (DGGE) y predicción y comparación de sus estructuras secundarias. Particularmente en corales, octocorales y zoantideos por medio del PCR y RFLPs de las secuencias de ADNr se ha podido determinar la existencia de más de seis clados de zooxantelas simbiotes, cada uno de ellos con distintas características fisiológicas (Baker 2003). Recientemente el uso del DGGE ha permitido distinguir más de 40 tipos de zooxantelas, dado que la resolución de esta técnica es muy alta, diferenciando fragmentos de ADN del mismo peso pero con distinta secuencia incluso en una sola base (LaJeunesse 2002). En corales el uso del ITS2 ha proporcionado información filogenética valiosa, al ser combinada con predicción de estructuras secundarias (Chen et al. 2004).

4.3 Antecedentes

En los octocorales la aplicación de técnicas de biología molecular ha sido reducida comparada con la atención que han recibido los escleractineos (Corales duros), aún así, desde inicios de los años 90`s comenzaron a ser desarrolladas aplicaciones de biología molecular en este grupo de organismos. Inicialmente se demostró la utilidad de estas técnicas en análisis de estructuras poblacionales y clonales (Coffroth et al. 1992); seguido por análisis filogenéticos realizados a partir de secuencias del ADN ribosomal mitocondrial y nuclear (16s y 18s) los cuales fueron bastante utilizados como marcadores moleculares para resolver las relaciones a gran escala dentro del grupo de los Cnidarios y de la clase Anthozoa (Bridge et al. 1995; France et al. 1996; Won et al. 2001) demostrando que la filogenia realizada con caracteres tradicionales presenta inconsistencias que pueden ser resueltas por caracteres moleculares apropiadamente aplicados. Estos mismos marcadores moleculares fueron utilizados para inferir relaciones entre los distintos grupos de la subclase octocorallia, obteniendo, como era esperado, variaciones importantes frente a la filogenia tradicional de los octocorales; además, se demostró que efectivamente como fue hipotetizado por Bayer (1961) al menos dos clados en los octocorales llegaron a una convergencia evolutiva en morfología y patrones de ramificación (Berston et al. 2001; Sánchez et al. 2003b). Aunque ampliamente útiles y utilizados para resolver relaciones distantes entre organismos, los genes del ADNr tanto mitocondrial como nuclear (16s y 18S) son bastante conservados, por lo cual su resolución a la hora de resolver relaciones entre especies y géneros cercanos es bastante pobre; por esta razón, nuevos marcadores moleculares con una mayor variabilidad y flexibilidad fueron propuestos, donde se incluyen los genes mitocondriales de las subunidades ND2, ND3 y ND6 de la NADH dehidrogenasa, espaciadores intergénicos de COI y COII y mutS (France et al. 2001; McFadden et al. 2002; Sánchez, MacFadden y France 2003; Wirshing et al. 2005), permitiendo resolver de una manera mas acertada y detallada las relaciones entre los diferentes grupos de octocorales (Ver Fig. 8).

La constante necesidad de explorar con más detalle las relaciones entre organismos lleva a la exploración de nuevas metodologías y en este caso al uso de marcadores moleculares que permitan observar con mayor resolución las relaciones no sólo interespecífica sino también intraespecíficas, por esta razón han comenzado a ser usados marcadores moleculares en octocorales como los Espaciadores Trascritos Internos (ITS1 e ITS2, ADNr), los cuales permiten resolver a escala muy pequeña las relaciones entre organismos, como en el caso del genero *Alcyonium spp.* en el cual se pudo establecer su filogenia y determinar que la partenogénesis o hermafroditismo ha aparecido independiente dos veces en el género (MacFadden et al. 2001). Estos marcadores también han sido usados en casos de géneros con problemas taxonómicos complejos como el caso del género *Eunicea spp.* donde el uso del ITS2 como marcador molecular combinado con marcadores morfológicos permitió establecer una filogenia corregida de este género y la descripción de dos nuevas especies (Sánchez, sometido); en otro caso el uso del ITS1 permitió estudiar el origen por hibridización de dos especies Europeas de Octocorales, *Alcyonium hibernicum* y *Bellonella bocagei* y las relaciones de éstas con sus especies cercanas (MacFadden y Hutchinson 2004). Los Espaciadores Trascritos Externos (ETS, ADNr) y el Espaciador Intergénico (IGS, ADNr) también ha sido propuesto como marcador molecular en octocorales, sin

embargo su variación intraespecífica entre poblaciones aisladas de *Juncella fragilis* fué baja (Chen et al. 2000).

De igual forma un marcador con aún mayor sensibilidad recientemente comenzó a ser utilizado en octocorales, se trata de los microsatélites, los cuales permiten inferir relaciones no sólo entre poblaciones de la misma especie sino dentro de una misma población, es así que se ha podido establecer estructuras de especies clonales como en el caso de *Juncella juncea* en Taiwán donde se describieron mas de 40 genotipos en tres localidades estudiadas (Vanson Liu et al. 2005; Vanson Liu, Dai, Fan y Yu 2005) (Ver fig. 8). Los microsatélites también son útiles en el estudio del flujo genético, estructura, dispersión y conectividad de las diferentes especies de un nicho en particular, aplicaciones llevadas a cabo en la especie *Corallium lauuense* en las islas Hawaianas, donde se podría convertir en herramienta clave para la conservación de la especie (Baco et al. 2006). En general, es apreciable cómo a través del tiempo las diferentes aplicaciones dadas a marcadores moleculares van de menor a mayor sensibilidad, buscando siempre mayor detalle en las relaciones entre organismos, pasando de marcadores como ADNr para dilucidar relaciones generales a microsatélites que buscan dilucidar hasta relaciones parentales.

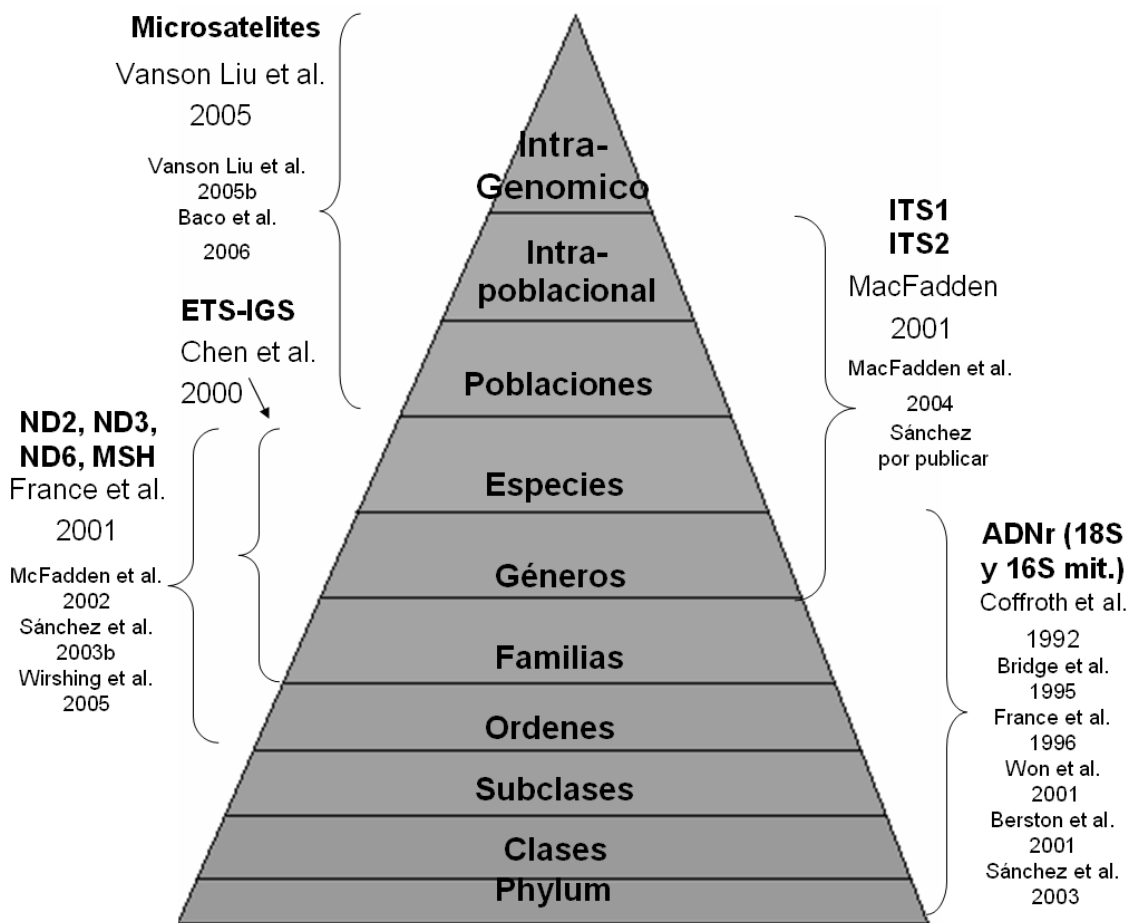


Fig. 8. Uso de marcadores moleculares en octocorales a través del tiempo con respecto al nivel jerárquico donde se han usado. Se muestran algunos grupos de trabajo que han utilizado cada marcador.

5. Metodología

5.1 Muestreo

Se realizaron 2 salidas de campo con miras a la recolección de muestras para los diferentes proyectos del laboratorio BIOMMAR, la primera tuvo lugar en mayo del 2005 en la ciudad de Cartagena y la segunda en octubre del mismo año en la isla de Barú. El muestreo se llevo a cabo usando equipo de buceo autónomo (SCUBA) en 25 formaciones arrecifales encontradas entre Cartagena, Isla Barú e Islas del Rosario (ver fig. 9). Para realizar el muestreo se tendió un transecto de 20m de longitud tomando muestras de las especies que se encontraban cerca de éste. El rango de profundidad de muestreo fue de 30 pies a 70 pies (Ver Anexo 1). La toma de muestras se realizó mediante el corte de pequeñas secciones de las distintas especies encontradas en cada una de las formaciones. Los fragmentos cortados se introducían en bolsas estériles Whirl-Pak (Nasco) rotuladas con marcador indeleble, las cuales se cerraban herméticamente. La especie y número de bolsa eran anotadas con lápiz en un cuaderno resistente al agua. En estas bolsas permanecían las muestras hasta llegar a la superficie donde se procesaban y conservaban parte de los fragmento en viales herméticos con etanol absoluto, estas muestras fueron refrigeradas a -10°C durante las salidas de campo y luego en las instalaciones de la universidad fueron refrigeradas a -80°C . En algunos casos se usó DMSO en vez de etanol absoluto como agente conservante, en estos casos las muestras se mantenían a temperatura ambiente.



Fig. 9. Muestreo con equipo de Buceo Autónomo (SCUBA) realizado entre Cartagena, Isla Barú e Islas del Rosario, Foto Daniel Dorado

Las muestras analizadas provenientes de otras regiones, se encontraban conservadas como ADN liofilizado y fueron resuspendidas y diluidas de acuerdo a las estandarizaciones

realizadas (Ver 5.3 y 5.4). Estas muestras fueron obtenidas y amablemente cedidas de trabajos anteriores realizados por Sánchez y Cairns (2004).

5.2 Identificación de octocorales

La identificación de las especies se realizó visualmente bajo el agua usando la guía de identificación sumergible desarrollada por Sánchez y Grajales (Sánchez y Wirshing, 2005). Y una vez en la superficie, parte de los fragmentos obtenidos del muestreo eran secados a temperatura ambiente en las bolsas plásticas rotuladas, los fragmentos secos se conservaban para confirmar la identificación en el laboratorio por medio de la observación y comparación de los escleritos.

Para el análisis de escleritos se cortaba una fragmento del octocoral seco en un beaker y se le agregaba una solución de hipoclorito de sodio por 15 min; esta solución solubilizaba la mayor parte del tejido blando del octocoral dejando los escleritos en el fondo del beaker; posteriormente se realizaban tres lavados con agua para eliminar impurezas. Los escleritos se colocaban sobre una lámina y se tapaban con laminilla para la observación en el microscopio, donde se observaban y comparaban con las morfologías descritas en la guía escrita por Bayer (1961) permitiendo realizar la identificación correcta de las especies. Estos montajes en la mayoría de casos fueron fijados usando esmalte transparente para realizar futuras comparaciones.

5.3 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se siguió el protocolo descrito por (Cofroth et al. 1992), para muestras preservadas en DMSO se realizaron dos lavados previos cada uno con 100 μ l de buffer TE, las muestras preservadas en alcohol no requerían ningún tratamiento previo. En la cámara de flujo laminar, se adicionaba un trozo de muestra de aproximadamente 1 x 1 mm en un tubo eppendorf de 1.5ml estéril, se maceraba con Pestos estériles en 300 (L de CTAB, se agregaba 4 unidades de proteinasa K y se incubaba a 65° C mínimo por 1 hora. Posteriormente se adicionaban 300(L de Fenol-cloroformo isoamílico para la separación de detritos celulares y se centrifugaba a 12000 rpm por 5 minutos, la fase acuosa era separada en un nuevo tubo Ependorff de 1,5ml. Se agregaba 300(L de cloroformo isoamílico centrifugando de nuevo a 12000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa era separada en un nuevo tubo Ependorff de 1,5 ml y se agregaban 800(L de etanol absoluto para precipitar el ADN, se refrigeraba por 24h a -20°C y se centrifugaba a 12000 rpm por 30 minutos. Posteriormente se realizaba un lavado al pellet con 500(L etanol 70%, se centrifugaba a 12000 rpm por 10 minutos, se descartaba el etanol y se dejaba secar el pellet temperatura ambiente, el pellet resultante era resuspendido en 30(L de TE.

Para observar la calidad del ADN extraído se realizaron geles de Agarosa de 40 ml a una concentración de 0.8% las muestras se corrieron durante 30 minutos a 80 voltios. Se sembraron 3 μ l de muestra y 2 μ l de buffer de carga (6X). Los geles se visualizaron con luz UV en un documentador de geles (Chemidoc XRS, BioRad) utilizando el software Quantity One 4.0. De acuerdo a los resultados obtenidos se calificó la calidad de la extracción de

cada muestra de acuerdo a la siguiente clasificación: Intensidad de Banda 1,2 y 3 donde 1 es menos intenso y 3 mas intenso, Calidad de banda A,B y D donde A es banda alta, B banda Baja y D degradado.

5.4 PCR

5.4.1 Primers y condiciones reportadas

Los primers usados en este estudio fueron diseñados y reportados por Sánchez (sometido) para amplificar la región ITS2 del ADNr de *Eunicea spp.*, la secuencia de los primers es la siguiente: 5.8s 5`AGCATGTCTGTCTGAGTGTTGG3` y 28s 5`GGGTAATCTTGCCTGATCTGAG3`, el primer 5.8s tiene una Tm de 57.1°C y el 28s tiene un Tm de 55°C según lo reportado por el laboratorio sintetizador de los primers. El producto de amplificación esperado es de 230 pares de bases.

Las condiciones iniciales para realizar la amplificación se basaron en los estándares recomendados para los primers específicos de ADNr ITS2 de octocorales. La optimización se basó en el cambio de la concentración de Cloruro de 1.5 a 3.0 mM las temperaturas y tiempos fueron estandarizados a partir de las siguientes condiciones previamente reportadas (Sánchez, Sometido): Denaturación inicial 2.0 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 56°C, 1.45 min a 72°C, y extensión final de 5.0 min a 72°C

5.4.2 Estandarización concentración ADN y MgCl₂

Para establecer la concentración y calidad de ADN óptima para el PCR, se probaron diluciones 1/50, 1/100 y 1/500 de extracciones con distintas calidades e intensidades de ADN. La calidad e intensidad del ADN en cada extracción fue determinada como se describió anteriormente (ver 4.3). Se realizaron estos ensayos por duplicado usando dos concentraciones 1.5 mM y 3.0 mM para determinar la concentración preliminar del cofactor. El volumen final de reacción en todos los casos fue de 10µl, constituidos por 1µl de buffer 10x, 0,2µl de DNTPs (10mM), 0,1µl Taq polimerasa (Tucan Taq), 0,15µl primer F (10µM), 0,15µl primer R (10µM), 0,5µl de ADN y 1,2µl de MgCl₂ (25mM) o 0,6µl de MgCl₂ (25mM) para las concentraciones de 3,0 mM y 1,5 mM respectivamente, el volumen es completado a 10µl con agua doblemente destilada.

Posteriormente se realizó una reacción de PCR usando concentraciones de MgCl₂ de 2.5 mM, 3,0 mM y 3.5 mM, para hallar la concentración óptima del cofactor. Las condiciones anteriormente descritas se mantuvieron constantes. En esta estandarización se usaron las muestras A679 (*G. ventalina*), A692 (*E. colombiana*), B589 (*E. caribaeorum*) y A528 (*P. citrina*) al ser positivas en resultados anteriores. Los análisis comparativos entre bandas se realizaron al asignar una magnitud de intensidad a dos bandas, una con baja intensidad y otra con alta, a partir de estos dos valores el programa Quantity One de Biorad intrapola las magnitudes correspondientes a todas las bandas, ésto nos permite conocer intensidades relativas entre ellas pero no absolutas.

5.4.3 Temperatura de anillaje

Para determinar la temperatura óptima de anillaje que debe ser usada en la amplificación del ITS de octocorales se realizó el montaje de un PCR en gradiente de temperatura desde 54°C hasta 57°C. El rango de temperatura usado fue elegido a partir del T_m de los primers usados.

En este ensayo fueron probadas siete especies de octocorales para determinar las condiciones donde amplifiquen todas las especies o por lo menos la mayoría de éstas. Las muestras que mostraban una buena calidad e intensidad de ADN fueron diluidas 1/100 y las que mostraban una intensidad baja fueron diluidas 1/50.

5.4.4 Condiciones finales

El PCR fue estandarizado y las condiciones óptimas fueron las siguientes: Concentración de MgCl₂ 3.5 mM. Dilución de ADN 1/50 para ADN con intensidad 1 y 1/100 para ADN con intensidad 2 y 3.

Los tiempos y temperaturas estandarizadas fueron: una fase inicial de denaturación de 2 minutos a 94°C seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56.2°C, 1 minuto a 72°C y un ciclo de extensión final por 2 minutos a 72°C, de acuerdo a los resultados obtenidos en el gradiente de temperatura. En este ensayo final se utilizaron extracciones de ADN de *Agaricia agaricites* (escleractineos) y zooxantelas de vida libre para determinar la especificidad de la amplificación. En el PCR confirmatorio se incluyeron especies y muestras que no fueron analizadas en DGGE por insuficiencia en el número de réplicas con el propósito de determinar el rango de amplificación en octocorales de la estandarización realizada. Adicionalmente se realizó un ensayo confirmatorio utilizando un marcador de peso molecular (Biorad 100 pb) y el programa Quantity One para determinar diferencias en el tamaño de los productos amplificados de seis especies diferentes.

Para la realización de los procedimientos posteriores el volumen final de las reacciones de PCR se aumento a 20µl, utilizando 4µl de ADN y 1 unidad de Taq Polimerasa (Tucan Taq), el resto de condiciones permanecieron iguales. El total de muestras a las que se les realizó la amplificación se muestra en el Anexo 1.

5.5 RFLPs

Los fragmentos amplificados fueron digeridos totalmente con la enzima endonucleasa Taq I, para tal fin se usaron 2 unidades de enzima por reacción en un volumen final de 20µl, en esta reacción se agregaba 10µl de reacción de PCR, 2µl de Buffer 10X y 0,2µl de BSA. Las muestras eran incubadas a 65°C por 3 horas.

El análisis de restricción fue realizado en geles de agarosa de 2.5% y 3%, y fueron corridos por 3 horas a 35 mA. Los geles utilizados fueron de 80 ml. En los pozos de los

geles se sembraron 10µl de reacción de RFLPs. En esta estandarización se usaron las muestras A679 (*G. ventalina*), A692 (*E. colombiana*), B589 (*E. caribaeorum*) y A528 (*P. citrina*) al ser positivas en resultados anteriores.

5.6 DGGE

Las reacciones de PCR (10uL por pozo) fueron separadas en geles de poliacrilamida al 8%, TAE 1X y con un gradiente lineal denaturante de 45-80%. Se realizó un precorrido del gel a 60°C por 20 minutos a 150V, seguido por la electroforesis a 60°C por 9 horas a 150V. Los geles fueron sumergidos en una piscina de Bromuro de etidio por 30 minutos luego de lo cual eran jugados con agua y fotografiados con iluminación UV en un documentador Biorad Chemidoq XRS la visualización fue posible gracias al uso del programa Quantity One.

Luego de realizado el DGGE inicial se replicó el análisis en un DGGE confirmatorio de algunas especies para determinar la replicabilidad de los resultados obtenidos inicialmente. En este análisis que incluía además nuevas especies no estudiadas inicialmente se intentó sembrar un marcador de peso molecular de 100pb a 1000 pb con la intención de tener un patrón de bandeo para realizar comparaciones. Sin embargo al analizar resultados se decidió tomar los patrones de bandeo de *Gorgonia ventalina* y *Pterogorgia citrina* como punto de comparación.

6. Resultados

6.1 Muestreo

Durante las dos salidas de campo se tomaron más de dos mil muestras para los distintos proyectos que se llevan a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Marina (BIOMMAR) en la Universidad de los Andes. De la totalidad de las muestras 350 correspondían a octocorales, las cuales fueron tomadas en 30 distintos arrecifes coralinos ubicados entre Cartagena, Islas del Rosario e Isla Barú. (Ver Anexo 1 y 2). Al realizar el muestreo fue evidente que el rango de profundidad donde los octocorales presentaban una mayor abundancia y diversidad se encuentra entre 40 ft y 60 ft, rango de profundidad donde se recolectó más del 80% de muestras. En los muestreos más someros (a menos de 30 ft) se encontraba principalmente a la especie *Erythropodium caribaeorum* mientras en los arrecifes más profundos se encontraba una gran diversidad de octocorales. Con respecto a la diversidad y abundancia fue evidente la ausencia casi completa de la especie antes abundante *Gorgonia ventalina* causado probablemente por enfermedades como la Aspergiliosis de origen terrestre (Smith et al. 2004).

6.2 Identificación

Se identificó un total de 32 especies de octocorales agrupados en 10 géneros y 3 familias (ver anexo 1). Sin embargo sólo 14 especies tenían suficiente número de muestras para poder replicar los estudios. De estas 14 especies se escogieron entre 3 y 6 muestras de cada una, intentando abarcar al mismo tiempo distintas estaciones de muestreo. La selección inicial de muestras fue de más de 80 incluyendo por lo menos 3 réplicas de cada especie, a partir de las cuales se escogieron, de acuerdo a la calidad de la extracción 60 muestras como se observa en el Anexo 2. Aunque la cantidad de muestras extraídas de octocorales superaba las 350, en el momento de hacer el estudio menos de la mitad de éstas se encontraban identificadas, por lo cual el número de réplicas y especies se limitó.

6.3 Extracción de ADN

El procedimiento de extracción fue exitoso dado que en pocos casos la visualización del ADN no fue posible en los geles de agarosa, y cuando esto sucedía la extracción era repetida. El número total de muestras de octocorales que fueron procesadas fue de 80, con un 95% de éxito en la extracción, lo que indica que los procedimientos fueron eficientemente aplicados. Sin embargo, un alto porcentaje de extracciones tenía como producto final ADN degradado (ver Fig. 10), lo que pudo deberse a diversos factores, que van desde la maceración de la muestra, hasta un correcto pipeteo al retirar la fase superior en los pasos de fenol-cloroformo y cloroformo. Es posible que en algunos casos la proteinasa K no haya sido capaz de degradar completamente las DNAsas presentes en el extracto, generando cortes en el ADN presente, para lo cual sería recomendable aumentar el

tiempo de incubación y/o concentración de la proteinasa. Es claro además, que debido al tamaño, cantidad y susceptibilidad del ADN luego de ser liberado de las histonas, es inevitable su fragmentación parcial. El ADN degradado es igualmente útil para el objetivo del estudio, dado que el tamaño del fragmento a amplificar es bastante pequeño (200 -300 pb) y con un número alto de repeticiones en el genoma, por lo cual, podemos decir que la extracción fue exitosa y suficientemente buena para proseguir con el PCR.

Al intentar correlacionar el éxito de la extracción con la especie de coral no se pudo establecer alguna relación clara, por lo cual la calidad de extracción depende enteramente de los procedimientos aplicados. Del total de extracciones realizadas se escogieron entre 3 y 4 por especie, de acuerdo a su calidad y lugar de muestreo, y a partir de éstas se realizaron las reacciones de PCR (ver Anexo 2 y 3). Las extracciones escogidas en general tenían una calidad e intensidad buena lo que permitió estandarizar prácticamente para todas las muestras la dilución 1/100 para la realización del PCR. Las muestras escogidas por especie preferiblemente se seleccionaron de distintas estaciones de muestreo.

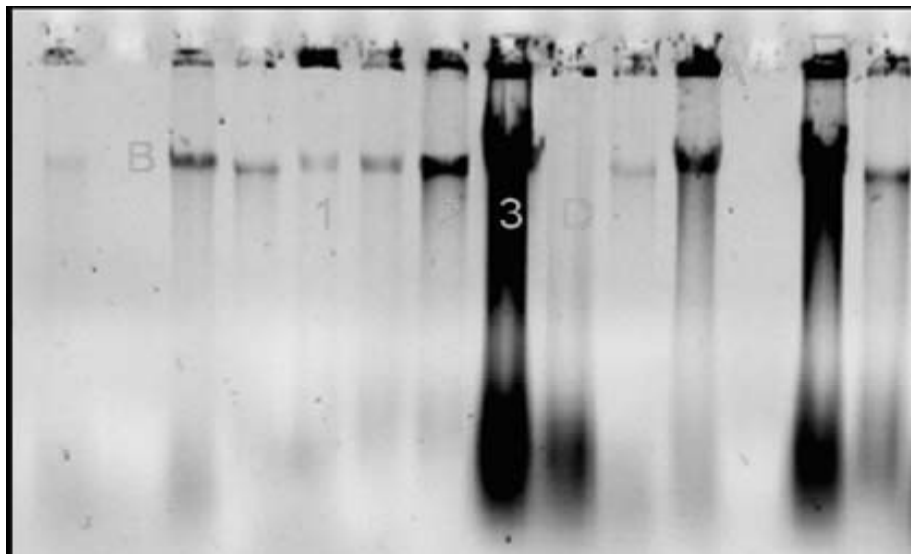


Fig. 10. Extracción de ADN Octocorales. A. Banda alta, B. Banda baja, D. Degradado. Intensidad de menor a mayor 1,2 y 3.

6.4PCR

6.4.1 Estandarización $MgCl_2$ y concentración de ADN

Al analizar los resultados se seleccionó como dilución óptima de ADN 1/100 para las extracciones que presentaban una banda tipo A y una intensidad de 3, y para extracciones con ADN de inferior calidad se determinó la dilución 1/50 como la óptima. Las reacciones de PCR realizadas con una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$ no mostraron amplificación alguna, mientras las reacciones con 3 mM presentaron una excelente amplificación (ver fig. 12) por lo cual se escogió la concentración de 3 mM de $MgCl_2$ como punto de partida para refinar la concentración óptima de $MgCl_2$. En este caso se observó la presencia de dos

bandas de peso similar, lo cual se podría explicar por variaciones alélicas del ITS2 o por una amplificación inespecífica dado que la temperatura de anillaje aun no se había estandarizado.

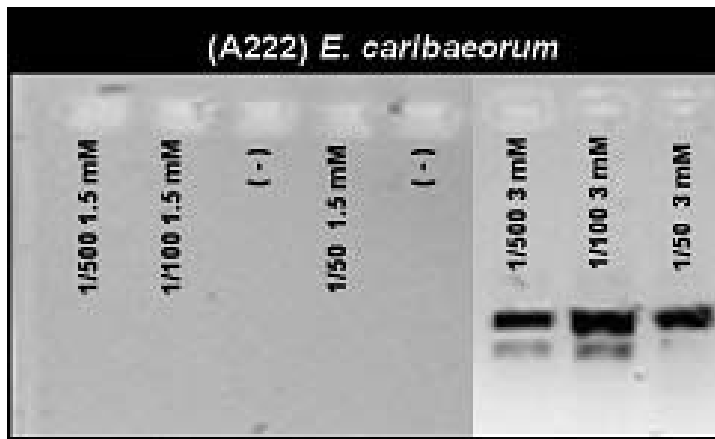


Fig. 11. PCR preliminar para determinar concentración óptima de MgCl₂ y dilución de ADN.

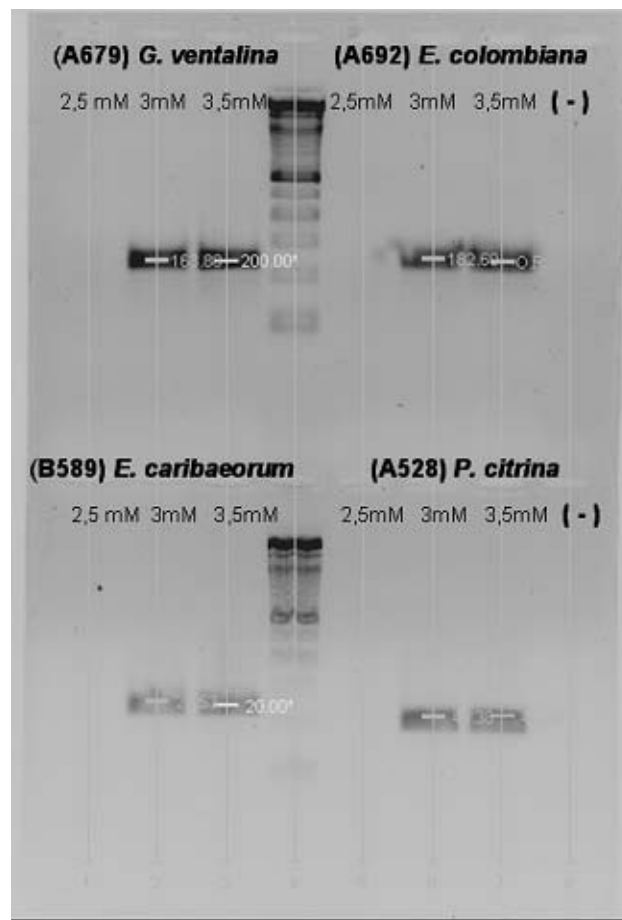


Fig. 12. Estandarización final de la concentración de MgCl₂ por medio de la estimación de mayor intensidad de bandas comparativamente entre ellas usando el programa Quantity One.

Para realizar la estandarización final de la concentración de $MgCl_2$ se realizaron ensayos de PCR usando tres concentraciones (2.5 mM, 3.0 mM y 3.5 mM) en cuatro especies representativas de distintos grupos de octocorales. Los resultados mostraron que de las concentraciones usadas las que arrojaba mejores resultados era 3.5 mM, aunque la diferencia con 3.0 mM no era muy grande (ver fig. 12). Como resultado no esperado se observó que a 2.5 mM no se presentaba amplificación alguna.

6.4.2 Estandarización Temperatura de Anillaje

Al analizar las temperaturas de anillaje en el gradiente se observó que existe una evidente mejora en la amplificación en las temperaturas altas comparadas con las bajas, además en todas las temperaturas obtuvimos amplificados de todas las especies probadas (ver figura 12). Sin embargo la temperatura que mostró una mejor amplificación fue 56.2 °C, dado que presentó un menor ruido y gran producto de amplificación, por tal razón se escogió 56.2°C como la temperatura óptima para realizar el PCR.

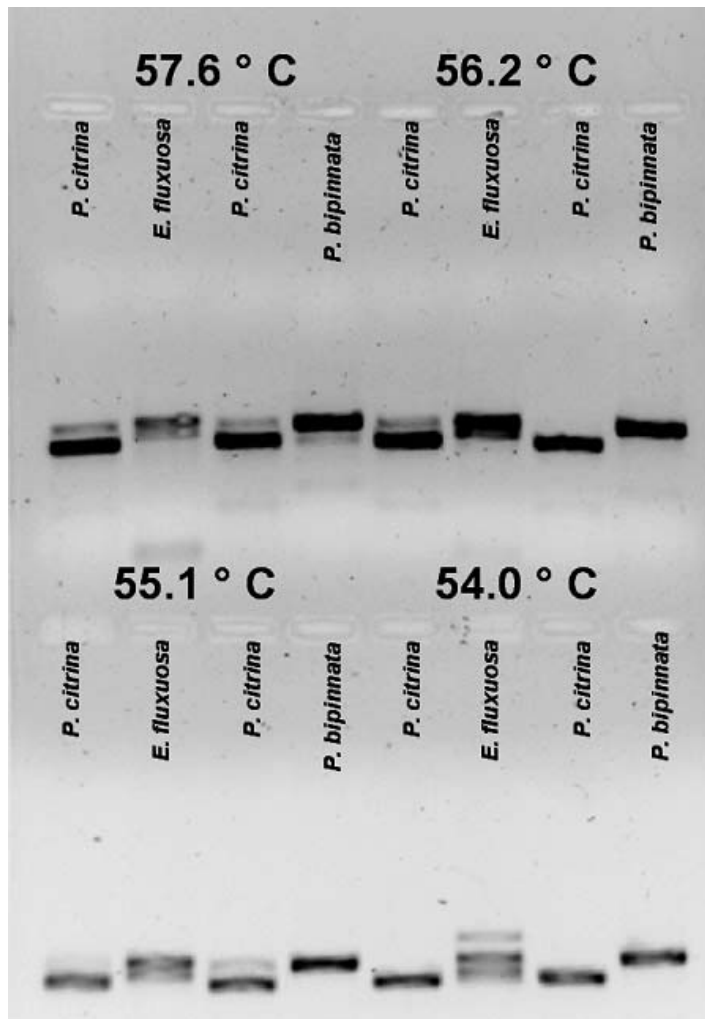


Figura 13. PCR gradiente de temperatura del ITS2 de octocoral

Es evidente que en algunos casos se observaron dos o mas bandas, lo cual ya había sucedido en anteriores estandarizaciones (ver fig. 11), pero en este caso pudo ser debido a contaminaciones cruzadas en el momento de preparar el coctel y/o al servir el gel, dado que se utilizaron pozos pequeños, los cuales son más propensos a este tipo de errores.

6.4.3 Condiciones finales

Fue evidente en el PCR confirmatorio final que el proceso de estandarización fue eficiente, dado que las amplificaciones obtenidas con las condiciones finales son excelentes, todas las especies amplificaron exitosamente exceptuando a la especie *Muriceopsis flavida*. En el caso de *Pseudoplexaura porosa* se observó una banda tenue pero suficientemente intensa para realizar los análisis requeridos posteriormente (ver fig. 14). En este ensayo y ensayos anteriores fue claro que existen diferencias de peso molecular entre amplificados de distintas especies, lo que nos da un indicativo de polimorfismos (ver fig. 14). Por esta razón un nuevo ensayo usando el programa Quantity One y un marcador de peso fué realizado para determinar el tamaño aproximado de cada producto (ver fig. 15).

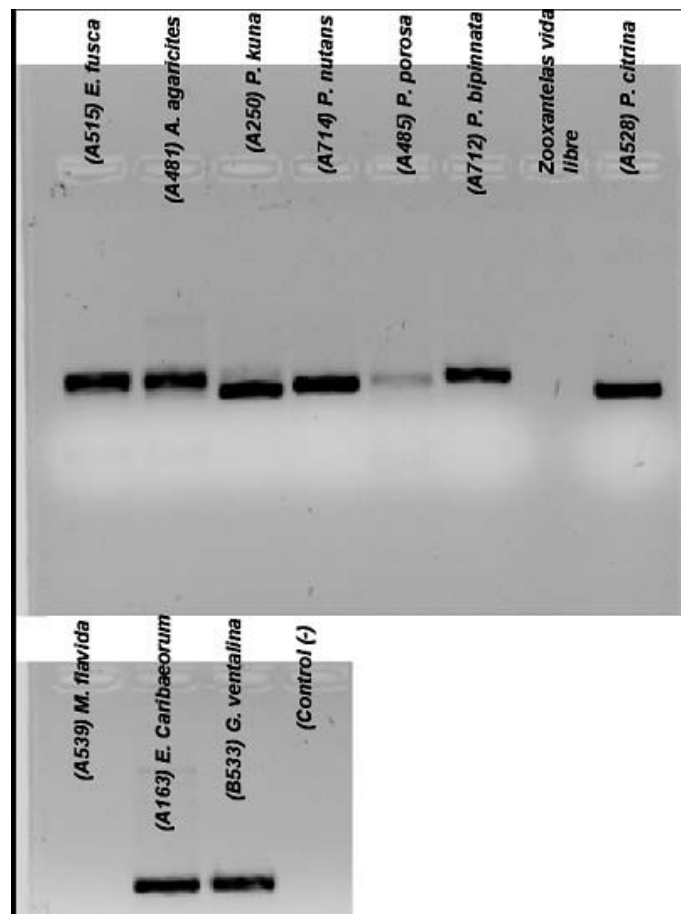


Fig. 14. PCR confirmatorio de ITS2 de octocorales con diferentes especies, las especies y muestras incluidas en este gel confirmatorio no son las mismas que fueron utilizadas en los ensayos para DGGE.

En este ensayo además se utilizaron controles para determinar la especificidad de los primers, *Agaricia agaricites* (escleractineo) mostró una amplificación buena, lo cual nos indica que estos primers pueden ser usados para amplificar cualquier tipo de coral, sin embargo estudios con mayor cantidad de muestras son necesarios. Por otro lado, muestras de zooxantelas de vida libre fueron usadas para demostrar la especificidad de los primers a corales y no de sus simbiontes, la prueba arrojó los resultados esperados al no presentar se amplificación.

Tabla 1. Pesos de los amplificadores de ITS2 de diferentes especies, usando Quntity One y escalera Biorad de 100pb.

Genero Especie	<i>Pterogorgia citrina</i>			<i>Gorgonia ventalina</i>		<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	<i>Eunicea clavigera</i>		<i>Erythropodium caribaeorum</i>	<i>Eunicea colombiana</i>
Muestra	A501	A528	A551	B377	A679	A727	A717	A129	B589	A692
Pesos (Kb)	190	215	215	241	248	259	224	230	223	232

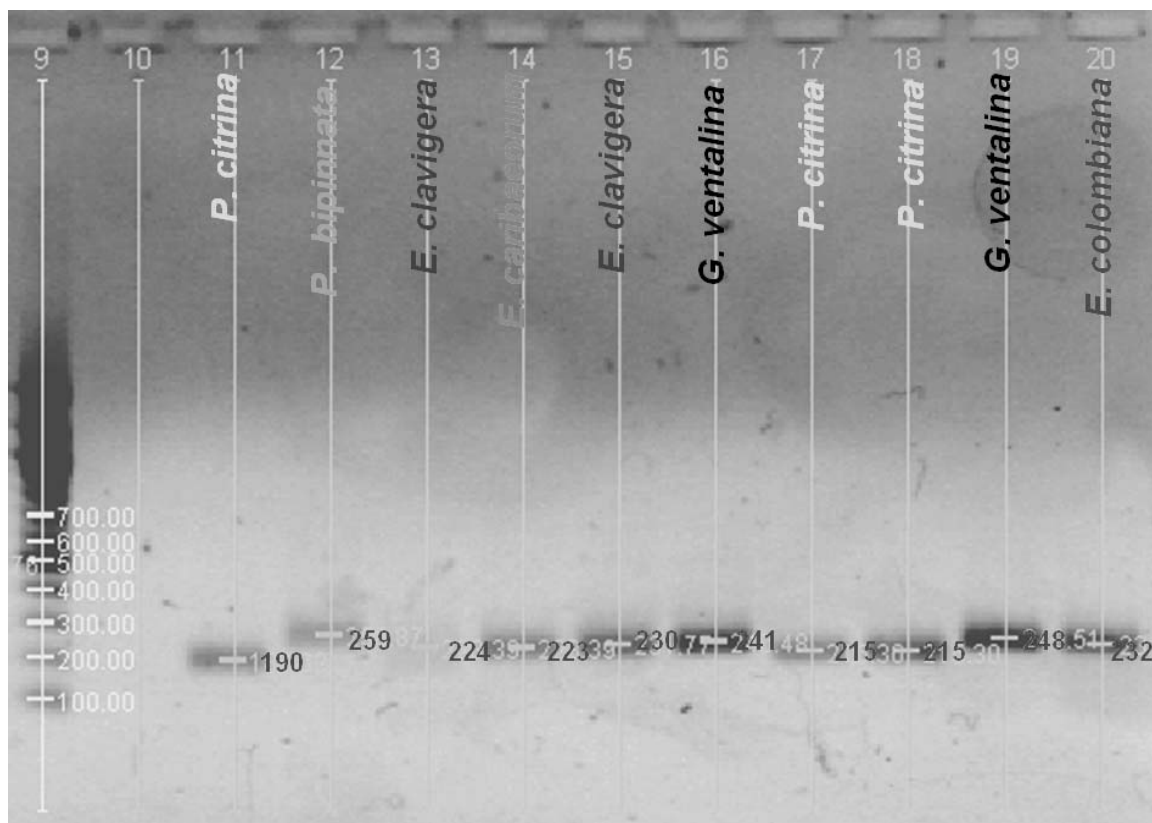


Fig. 15. PCR de ITS2 de octocorales, diferencias en el peso molecular de los amplificadores

Según el diseño de los primers el producto de amplificación esperado es de 230 pb, lo cual es verificado en el ensayo que se realizó para determinar las diferencias aproximadas de pesos moleculares observadas en los anteriores procedimientos, donde se obtuvieron amplicones de 190 pb a 259 pb, con un promedio de 230 pb. Sin embargo este rango

relativamente amplio es evidencia de la existencia de un gran polimorfismo en el ITS2, incluso visto intraespecíficamente (ver fig.15), lo cual ya ha sido reportado en diferentes organismos y estudios (Harris et al. 2000 y Odorico et al. 1997).

Fue claro además que existe un rango de longitud característico de cada especie (ver tabla 1). De las especies estudiadas, *Pterogorgia citrina* posee el ITS2 más corto, donde dos de las tres réplicas tienen un mismo tamaño (215 pb) mientras la tercera tiene un tamaño mucho menor (190pb), presentando la mayor diversidad intraespecífica con 25 pb de diferencia. En Orden ascendente continúa *Erythropodium caribaeorum* con 223 pb, sin embargo en este caso al no tener réplicas no existe manera de conocer su variabilidad intraespecífica. *Eunicea clavigera* presenta en la primera réplica una longitud de 224pb y 230 pb relativamente semejantes y la única muestra de *Eunicea colombiana* presenta una longitud de 232pb, estas dos especies presentan una longitud prácticamente igual, lo cual es esperado al tratarse del mismo género y por lo tanto ser especies muy cercanas. *Gorgonia ventalina* presenta una longitud de 241 pb y 248 pb lo que es relativamente similar, y por último tenemos a *Pseudopterogorgia bipinnata* con 259 pb.

De las 60 muestras amplificadas en el PCR general se obtuvo producto de amplificación en un total de 47 muestras (ver anexo 2 y 3) (geles no mostrados), es decir un 78% de éxito en la amplificación y solamente la especie *Plexaura homomalla* fue negativa en todas las réplicas amplificadas. En algunos casos las amplificaciones no mostraban calidad suficiente para realizar los análisis posteriores. Sin embargo las especies *Eunicea fusca* y *E. asperula*, mostraron la eficiencia más baja en el PCR con solo un 40%, y *E. colombiana* con un 60% lo que indicaría que existe un nivel de dificultad mayor en estos casos y especialmente en este género. El resto de las especies amplificaron exitosamente sin ningún problema.

6.5 RFLPs

Al comenzar a aplicar los RFLPs sobre el ITS2 se debía probar si en esta secuencia tan corta (230 pb –260pb) existen suficientes sitios de restricción de la Taq I para poder determinar polimorfismos en la secuencia, por lo cual se realizaron ensayos donde se demostró que la enzima escogida (Taq I) arrojaba resultados positivos al digerir el ITS2 en varios fragmentos en todas las muestras ensayadas. Además fué claro que existían polimorfismos entre las diferentes especies, al observar patrones de bandeo distintos para cada una de éstas (ver fig. 16).

Los patrones de bandeo obtenidos fueron de difícil visualización por tratarse de fragmentos muy pequeños, generalmente de menos de 100 pb, para lo cual era necesario el uso de geles de poliacrilamida y de marcadores de peso especializados, lo cual no se disponía en el laboratorio en el momento de hacer los ensayos. Sin embargo todas las visualizaciones se realizaron en geles de Agarosa ensayando altas concentraciones (2% - 3.5%) para mejorar la resolución, pero en todos los casos no se obtuvo la resolución suficiente para el análisis adecuado de los productos de restricción. Por lo cual la identificación de patrones mediante RFLPs no se pudo realizar.

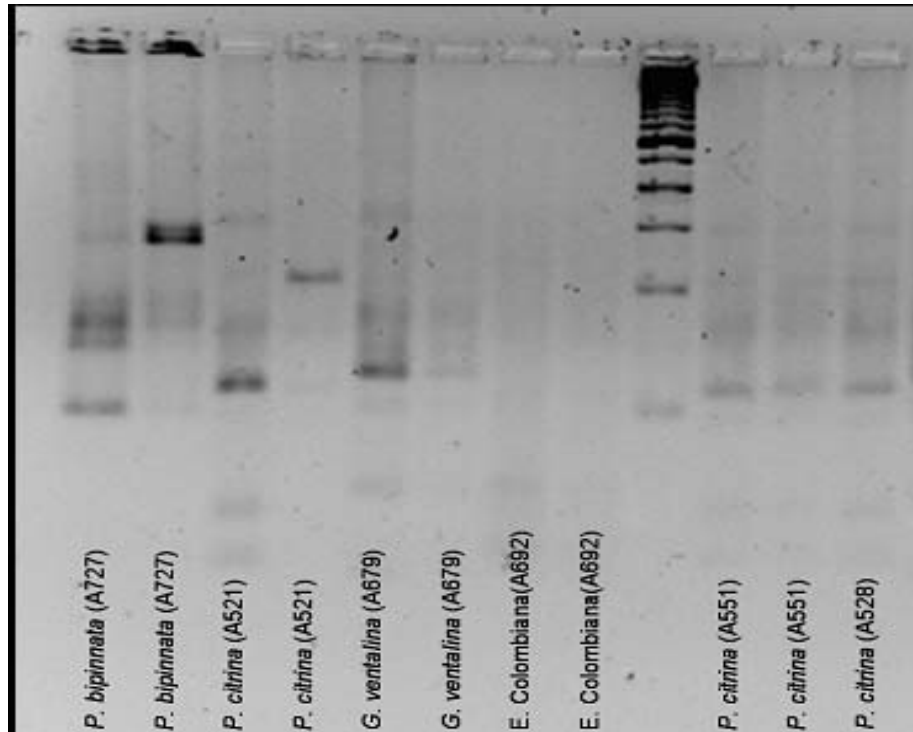


Fig 16. RFLPs de algunas especies de octocorales en gel de azarosa al 3%, alta replicabilidad y baja resolución.

6.6 DGGE

Las condiciones iniciales utilizadas para el DGGE arrojaron resultados muy buenos, por lo cual la estandarización fue relativamente sencilla y corta, lo que permitió correr los amplificadores de una manera eficiente. Algunas especies estudiadas presentaron una sola banda característica (*G. ventalina*, *P. citrina*, *E. caribaeorum*, *P. rigida*, *E. colombiana*) las cuales son fácilmente identificables al compararlas una respecto a la otra (Fig. 17). El orden de corrido de los patrones con una sola banda es el siguiente: *P. citrina* la cual presentaba la banda con mayor desplazamiento en el gel, seguido por *E. caribaeorum*, *P. rigida* y por ultimo *G. ventalina*. En el caso de *E. caribaeorum* tres de las cuatro réplicas mostraron los mismos resultados pero con la muestra B392 se obtuvo una banda con un recorrido mayor.

Dada la necesidad de tener un patrón conocido para poder establecer comparaciones en los resultados, se intentó usar un marcador de peso molecular de 100pb, lo cual no dio resultados positivos (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió tomar a dos de las especies que presentaban una sola banda en el DGGE como patrones, escogiendo a *Gorgonia ventalina* y *Pterogorgia citrina* la presentar las bandas con menor y mayor migración en este grupo (ver fig. 19). Es así, que se intentó en todos los ensayos posteriores usar por lo menos una de estas dos especies, facilitando de esta manera las comparaciones. Para realizar el análisis de todas las muestras se compararon los geles obtenidos con un gel patrón que contiene estas especies (ver. Fig. 17 y 18), este gel patrón sirvió además para

demostrar la replicabilidad de los resultados obtenidos en algunas especies (*G. ventalina*, *P. citrina*, *E. caribaeorum*), arrojando resultados positivos, al obtener los mismos o muy similares patrones de bandeo en los ensayos iniciales y en las repeticiones. Sin embargo, en varios geles se observó una alta susceptibilidad del DGGE para producir efectos de corrido no uniforme (P. ej. Efecto sonrisa), por lo cual en las réplicas se evitó sembrar los pozos de los extremos.

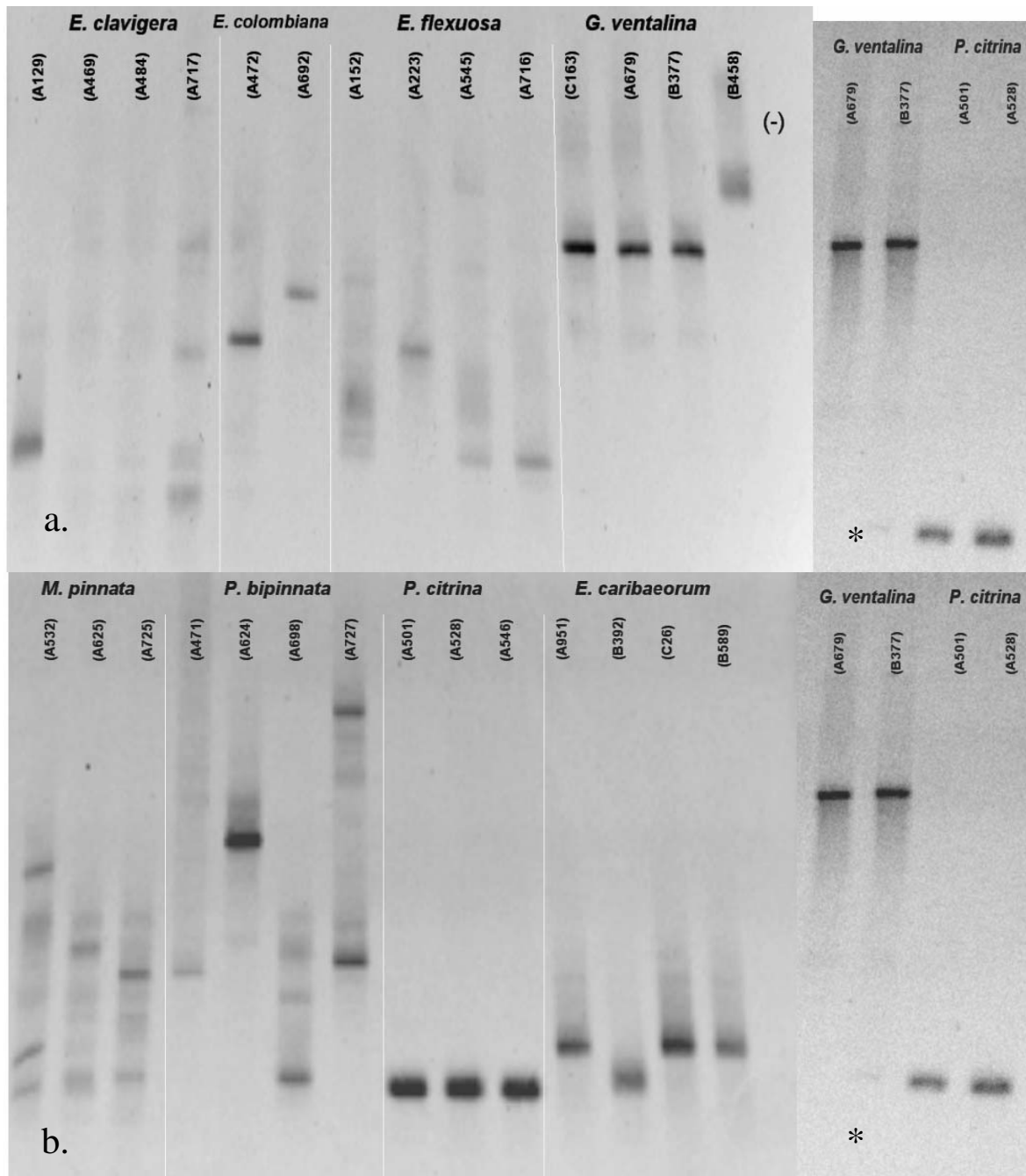


Fig. 17. DGGE de diferentes especies de octocorales comparado con el patrón de bandeo* de *P. Citrina* y *G. ventalina*. a y b Primera replica de DGGE.

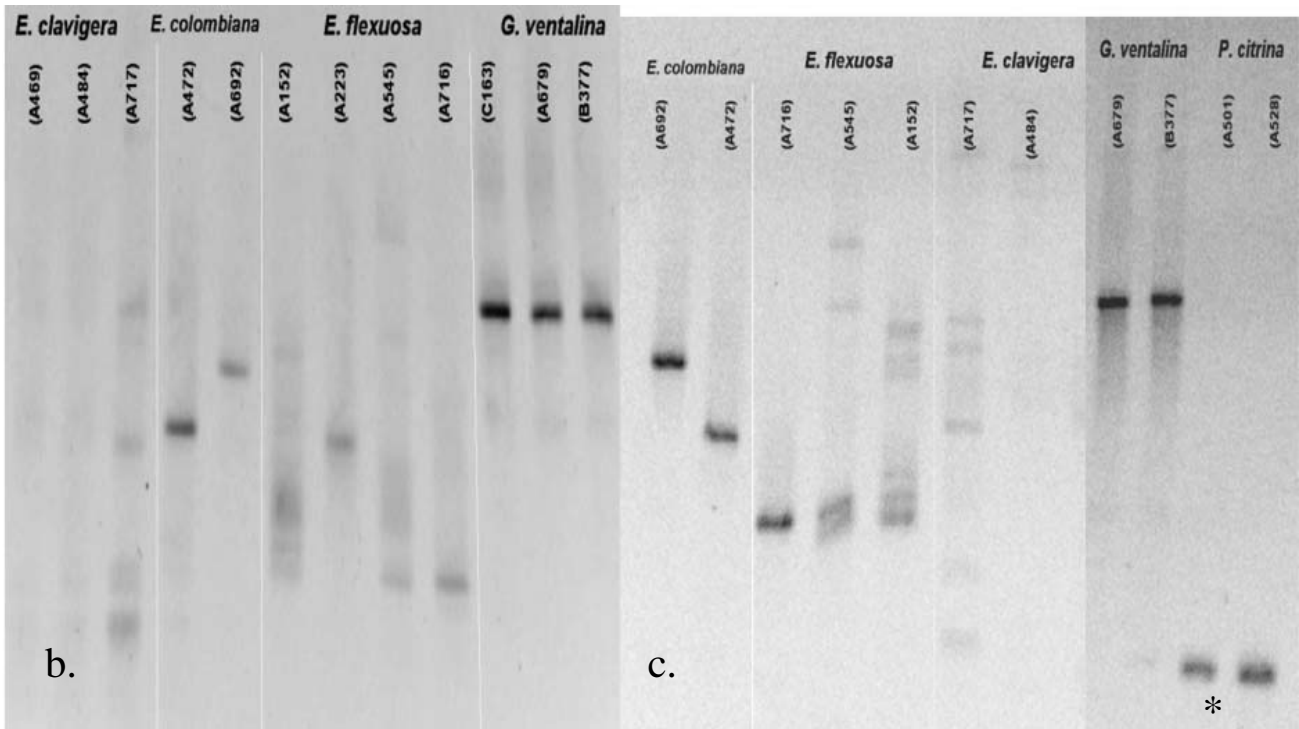
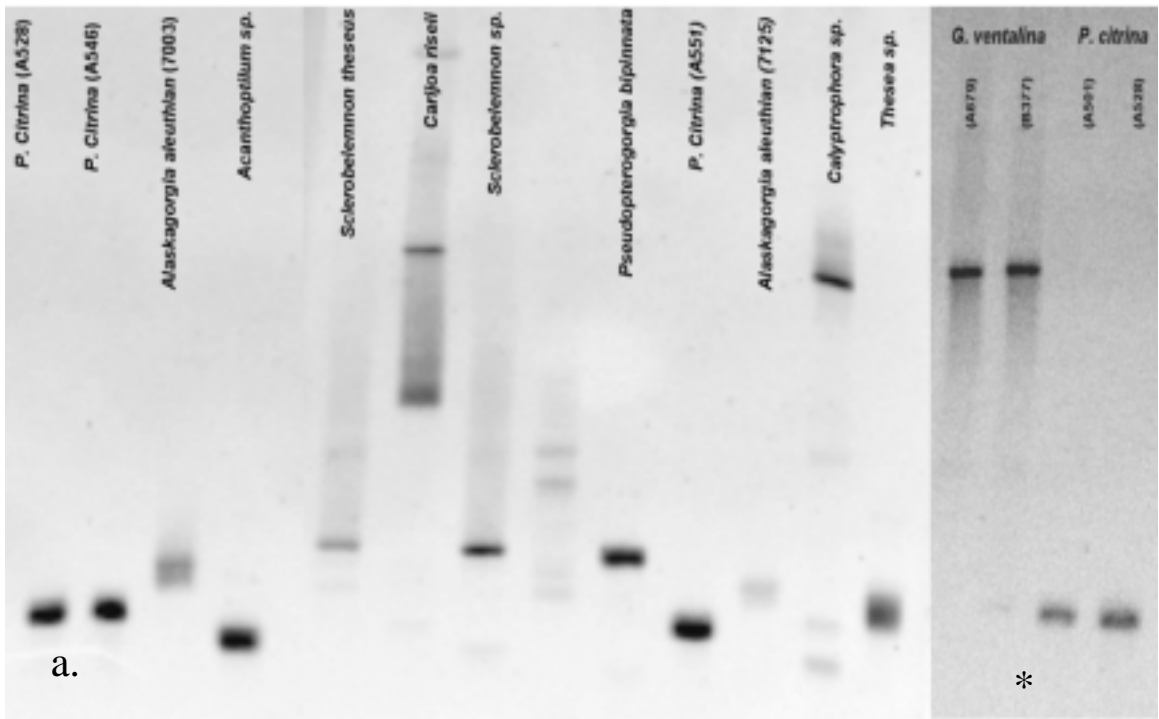


Fig. 18. DGGE de diferentes especies de octocorales comparado con el patrón de bande* de *P. citrina* y *G. ventalina*. a. DGGE de especies no pertenecientes al Caribe no incluidos dentro de los muestreos. b y c. Comparación de DGGE inicial (b) y replica (c).

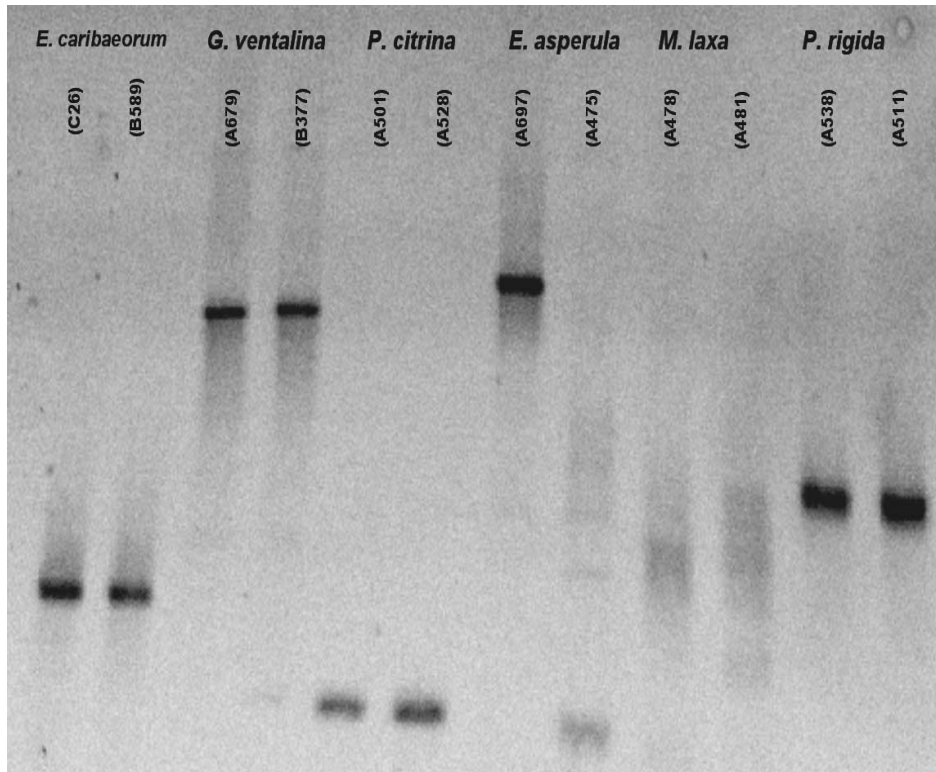


Fig. 19. DGGE de diferentes especies de octocorales, gel a partir del cual se construye el patrón para comparación.

Dentro de los resultados obtenidos se resalta el hecho de que en varias especies de octocorales (*E. clavigera*, *E. flexuosa*, *M. pinnata*, *P. bipinnata*, *M. laxa*, *Cayiptrophora sp.*, *Carijoa risei*, *Sclerobelemnon theseus*), se observaron patrones de múltiples bandas (ver fig 13 a-b, 14 a - b), los cuales son evidencia de variabilidad en el ITS2 entre las copias de ADNr presente en el genoma, este tipo de resultados que ya han sido reportados en diferentes especies de eucariotes (Harris et al. 2000), muestra la gran variabilidad de esta secuencia.

En varios casos las especies mostraban gran variabilidad intraespecífica en individuos provenientes de distintos lugares de muestreo (*E. colombiana*, *E. flexuosa*, *M. pinnata*, *P. bipinnata*, *E. asperula*) (ver fig. 17, 18 y anexo 1), demostrando la gran diversidad de la secuencia usada y la gran sensibilidad del DGGE. Se demostró además que esta variabilidad intraespecífica observada es replicable al obtener las mismas bandas en posteriores ensayos de DGGE.

En varios casos, la variabilidad intraespecífica no se encontraba en el patrón de bandeo, sino en variaciones en la intensidad de cada una de las bandas (ver fig. 17 a y 18 b, c), siendo los casos mas conspicuos *M. pinnata*, *E. flexuosa* y *E. clavigera*. En las especies con patrones de bandeo complejos donde se presentaba variabilidad intraespecífica se observaba gran heterogeneidad en las bandas presentes. Y no se descarta que en algunos casos donde se presentaban bandas altas en el DGGE, éstas sean causadas por la presencia

de ADN heteroduplex. También se descarta la presencia de dímeros de primer al no presentarse en ningún ensayo de PCR.

Se puede resaltar también el hecho de que los primers usados durante todo el estudio, fueron los mismos inclusive para el DGGE, donde no se usaron primers con secuencias ricas en C-G en los extremos o CLAMP, demostrando así, que no existe la necesidad de su uso en este caso, esto dado talvez por la gran variabilidad del ITS2 en este grupo de organismos y por tratarse de un estudio donde el objetivo inicial eran realizar comparaciones interespecíficas, por lo cual sorprende aún mas el hecho de obtener esta gran variabilidad intraespecífica.

7. Análisis de resultados

Son pocas las investigaciones que hasta ahora se han realizado donde se incluyan tal cantidad de muestras y número de especies para estandarizar el uso de un marcador molecular de gran espectro en Octocorales (ver sección 4.3). Sin embargo, se recolectaron muestras insuficientes de algunas especies de Octocorales para realizar su análisis; es así, que de las 32 especies recolectadas sólo 17 tenían 3 o más muestras, por lo cual si se desea realizar un estudio más extenso y profundo sería necesario realizar un muestreo más amplio en un rango geográfico mayor, donde se incluya la extracción de por lo menos ocho réplicas por especie, en por lo menos 4 diferentes lugares de muestreo. Al mismo tiempo, sería recomendable incluir la mayor cantidad de especies posibles y por lo menos teniendo en cuenta una especie representante de cada género descrito en el Caribe. Sin embargo, vale la pena aclarar que en el momento de realizar este estudio aún faltaba por identificar más de la mitad de las muestras recolectadas, por lo cual en estudios posteriores se podrá incluir una mayor cantidad de réplicas y especies una vez identificada la totalidad de las muestras. Al mismo tiempo, el número de muestras provenientes de zonas lejanas como del Océano Pacífico podría ser mayor mediante el intercambio con varios laboratorios.

Con respecto a la extracción, se ratificó que el protocolo usado fue adecuado y de relativamente sencilla aplicación en octocorales, facilitado por que estos organismos no poseen estructuras duras como en el caso de los escleractineos. Se observó además que la extracción fue igualmente exitosa en todas las especies estudiadas. Sin embargo es evidente la necesidad del uso de algún método para la cuantificación del ADN presente en cada extracción, esto permitiría saber la cantidad de ADN exacta requerida para cada procedimiento, idealmente la cuantificación se puede llevar a cabo por medio de espectrofotometría de UV, dado que al tratarse de ADN total sería complicada la cuantificación por algún otro método.

La estandarización del PCR fue exitosa permitiendo amplificar más del 90% de las especies analizadas, lo que indica que la concentración del cofactor, temperatura de anillaje y demás condiciones eran correctas. Sin embargo, existe la posibilidad de que la única especie que no amplificó y las que mostraron una eficiencia baja, fuera el resultado de no estandarizar cuantitativamente la concentración de ADN utilizado en el PCR, esto debido a que la cantidad de ADN en estas especies pudiera no haber sido suficiente para la amplificación o inclusive que fuese excesivo. En ambos casos, el PCR se puede ver gravemente afectado. Sin embargo, al analizar el caso del género *Eunicea spp.* cuya eficiencia fue baja en el PCR, no se pudo establecer una relación entre calidad de ADN y amplificación, cabe anotar que este análisis solo es posible realizarlo cualitativamente por la manera de calificar la extracción.

Por otro lado, la aparición de bandas múltiples (hasta 3 bandas) (ver fig. 11 y 13) desde los primeros ensayos de PCR se consideró inicialmente como contaminación en el momento de servir las muestras en el gel. Sin embargo después de realizada la estandarización de temperatura de anillaje se observó que la aparición de bandas múltiples era repetitiva y en todos los casos existía una banda dominante, aunque cabe aclarar que luego de esta

estandarización, la intensidad y frecuencia de aparición de bandas “secundarias” disminuyó significativamente, aunque no desaparecieron totalmente. Lo anterior, sumado al hecho que el tamaño del fragmento es correspondiente al esperado, podría ser un leve indicio que la segunda o incluso en algunos casos tercera banda pudiera corresponder a alelos de ITS2 no dominantes presentes en el genoma o incluso pseudogenes lo suficientemente diferentes como para mostrar productos de amplificación diferenciales. No obstante, esto es especulación hasta que pueda ser confirmado mediante la secuenciación de estos fragmentos. De igual manera, el hecho que en los resultados del DGGE se observaran patrones de múltiples bandas apoya la idea planteada, pero se esperaría que existiera una correlación en las especies que mostraron múltiples bandas en PCR y DGGE. Contrario a esto, las especies *E. caribaeorum* y *P. citrina* muestran una sola banda de DGGE y dos en PCR. Por lo cual posiblemente la aparición de estas bandas sean artefactos de PCR.

Desde los primeros ensayos de PCR se observó una diferencia significativa en el producto de amplificación obtenido en las diferentes especies, por lo cual se realizó un ensayo para estimar el peso del amplificado en 6 especies, evidenciando que el producto amplificado varía intra e interespecíficamente (de 190pb a 260 pb) (ver tabla 1) con rangos intraespecíficos pequeños y rangos interespecíficos mas amplios. Esto en primer lugar demuestra la gran variabilidad del marcador seleccionado y en segundo lugar su utilidad en estudios de organismos o poblaciones cercanas. Sin embargo, sería interesante realizar un ensayo con una mayor cantidad de especies y réplicas, lo que permitiría establecer rangos de tamaños con mayor confiabilidad. Es importante aclarar que las diferentes réplicas usadas de una misma especie provenían de distintas estaciones de muestreo, por lo cual también sería de utilidad tener réplicas de distintas colonias de la misma estación, permitiendo determinar si la variación se da sólo entre poblaciones distantes geográficamente o también en poblaciones provenientes del mismo lugar. Por lo mismo el análisis que se puede realizar es limitado hasta no profundizar más.

El análisis de RFLPs realizado sobre los amplicones demostró que en esta secuencia tan corta existen múltiples sitios de corte para la enzima Taq I, y además se confirmó la existencia de grandes polimorfismos en el ITS2, observados como patrones de bandeado muy diferentes entre las distintas especies. Los fragmentos de restricción obtenidos en su mayoría correspondían a menos de 100pb, por lo cual el uso de geles de agarosa limitó el análisis al ser la resolución de estos geles insuficiente en todas las condiciones probadas. Por lo tanto sería recomendable el uso de geles de poliacrilamida y marcadores de peso molecular de 10 pb en estudios posteriores.

El amplio uso actual que se le esta dando al DGGE se debe en gran medida a la versatilidad de estudios y aplicaciones que puede generar, por lo cual esta técnica fue usada en este trabajo, arrojando resultados excelentes. Sin embargo, a lo largo de todos los estudios realizados con DGGE la regla general dice que es necesario el uso de secuencias ricas en G y C o CLAMP en los extremos de los primers para aumentar la resolución de los geles y poder detectar diferencias incluso de una sola base entre distintas copias del amplificado (Myers et al. 1987). El uso del CLAMP en los primers desde el principio de este estudio no se tuvo en cuenta por tratarse inicialmente de comparaciones entre especies, lo cual suponía diferencias suficientemente grandes para poder ser observadas sin el CLAMP, lo que fue confirmado al observar diferencias interespecíficas grandes sin la

necesidad del CLAMP, pero sorprendió el hecho de que se observara una gran variabilidad intraespecífica sin el uso de ésta secuencia, demostrando que la variabilidad del ITS2 en octocorales es muy alta y por lo tanto el uso del CLAMP puede ser opcional o innecesario. Sin embargo, la posibilidad de obtener resultados con mayor resolución usando el CLAMP queda aun vigente, sobretodo en casos donde se obtuvieron patrones de bandeo sencillo, los cuales podrían convertirse en patrones complejos usando ésta secuencia en los primers, por lo cual realizar un estudio de comparación sería interesante, donde se pudiera observar el mismo amplificado en DGGE con y sin CLAMP.

Los resultados obtenidos en el DGGE demuestran la gran variabilidad del ITS2, la cual ha sido estimada en una divergencia del 4% al 20% -excluyendo INDELS- en algunas especies estudiadas previamente (Aguilar y Sánchez, en prensa). Por lo cual, la extrema variabilidad de esta secuencia en los octocorales puede llevar a resultados filogenéticos erróneos al ser usada como marcador molecular (Odorico et al. 1997, Medina et al. 1999) para resolver relaciones entre especies distantes. Por tal razón, se ha propuesto el uso de la morfometría en las predicciones de la estructura secundaria del ITS2 para resolver la mayoría de inconvenientes relacionados con los errores del alineamiento primario (Chen et al. 2004; Aguilar y Sánchez, en prensa). Sin embargo, existe una necesidad específica en octocorales para resolver relaciones entre grupos y especies cercanas e incluso para determinar relaciones intraespecíficas, por lo cual el ITS2 es considerado apropiado en estos casos, donde otros marcadores moleculares mitocondriales y nucleares no muestran variabilidad (France y Hoover 2002).

Las especies que presentaron patrones de bandeo simples, es decir con una sola banda (*G. ventalina*, *P. citrina*, *E. caribaeorum*, *P. rigida*) (ver Fig 13 y 14), probablemente poseen un sólo alelo de ITS2 en el genoma. Al mismo tiempo, es posible establecer una correlación entre la presencia de una sola banda (un solo alelo) y la variabilidad intraespecífica, dado que en todos los casos donde encontramos poca o ninguna variabilidad intraespecífica estaba relacionado con patrones de bandeo simples. Por lo anterior se puede decir que en estos casos se ha contado con suficiente tiempo para que la evolución en concierto homogenizara esta familia multigénica obteniendo así un solo alelo en la población, lo cual podría ser un indicador madurez en estas especies. Sin embargo, es posible que dado el limitado número de réplicas y lugares de muestreo analizados, fácilmente se podría estar excluyendo diferentes alelos de otras poblaciones aisladas geográficamente.

Las réplicas y especies que arrojaron patrones de bandeo sencillos pero con diferencias intraespecíficas, puede ser explicado a la presencia de distintos alelos dominantes, los cuales podrían estar distribuidos en poblaciones espacialmente aisladas. Sin embargo, este análisis solo podría hacerse al realizar estudios con muestreos estadísticamente significativos. De la misma forma las diferencias observadas podrían ser debidas a que se están estudiando varias especies crípticas como una sola, lo cual podría ser comprobado al realizar un análisis con algún(os) otro(s) marcador(es) molecular(es) y al realizar la secuenciación de los amplificados para determinar su filogenia. En el caso de *E. caribaeorum* (ver Fig 13 b) donde una de las cuatro bandas presenta un patrón diferencial, podría tratarse de un fenotipo distinto que anecdóticamente ha sido observado pero que aún no ha sido descrito. Adicionalmente, es interesante anotar que todas las especies donde se

observaron patrones de bandeo sencillos y sin variación intraespecífica en el DGGE, son especies fácilmente reconocibles *in-vivo*.

Algunos casos particulares (*M. pinnata*, *E. flexuosa* y *E. clavigera*) presentan patrones de bandeo complejos (múltiples bandas) similares intraespecíficamente con diferencias en la intensidad de las bandas presentes. Muy probablemente en estos casos, se puede estar observando diferentes alelos en la población con diferentes grados de dominancia, entendiendo dominancia como la cantidad de copias de cada alelo en el genoma. Es así, que en el caso de *M. pinnata* se observa cómo dependiendo de la muestra, la intensidad de las bandas varía aunque todas las bandas estén presentes en todas las réplicas estudiadas.

Los casos donde se observa un patrón complejo sin semejanza entre las réplicas, podría tratarse de especies con una gran variabilidad alélica, lo que podría indicar que se trata de especies jóvenes sin el suficiente tiempo para que la evolución en concierto homogenice la carga alélica. Esto además, nos llevaría a la posibilidad de estar analizando diferentes especies estrechamente emparentadas y con una divergencia reciente. Existe la posibilidad de incluso estar observando procesos de hibridización previamente reportados en octocorales (Macfadden y Hutchinson 2004), con la consiguiente gran variabilidad de alélica. Todas estas hipótesis pueden ser estudiadas al realizar la secuenciación de las bandas presentes, permitiendo analizar el comportamiento de cada uno de los alelos si se analiza un número significativo de muestras.

El uso de *P. citrina* y *G. ventalina* como patrones de bandeo fue adecuada y original; sin embargo, el limitar el uso en la mayoría de los geles de DGGE a una de las dos especies control, no permitió obtener un punto de comparación equidistante, dificultando la comparación. Por lo cual, para próximos ensayos sería recomendable el uso de los amplificadores de *P. citrina*, *E. caribaeorum* y *G. ventalina* de manera simultánea en un solo pozo, lo que permitiría en todos los casos realizar comparaciones válidas y realizar estimaciones del valor de cada banda en cada una de las muestras analizadas, al asignar valores determinados a las bandas de los patrones en el programa Quantity One, luego de lo cual calcularía el recorrido aproximado de cada banda de las muestras a analizar. De esta manera se podría generar un estándar para DGGE en unidades de corrido específicas (UCE), las cuales podrían ser utilizadas en análisis posteriores en DGGE, de la misma forma como actualmente se utilizan estándares de algunos fagos y plásmidos en gran diversidad de trabajos.

Al mismo tiempo este trabajo abre las posibilidades para el estudio del origen de la variabilidad intragenómica del ITS2 observada, lo cual se podría realizar por medio de la secuenciación de cada una de las bandas obtenidas en el DGGE, permitiendo realizar análisis que van desde alineamientos sencillos hasta filogenia basada en la predicción y estudio de las estructuras secundarias.

8. Conclusiones

A través de este estudio se demostró la viabilidad del uso del ITS2 como marcador molecular de amplio espectro en octocorales, un grupo que requiere mucho trabajo para poder elucidar sus relaciones inter e intraespecíficas. Además se utiliza exitosamente la técnica del DGGE la cual permite visualizar los polimorfismos del ITS2 de manera eficiente y replicable.

La estandarización de las técnicas aplicada al ITS2 fue exitosa dada su replicabilidad y aplicabilidad en el 90% de las especies de Ocotocorales estudiados. Sin embargo, fue evidente que el punto crítico en el procedimiento es el PCR, dado que es necesaria una amplificación excelente en cantidad y calidad para realizar los RFLPs y DGGE, y aunque la estandarización de PCR fue muy buena, puede ser mejorada para intentar incluir el 100% de las especies en todos los estudios, para esto podría ser clave la cuantificación del ADN extraído permitiendo estandarizar con exactitud la cantidad de ADN óptima para la reacción de PCR.

Los resultados obtenidos fueron sorprendentes al demostrar una variabilidad realmente impresionante del ITS2 a todos los niveles (intra genómica, Intra e Interespecífica), visto desde los primeros ensayos de PCR donde existían diferencias significativas en la longitud del amplicon cuando se esperaba una banda del mismo tamaño, seguido por la comprobación de polimorfismos en los RFLPs y confirmado en los patrones de bandeo observados en el DGGE, muchos de ellos muy complejos al estar compuestos hasta por más de diez bandas. Inicialmente se esperaba obtener patrones de bandeo sencillos y conservados para cada una de las especies, lo cual evidentemente fue cierto para un limitado número de especies, pero muchas de las especies estudiadas mostraron una variabilidad que superaba cualquiera de las predicciones. Sin embargo aunque sorprendentes e inesperados hasta cierto punto, los resultados de este estudio demuestran la utilidad del ITS2 como marcador molecular y abre nuevas incógnitas que seguramente al ser investigadas generaran un conocimiento mayor en el funcionamiento de ADNr y su evolución.

En este estudio se demostró que al realizar comparaciones en DGGE de secuencias con suficiente variabilidad, no es necesario el uso del CLAMP para aumentar la resolución de la técnica, sin embargo, existiría la posibilidad de que al usar esta secuencia los patrones de bandeo que vemos como sencillos sin el uso de CLAMP pudieran convertirse en patrones complejos con su uso, de cualquier forma una comparación en el corrido usando las dos opciones respondería a esta pregunta.

Los resultados del DGGE son indicadores de la existencia de múltiples alelos de ADNr en gran parte de las especies estudiadas y en algunos casos no existe similitud alguna entre las diferentes replicas de la misma especie, lo cual genera interrogantes como: ¿hasta qué punto las muestras estudiadas pertenecen a la misma especie o mas bien se trata de especies hermanas con divergencia reciente?, ¿se pueden estar observando eventos de hibridización

entre especies hermanas teniendo como resultado una variabilidad alélica muy grande?, ¿ésta variabilidad alélica observada es simplemente el reflejo de poblaciones aisladas espacialmente generando una diversidad alta en su composición? y ¿hasta que punto la evolución en concierto es eficiente en homogenizar estas secuencias?, la respuesta a todos los interrogantes y seguramente muchos mas por venir podría venir de investigaciones posteriores donde se profundice mas usando secuenciación y estudios filogenéticos.

En este estudio se demuestra que el ITS2 en DGGE es un marcador molecular con alta sensibilidad, del cual podemos obtener información para inferir relaciones entre poblaciones en todos los niveles, sin embargo dada la alta variabilidad de éste, no sería recomendable su uso al intentar establecer relaciones entre organismos lejanos filogenéticamente, pero su validez en estos caso y el limite hasta donde puede ser usado aún esta por investigar.

9. Bibliografía

Abrams, E., Stanton, V. (1992) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods in Enzymology*, 212. 71-104

Aguilar, C., Sánchez, J. (en prensa) Molecular morphometrics: Contribution of ITS2 sequences and predicted RNA secondary structures to Octocoral systematics. *Bulletin of Marine Science*

Baco, A., Clark, A., Shank, T. (2006) Six microsatellite loci from the deep-sea coral *Carallium lauense* (Octocorallia: Caralliidae) from the islands and seamounts of the Hawaiian archipelago. *Molecular Ecology Notes* Vol. 6 147

Baker, A. (2003) Flexibility and specificity of coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:661-689.

Bayer, F. (1961) The Shallow-Water octocorallia of the west Indian region. The Hague Martinus Nijhoff.

Berntson, E., Bayer, F., McArthur, A., France, A. (2001) Phylogenetic relationships within the octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. *Mar. Biol.* 138: 235-246.

Blaxter, M. (2004) The Promise of DNA Taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2004) **359**, 669–679

Bridge, D., Cunningham, C., DeSalle, R., Buss, L. (1995) Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Molecular and Morphological Evidence. *Mol. Biol. Evol.* 12(4): 679-689

Caims, S. (1976) Guide to the commoner shallow-water gorgonians of Florida, the gulf of Mexico, and the Caribbean region. Sea Grant Field Guide Series N 6, University of Miami, Miami, FL.

Chen, C., Miller, D., Wei, N., Chang-Feng, D., Hsiao-pe, Y. (2000) The ETS/IGS region in a lower animal, the seawhip, *Juncella fragilis* (Cnidaria:Anthozoa: Octocorallia): Compactness, Low Variation and apparent conservation of pre-rRNA processing signal with fungi. *Zoological Studies* 39(2) 138-143.

Chen, C., Dai, C., Wallace, C. (2004) Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinean corals. *Zoological studies* 43(4): 759-771

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. *Marine Biology* 114: 317-325.

Coté, C., Peculis, B. (2001) Role of the ITS2-proximal stem and evidence for indirect recognition of processing sites in pre-rRNA processing in yeast. *Nucleic Acids Research*, 29: 2106-2116

Cote, C., Greer, C., Peculis, B. (2002) Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA* 8: 786-797

Fabry, S., Kohler, A., Coleman, A. (1999) Intraspecies analysis : Comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale*. *J. Mol. Evol.* 48: 94-101

France, S., Rosel, P., Agenbroad, J., Mullineaux, L., Kocher, T. (1996) DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for a two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5(1), 15-28.

France, S., Hoover, L. (2001) Analysis of variation in mitochondrial DNA sequences (ND3, ND4L, MSH) among octocorals (=Alcyonaria)(Cnidaria: Anthozoa). *Bull. Biol. Soc. Wash.* 10:110-118

France, S., Hoover, L. (2002) DNA sequences of the mitochondrial COI gene have low levels of divergence among deep-sea octocorals (Cnidaria : Anthozoa). *Hydrobiologia.* 471: 149-155

Hajibabei, M., Janzen, D., Burns, J., Hallwachs, W., Heber, P. (2005) DNA barcodes distinguish species of tropical lepidoptera. *PNAS*, Vol. 103, No 4. 968-971

Harris, J., Crandall, K. (2000) Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes(Decapoda:Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol. Biol. Evol.* 17(2): 284-291.

Hebert, P., Penton, E., Burns, J., Janzen, D., Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgator*. *PNAS* 101, No 41. 14812-14817.

Hillis, D., Davis, S. (1988) Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* 37:63-66

Kan, Y., Dozy, A. (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human B-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 5631-5635

Lajeunesse, T. (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a "species" level marker. *J. Phycol.* 37: 866-880

LaJeunesse, T.C. (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from caribbean reefs. *Marine Biology* 141:387-400

Lipscomb, D., Platnick, N., Wheeler, Q. (2003). The Intellectual Content of taxonomy: a comment of DNA taxonomy. *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol.18 No.2 February 2003

Marquez, L., Miller, D., MacKenzie, J., Van Oppens, H. (2003) Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. *Mo. Biol. Evol.* 20(7): 1077-1086

Medina, M., Weil, E., Szmant, A. 1999. Examination of the *Montastraea annularis* species complex (Cnidaria: Scleractinea) using ITS and COI sequences. *Mar. Biotech.* 1:89-97

MacFadden, C., Danahue, R., Hadlan, B., Weston, R. (2001) A molecular phylogenetic analysis of reproductive trait evolution in the soft coral genus *Alcyonium*. *Evolution* Vol. 55 (1) 54-67

MacFadden, C., Tullis, I., Hutchinson, M., Winner, K., Sohm, J. (2002) Variation in coding (NADH Dehydrogenase subunits 2, 3 and 6) and Noncoding intergenic spacer regions of the mitochondrial genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa)

MacFadden, C., Hutchinson, B. (2004) Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria:Anthozoa: Octocorallia)

Myers, R., Lumelsky, N., Lerman, L., Maniatis, T.(1985) Detection of single base substitution in total genomic DNA. *Nature*, 313. 495-498

Myers, R., Fischer, S., Lerman, L., Maniatis, T. (1985b) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to GC-Clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acid Research* 13. 3131-3145

Myers, R., Maniatis, T., Lerman, L.(1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Method in enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 155 501-527

Odorico, D., Miller, D. (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8s ADNr among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): Patterns of variation consistent with reticulate Evolution, *Mol. Biol. Evol.* 14(5): 465-473

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* Vol 230, Issue 4732, 1350-1354.

Sánchez, J., MacFadden, C., France, S. (2003) Molecular phylogenetic analyses of shallow-water Caribbean Octocorals. *Marine Biology* 142: 975-987

Sánchez, J., Lasker, H., Taylor, D. (2003b) Phylogenetic analyses among octocorals (Cnidaria): mitochondrial and nuclear DNA sequences (lsu-rRNA, 16S and ssu-rRNA, 18S)

support two convergent clades of branching gorgonians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 31-42

Sánchez, J., Caims, S. (2004) An unusual new gorgonian coral (Anthozoa: Octocorallia) from the Aletuaninan islands, Aslaka. *Zool. Med. Leiden* 78 (15), 27: 265-274

Sánchez, J. Wirshing, H. (2004) Visual Key Identification of coral reef symbiotic octocorals from the caribbean sea and tropical western Atlantic. Universidad de los Andes, Colombia and National Coral ref. Institute, Nova Southeastern University, FL.

Sánchez, J. Wirshing, H. (2005) A field key to the identification of tropical western atlantic zooxanthellate octocorals (Octocorallia: Cnidaria), *Cariibbean Journal of Science*, 29, No 3, 508-522.

Sánchez, J. (Por someter) Morphological and Molecular Systematics of the gorgonian genus *Eunicea* Lamoroux, (Octocorallia; Plexauridae) with description of two new species and aspects of natural history.

Shearer, T., Taylor, D. (2003) Structural rRNA characters support monophyly of raptorial limbs and paraphyly of limb specialization in water fleas. *Proc. Roy. Soc. London B* 270: 887-896

Smith, G., E. Weil. (2004) Aspergillosis of Gorgonians. In: Rosenberg, E.& Y. Loya (Eds.). *Coral Health and Disease*. Springer Verlag, New York.

Vanson Liu, S., Dai, C., Fan, T., Yu, H. (2005) Genotyping the clonal structure of a gorgonian coral, *Junceella juncea* (Anthozoa :Octocorallia), using micrisatellite loci. *Coral Reefs* Vol. 24 (3) 352-358

Vanson, Liu., Yu, H., Fan, T., Dai, C. (2005) Cloning and Characterization of micrisatellite loci in a gorgonian coral, *Junceella juncea* (Anthozoa ; Octocorallia ; Ellisellidae) and its application in clonal genotyping. *Marine Biotechnology* Vol. 7 (1) 26-32

Venema, J., Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 33: 261-311

Wartell, R., Hosseini, S., Moran, C. (1990) Detecting Base pair substitution in DNA fragments by Temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1990 May 11; 18(9): 2699-2705.

Wirshing, H., Messing, C., Douady, C., Reed, J., Stanhope, M., Shivji, M. (2005) Molecular evidence for multiple lineage in the gorgonian family Plaxauridae (Anthozoa: Octocorallia). *Marine Biology* Vol 147 (2) 497-508

Woese, C., Stackebrandt, E., Macke, T., Fox, G. (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 6, 143-151.

Won, J., Rho, B., Song, J. (2001) A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. *Coral Reefs* Vol 20 No 1: 39-50

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16

10. Anexos

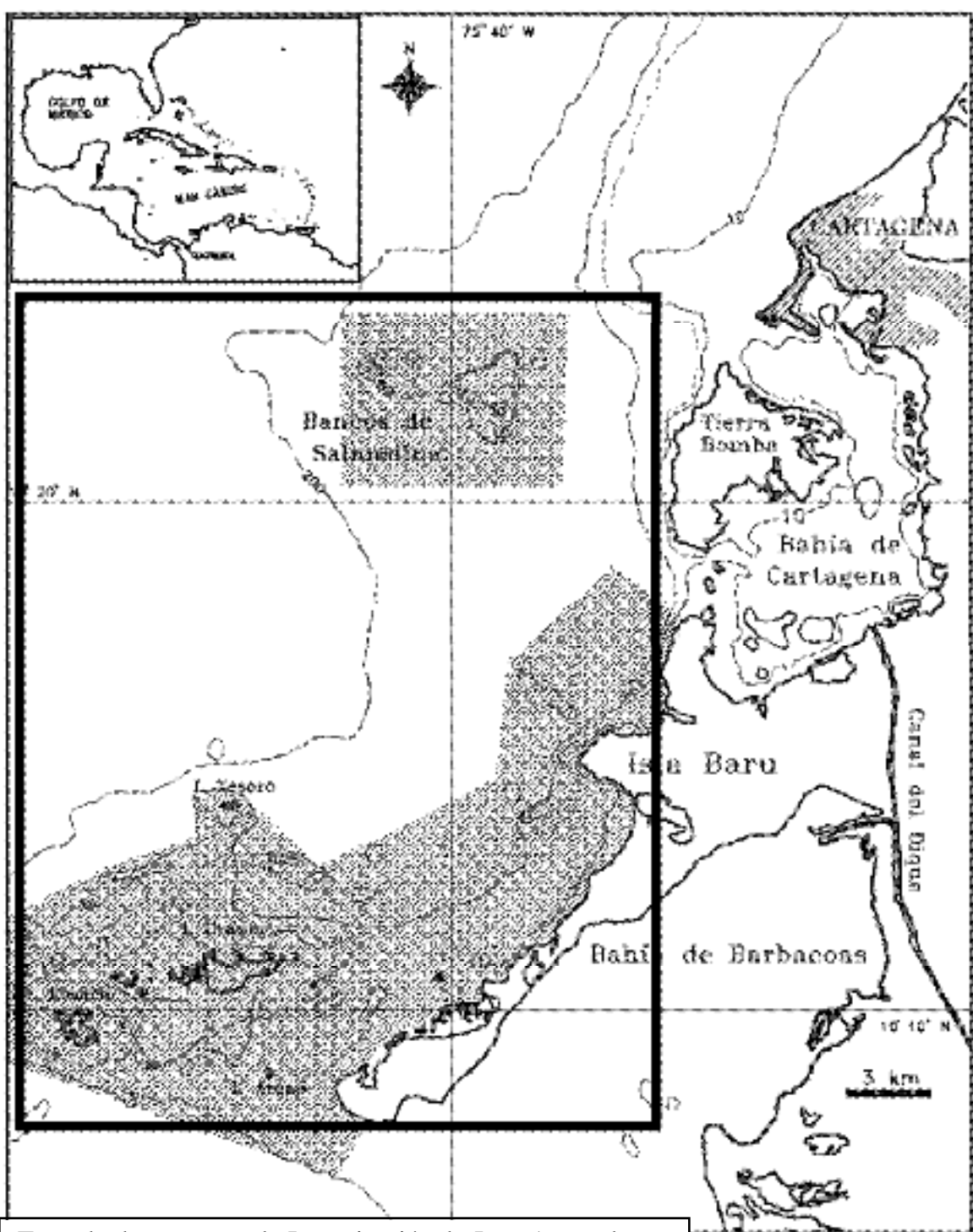
10.1 Especies de octocorales colectados en los muestreos

En este anexo se muestra el total de especies colectadas, el número de réplicas y el número de estaciones donde se encontró cada especie. En este estudio dada la necesidad de réplicas sólo se escogieron aquellas especies que por lo menos se hubieran colectado tres muestras y por lo menos en dos estaciones distintas. En rojo las especies seleccionadas.

	Especies	Familia	No de muestras	No de Estaciones
1	<i>Eunicea clavigera</i>	Plexauridae	5	3
2	<i>Eunicea flexuosa</i>	Plexauridae	16	6
3	<i>Eunicea laciniata</i>	Plexauridae	2	2
4	<i>Eunicea succinea</i>	Plexauridae	3	2
5	<i>Eunicea asperula</i>	Plexauridae	10	4
6	<i>Eunicea fusca</i>	Plexauridae	16	4
7	<i>Eunicea colombiana</i>	Plexauridae	6	3
8	<i>Eunicea knighti</i>	Plexauridae	1	1
9	<i>Eunicea mammosa</i>	Plexauridae	4	1
10	<i>Eunicea laxispica</i>	Plexauridae	1	1
11	<i>Eunicea pallida</i>	Plexauridae	2	2
12	<i>Muricea laxa</i>	Plexauridae	5	2
13	<i>Muricea pinnata</i>	Plexauridae	14	4
14	<i>Muricea atlantica</i>	Plexauridae	1	1
15	<i>Muriceopsis flavida</i>	Plexauridae	2	2
16	<i>Plexaura kukenthali</i>	Plexauridae	1	1
17	<i>Plexaura homomalla</i>	Plexauridae	5	2
18	<i>Plexaura kuna</i>	Plexauridae	2	1
19	<i>Plexaura nina</i>	Plexauridae	3	2
20	<i>Plexaurella nutans</i>	Plexauridae	2	2
21	<i>Plexaurella dichotoma</i>	Plexauridae	2	2
22	<i>Plexaurella grises</i>	Plexauridae	1	1
23	<i>Pseudoplexaura porosa</i>	Plexauridae	1	1
24	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	Plexauridae	1	1
25	<i>Erythropodium caribaeorum</i>	Anthothelidae	19	13
26	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Gorgoniidae	59	8
27	<i>Pseudopterogorgia americana</i>	Gorgoniidae	2	2
28	<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	Gorgoniidae	4	2
29	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Gorgoniidae	9	2
30	<i>Pterogorgia anceps</i>	Gorgoniidae	5	2
31	<i>Pterogorgia citrina</i>	Gorgoniidae	12	4
32	<i>Gorgona ventalina</i>	Gorgoniidae	13	6

10.2 Mapa lugar de muestreo

En este mapa se muestra las zonas donde se tomaron las muestras en gris.



Tomado de programa de Investigación de Juan Armando Sánchez, Universidad de los Andes, Noviembre 22, 2004.

10.3 Número de muestras escogidas después de la extracción y amplificadas exitosamente.

En este anexo se muestra el total de muestras escogidas después de la extracción, de acuerdo a la calidad de ésta. Se escogieron de 3 a 6 muestras por especie. Se muestra la cantidad de muestras que efectivamente amplificaron y el porcentaje de éxito de la amplificación.

	Especie	No Muestras Extraídas	No Muestras Amplificadas	%
				Éxito
1	Eunicea clavigera	4	4	100,0
2	Eunicea flexuosa	4	4	100,0
3	Eunicea asperula	5	2	40,0
4	Eunicea fusca	5	2	40,0
5	Eunicea colombiana	5	3	60,0
6	Muricea laxa	4	3	75,0
7	Muricea pinnata	4	4	100,0
8	Erythropodium caribaeorum	4	4	100,0
9	Pseudopterogorgia bipinnata	6	6	100,0
10	Pseudopterogorgia rigida	3	3	100,0
11	Pterogorgia guadalupensis	4	4	100,0
12	Pterogorgia citrina	4	4	100,0
13	Gorgona ventalina	4	4	100,0
14	Plexaura homomalla	4	0	0,0
	Total	60	47	78,3

10.4 Base de datos muestras positivas en la amplificación

En este anexo se muestra de forma detallada las muestras que amplificaron exitosamente.

Numero muestra	Especie	Estación	Lugar	Profundidad (pies)	Calidad ADN
A951	<i>Erythropodium caribaeorum</i>	Octubre rojo		70	D2
B392	<i>Erythropodium caribaeorum</i>	Tortugas		40	A2
C26	<i>Erythropodium caribaeorum</i>		Tesoro Sur	40	A3
B589	<i>Erythropodium caribaeorum</i>		Isla Fiesta	30	A3
A679	<i>Gorgonia ventalina</i>	Montañita	Meseta	45	D
B377	<i>Gorgonia ventalina</i>		Tortugas	40	A1
B458	<i>Gorgonia ventalina</i>	Intremedio		50	D2
C163	<i>Gorgonia ventalina</i>	Las Palmas		60	A2
A501	<i>Pterogorgia citrina</i>	Burbujas	Borde cantil	40	A1
A528	<i>Pterogorgia citrina</i>	Burbujas	Cantil	65	B2
A551	<i>Pterogorgia citrina</i>	Salmedina	Nafragio-ferrocemento	30	B3
A546	<i>Pterogorgia citrina</i>	Burbujas	Cantil	65	A3
A486	<i>Muricea pinnata</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A532	<i>Muricea pinnata</i>	Burbujas	Cantil	65	D3
A625	<i>Muricea pinnata</i>	Imelda	Borde	65	A
A725	<i>Muricea pinnata</i>	Montañita	Meseta	45	A
A129	<i>Eunicea clavigera</i>	Tierra Bomba	Salmedina sur-somero	35	B1
A469	<i>Eunicea clavigera</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A1
A484	<i>Eunicea clavigera</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A717	<i>Eunicea clavigera</i>	Montañita	Meseta	45	A
A152	<i>Eunicea flexuosa</i>	Tierra Bomba	Salmedina sur-profundo	60	B1
A545	<i>Eunicea flexuosa</i>	Burbujas	Cantil	65	A3
A716	<i>Eunicea flexuosa</i>	Montañita	Meseta	45	A
A223	<i>Eunicea flexuosa</i>	Isla Tesoro	Borde Norte - Somero	40	A1
A697	<i>Eunicea asperuk</i>	Montañita	Meseta	45	A
A475	<i>Eunicea asperuk</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A472	<i>Eunicea colombiana</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A692	<i>Eunicea colombiana</i>	Montañita	Meseta	45	A
A687	<i>Eunicea colombiana</i>	Montañita	Meseta	45	A
A480	<i>Eunicea fusca</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A689	<i>Eunicea fusca</i>	Montañita	Meseta	45	A
A471	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A624	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Imelda	Borde	65	A/B
A698	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Montañita	Meseta	45	A
A727	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Montañita	Meseta	45	A
A479	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A712	<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	Montañita	Meseta	45	A
A477	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A499	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Burbujas	Borde cantil	40	A3
A516	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Burbujas	Borde cantil	40	D2
A523	<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	Burbujas	Borde cantil	40	D2
A478	<i>Muricea laxa</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A481	<i>Muricea laxa</i>	Salmedina	Nafragio ferrocemento-profundo	60	A
A699	<i>Muricea laxa</i>	Montañita	Meseta	45	A
A538	<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	Burbujas	Cantil	65	A1
A511	<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	Burbujas	Borde cantil	40	B2
A700	<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	Montañita	Meseta	45	A

Apéndice

Manuscrito para ser sometido a una revista indexada internacional.

The Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA) as Species Marker for Octocorals: DGGE analyses.

DANIEL GUILLERMO DORADO & JUAN ARMANDO SÁNCHEZ*

Laboratorio de Biología Molecular Marina - BIOMMAR

Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes

P.O.Box 4976, Bogotá, COLOMBIA

**To whom correspondence should be addressed.*

Email address: juansanc@uniandes.edu.co

Abstract

Octocorals are among the most diverse groups of organisms in the Ocean. However, their research has received little attention compared to scleractinian corals, due in part to their complicated identification and taxonomy. The use of rapid molecular techniques in this group would permit identifying species and populations in a simpler and practical way. Here, we examined preliminary the ITS2 as molecular marker for 13 species from 8 octocoral genera. We used Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to assess the number of copies and variability to ITS2 finding interspecific, intraspecific, and intragenomic variability (70 assays). ITS2 length ranged from 190 pb in *Pterogorgia citrina* to 260 pb in *Pseudopterogorgia bipinnata*, which is an early indication of the high ITS2 variation in octocorals. There were two DGGE banding patterns: a simple banding pattern consisting of a single band (e.g., *Gorgonia ventalina*, *P. citrina*, *Erythropodium caribaeorum*, *Pseudopterogorgia rigida*, *Eunicea colombiana*) and a complex banding pattern composed of multiple bands and smears (*Eunicea clavigera*, *E. flexuosa*, *Muricea pinnata*, *P. bipinnata*, *Muricea laxa*, *Calypthrophora* sp., *Carijoa riseii*, *Sclerobelemnon theseus*). Simple banding pattern corresponded to a single ITS2 copy and little intraspecific variation comprising a readily molecular marker for species level. Complex banding pattern corresponded to intragenomic variation, probably due to multiple ITS2 copies, and/or pseudogenes. Replicable complex patterns comprised also a fingerprint for species level, whereas nonreplicable ones varying within species need further study at the population level in search for the presence of allele variation, incomplete lineage sorting or cryptic species considered as one as it seems to be the case for *Eunicea* spp. and *Muricea* spp.

These and recent result comparing ITS2 from several octocorals demonstrated that each species contain a different sequence, which can be used as molecular marker or barcode for octocoral species. It is advised that techniques such as DGGE should be use to asses the reliability of ITS2 as reliable species marker.

Key words: Octocorals, Octocorallia, ITS2, DNA barcodes, DGGE, Molecular Markers.

Introduction

Octocorals are among the most important shallow and deep-water colonial invertebrates, comprising a large and diverse group, characterized by the presence of eight pinnate tentacles around the polyp mouth and a flexible colonial mass composed of fused sclerites united by a fleshy coenenchyme and in some cases a scleroprotein skeleton is present (Cains 1976). Unlike hard corals (Scleractinean) the identification of octocorals is extremely difficult and ambiguous, and requires in most cases the examination of sclerites through the microscope, imposing a difficulty in their study, resulting in a small number of studies in this group compared to hard corals (Sanchez & Wirshing 2005). The use of “barcode” like molecular techniques in octocorals would permit to distinguish species and populations in a simpler and practical way.

Many molecular markers have been used in studies of practically every group of organisms, octocoral genomic regions including of such as mitochondrial rDNA 16s and nuclear rDNA 18s (Bridge et al. 1995; France et al. 1996; Won et al. 2001; Berston et al. 2001; Sanchez et al. 2003), mitochondrial NADH dehydrogenase subunits (ND2, ND3 and ND6), mitochondrial COI and COII spacers, mitochondrial *mutS*-like MSH1 gene (France & Hoover 2001; McFadden et al. 2002; Sánchez et al. 2003; Wirshing et al. 2005; McFadden et al. in press) and microsatellites (Gutierrez-Rodriguez & Lasker, 2004; Liu et al. 2005a; Liu et al. 2005b; Baco et al. 2006). However, exclusive microsatellites most nuclear and mitochondrial molecular markers have shown a great deal of conservation among closely-related species. Recently, sequences called Internal Transcribed Spacers located in the rDNA have been frequently used as molecular markers because their size, sequence and complexity vary considerably among species (Odorico & Miller 1997). In octocorals, these molecular markers have been used to resolve relations between closely related species

within genera (MacFadden et al. 2001, MacFadden & Hutchinson 2004; Sanchez, submitted; Aguilar & Sánchez, submitted), consequently demonstrating the usefulness of ITS2 as a species marker in octocorals.

The rDNA (ribosomal DNA) is arranged in tandem repeats separated by Intergenic Spacers (ETS-IGS), frequently achieving several hundreds of repetitions per chromosome. Each repetition is composed by three ribosomal subunits (18s, 5.8s and 28s) separated by two internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) (Cote & Peculis 2001). All these sequences evolve via concerted evolution resulting in the homogenization throughout the genome (Harris & Crandall 2000, Hillis & Davies 1988). However, variations within individuals have been reported primarily due to slower concerted evolution (Cote & Peculis 2001, Harris & Crandall 2000) or by the presence of pseudogenes (Marquez et al. 2003). Although, ITS2 reliability have been examined using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) (Lajeunesse 2001) and prediction and comparison of their RNA predicted secondary structures (Aguilar & Sanchez, submitted). In this paper, we examined the reliability of ITS2, using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), as a tool to assess intragenomic variability and to quickly identify octocoral species as well.

Methods

Sample collection, identification and DNA extraction.

Octocoral samples were collected during May 2005 - August 2005 from six different locations between Cartagena and Rosario Islands using SCUBA diving. A total of 69 samples of 14 different species were collected and preserved in absolute ethanol (Table 1). Total DNA was extracted using a CTAB, proteinase K, Phenol – Chloroform-Isoamyl alcohol extraction method (Coffroth et al. 1992), and the DNA was resuspended and conserved in TE buffer at -70°C . DNA quality was observed in low melting point agarose (0.8%) electrophoresis at 80V for 30 min. All samples collected were initially identified according to Sánchez & Wirshing (2005) and confirmed in the laboratory through microscope observation and comparisons of sclerites using the keys by Bayer (1961). Ten additional DNA samples, from a

previous study of different pacific octocorals species were also included (Sánchez & Cains 2004; Aguilar & Sánchez submitted). The extraction method was standardized, showing an efficiency of 95%. From 69 samples processed, 60 showed DNA of adequate quality (data not shown). Most extractions, though degraded low molecular weight DNA, were useful in this study because of short length of the ITS2 (250bp aprox.).

PCR

A total of 70 DNA extractions samples were chosen, including 3 or 4 samples per species that showed the best DNA quality. Primers 5.8s 5` AGCATGTCTGTCTGAGTGTGG 3` and 28s 5`GGGTAATCTTGCCTGATCTGAG3` designed by Sánchez (submitted) were used for the ITS2 amplification, conditions for PCR were as follows: an initial denaturing step: 2 min at 94°C, followed by 35 cycles: 30 sec. at 94°C, 30 sec. at 56.2°C and 1 min at 72°C, final extension step: 2 min. at 72°C. Using 1 unit of TucanTaq *Taq* polymerase (Corpogen), 3.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTPs (Biorad Mix), 0.15 uM primers (each) and 4µL of DNA (dilution 1/50) in 20µL as final volume. The amplification was standardized with an efficiency of 80% on all processed samples (Table 1)

DGGE

PCR reactions were separated in a gel containing 8% polyacrilamide, 1X TAE Buffer and linear denaturing gradient from 40% to 80% of Urea and Formamide. Before electrophoresis the gels were pre-run at 60°C and 150V for 20 min, followed by the electrophoresis at 60°C and 150V for 9 h. The gels were stained with Ethidium Bromide during 15 min and analyzed using a BIORAD chemidoc system. All the reactions were conducted without CG-clamp. The lack of DGGE standards for comparative purposes was solved using two species that showed the highest and lowest simple banding patterns (*Gorgonia ventalina* and/or *Pterogorgia citrina*) as standards for gel analyses.

Results

ITS2 amplification products ranged from 190 bp in *Pterogorgia citrina* to 260 bp in *Pseudopterogorgia bipinnata*. Evident interspecific variation was observed among the studied species with virtually no similar DGGE banding patterns even between closely related species. There were two distinct banding patterns observed (Figs. 1-3): (1) simple banding pattern (e.g., *Gorgonia ventalina*, *P. citrina*, *Erythropodium caribaeorum*, *Pseudopterogorgia rigida*, *Eunicea colombiana*), and (2) multiple banding pattern (more than one bands and smears) (e.g., *E. clavigera*, *E. flexuosa*, *Muricea pinnata*, *P. bipinnata*, *M. laxa*, *Calypthrophora* sp., *Carijoa riseii*, *Sclerobelemnon theseus*) (Fig. 2). In the former, a single ITS2 copy was observed for each sample and little or no intraspecific variation was detected, which simplifies species correspondance. A portion of the multiple banding patterns could correspond to rapidly denatured upper bands in the DGGE at some species like *P. bipinnata* (Fig. 1), which could correspond to the phenomena known as heteroduplex DNA (Myers et al. 1987), a PCR artifact when multiple copies of a gene occur. Some species exhibiting multiple banding patterns (e.g., *E. clavigera*, *E. flexuosa*, *M. pinnata*, *P. bipinnata*, *M. laxa*, *Caliphthrophora* sp., *Carijoa riseii*, and *Sclerobelemnon theseus*)

also presented various degrees of intraspecific variation, some with little resemblance against samples of the same species (e.g., *Muricea pinnata*: Fig. 1; *Eunicea* spp.: Fig. 2).

Discussion

This study presented additional evidence on the usefulness of ITS2 as a species level molecular marker for octocorals. Thanks to the aid of DGGE ITS2 polymorphisms at different levels were assessed. The presence of simple DGGE banding patterns in octocorals, indicating a single ITS2 copy in the genome, is expected for mature species as a result of concerted evolution homogenizing all rDNA copies (e.g., Harris & Crandall 2000, Hillis & Davies 1988). Intraspecific variation with several simple banding patterns was observed in a few cases such as *E. caribaeorum*, where one out of four samples studied showed a different band. Based on field observations, *E. caribaeorum* differences could belong to cryptic or sibling species not yet studied according to polyp and tentacle length. Multiple banding patterns, on the other hand, could be explained by many hypotheses. The presence of multiple bands in a single sample could indicate the presence of different ITS2 alleles (Coté & Peculis 2001), which is against concerted evolution. This could be related to a recent speciation event and incomplete lineage sorting. In addition, it is possible the presence of rDNA pseudogenes, as reported previously for *Acropora* spp. (Marquez et al. 2003), resulting in intragenomic variability, though it is the less likely situation in corals (e.g., Chen et al., 2004). The usefulness of ITS2 as a phylogenetic tool is limited to a closely-related species because its high variability and presence of INDELS, which would result in misleading results when comparing distant species (Aguilar & Sanchez, submitted). Nonetheless, all studies using ITS2 in octocorals so far have shown that every species has a different sequence or even predicted RNA secondary structure (e.g., MacFadden & Hutchinson 2004; Aguilar & Sanchez, submitted; Sánchez, submitted). In account of the fact that mitochondrial DNA is nearly invariable among closely related octocoral species (e.g., *Eunicea* spp.: Sánchez et al., 2003), ITS2 provides a “barcode” marker for the species level in octocorals.

This pilot paper raised many questions about the evolution of the ITS2 sequence, opening the possibilities to investigate in a deeper way the variability here observed and the process of speciation in octocorals. To use ITS2 as a “barcoding” marker to octocorals a major research undertake is necessary to find the answers for the observed variability of ITS2 in octocorals as it has been reported previously for other organisms (Harris & Crandall 2000). First, it will be necessary to sequence all the bands observed in DGGE, including a significant number of species and replicates. Second, it is unknown if the variability observed could be the result of hybridization events between closely related species of octocorals as is known to occur (MacFadden & Hutchinson 2004). Finally, the possibility for the existence of multiple cryptic species considered a single morphological species (e.g. Heber et al. 2004) is very high in octocorals (Sánchez, submitted) and ITS2 could be also a great tool to discover new cryptic and sibling octocoral species.

Acknowledgements

This study was partially funded by COLCIENCIAS (No. 120409-16825) and the *Facultad de Ciencias*, Department of Biological Sciences, Universidad de los Andes (funding to J.A. Sánchez). We are grateful with BIOMMAR divers and colleagues for their assistant during field surveys and laboratory assays. Smithsonian Institution (S. Cairns) provided valuable material for molecular analyses. UAESPNN (National Natural Rosario and San Bernardo islands Park, Colombia) permitted collections in coral reefs.

References

- Aguilar, C., Sánchez, J.A. (Submitted) Molecular Morphometrics: Contribution of ITS2 sequences and predicted RNA secondary structures to octocoral systematics.
- Baco, A.R., Clark, A.M., Shank, T.M. (2006) Six microsatellite loci from the deep-sea coral *Carallium lauuense* (Octocorallia: Caralliidae) from the islands and seamounts of the Hawaiian archipelago. *Molecular Ecology Notes*, 6, 147- 149

- Bayer, F.M. (1961) The shallow water Octocorallia of the West Indian region. *Studies of the Fauna of Curaçao* 12, 1-373.
- Berntson, E.A., Bayer, F.M., McArthur, A.G., France, S.C. (2001) Phylogenetic relationships within the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on nuclear 18S rRNA sequences. *Marine Biology* 138, 235-246.
- Bridge, D., Cunningham, C. W., DeSalle, R., Buss, L.W. (1995) Class-Level Relationships in the Phylum Cnidaria: Molecular and Morphological Evidence. *Molecular Biology & Evolution* 12, 679-689
- Caims, S. (1976) Guide to the common shallow-water gorgonians of Florida, the gulf of Mexico, and the Caribbean region. *Sea Grant Field Guide Series*, 6, University of Miami, Miami, FL.
- Chen, C. A., C. C. Chang, N. V. Wei, C. H. Chen, Y. T. Lein, H. E. Lin, C. F. Dai, C. C. Wallace (2004) Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Scleractinian Corals. *Zoological Studies* 43, 759-771.
- 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. *Marine Biology* 114, 317-325.
- Coté, C.A., Peculis, B.A. (2001) Role of the ITS2-proximal stem and evidence for indirect recognition of processing sites in pre-rRNA processing in yeast. *Nucleic Acids Research* 29, 2106-2116
- France, S.C., Rosel, P.E., Agenbrood, J.E., Mullineaux, L.S., Kocher, T.D. (1996) DNA sequence variation of mitochondrial large-subunit rRNA provides support for a two-subclass organization of the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 5, 15-28.
- France, S.C., Hoover, L.L. (2001) Analysis of variation in mitochondrial DNA sequences (ND3, ND4L, MSH) among octocorals (=Alcyonaria)(Cnidaria: Anthozoa). *Bulletin of the Biological Society of Washington* 10, 110-118,
- Gutierrez-Rodriguez C, Lasker HR. (2004) Microsatellite variation reveals high levels of genetic variability and population structure in the gorgonian coral *Pseudopterogorgia elisabethae* across the Bahamas. *Molecular Ecology* 13, 2211-21.

- Harris, D.J., Crandall, K.A. (2000) Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda:Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology & Evolution* 17, 284-291.
- Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 14812-14817.
- Hillis, D.M., Davis, S.K. (1988) Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Systematic Zoology* 37:63-66
- Lajeunesse, T. C. (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *Journal of Phycology* 37: 866-880.
- Liu, S. Y. V., Dai, C.F., Fan, T.Y., Yu, H.T. (2005a) Genotyping the clonal structure of a gorgonian coral, *Junceella juncea* (Anthozoa :Octocorallia), using microsatellite loci. *Coral Reefs* 24, 352-358.
- Liu, S. Y. V., Yu, H.T., Fan, T.Y., Dai, C.F. (2005b) Cloning and Characterization of microsatellite loci in a gorgonian coral, *Junceella juncea* (Anthozoa ; Octocorallia ; Ellisellidae) and its application in clonal genotyping. *Marine Biotechnology* 7, 26-32.
- MacFadden, C.S., Danahue, R., Hadlan, B.K., Weston, R. (2001) A molecular phylogenetic analysis of reproductive trait evolution in the soft coral genus *Alcyonium*. *Evolution* 55, 54-67.
- McFadden, C.S., Tullis, I.D., Hutchinson, M. B., Winner, K., Sohm, J. A. (2004) Variation in coding (NADH dehydrogenase subunits 2, 3 and 6) and non-coding intergenic spacer regions of the mitochondrial genome in Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Marine Biotechnology* 6, 516-526.
- McFadden, C.S., Hutchinson, M.B. (2004) Molecular evidence for the hybrid origin of species in the soft coral genus *Alcyonium* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). *Molecular Ecology* 13, 1495-1505.

- Mcfadden C. S., France, S. C., Sánchez, J.A. & Alderslade, P. (in press) A Molecular Phylogenetic Analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) Based on Mitochondrial Protein-coding Sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*
- Marquez, L.M., Miller, D.J., MacKenzie, J.B., Van Oppens, M.J. (2003) Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora*. *Molecular Biology & Evolution* 20, 1077-1086.
- Myers, R.M., Maniatis, T., Lerman, L.S. (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155, 501-527.
- Odorico, D.M., Miller, D.J. (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8s ADNr among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): Patterns of variation Consistent with reticulate Evolution, *Molecular Biology & Evolution* 14(5): 465-473.
- Sanchez, J.A., McFadden, C.S., France, S.C. & Lasker, H.R. (2003) Molecular phylogenetic analyses of shallow-water Caribbean Octocorals. *Marine Biology* 142, 975-987.
- Sanchez, J.A., Cairns, S.D. (2004) An unusual new gorgonian coral (Anthozoa: Octocorallia) from the Aleutian Islands, Alaska. *Zoologische Mededelingen-Leiden* 78, 265-274.
- Sanchez, J.A., Wirshing, H.H. (2005) A field key to the identification of tropical western Atlantic zooxanthellate octocorals (Octocorallia: Cnidaria). *Caribbean Journal of Science*, 29, 508-522.
- Sanchez, J.A. (submitted) Morphological and Molecular Systematics of the gorgonian genus *Eunicea* Lamoroux, (Octocorallia; Plexauridae) with description of two new species and aspects of natural history. *Zootaxa*
- Wirshing, H.H., Messing, C.G., Douady, C.J., Reed, J., Stanhope, M.J., Shivji, M.S. (2005) Molecular evidence for multiple lineage in the gorgonian family Plexauridae (Anthozoa: Octocorallia). *Marine Biology* 147, 497-508.
- Won, J., Rho, B., Song, J. (2001) A phylogenetic study of the Anthozoa (phylum Cnidaria) based on morphological and molecular characters. *Coral Reefs* 20, 39-50

Table 1. Species, number of replicates and PCR amplification success per species.

Species	Samples Amplified / Total
<i>Eunicea clavigera</i>	4/4
<i>Eunicea flexuosa</i>	4/4
<i>Eunicea asperula</i>	2/5
<i>Eunicea fusca</i>	2/5
<i>Eunicea colombiana</i>	3/5
<i>Muricea laxa</i>	3/4
<i>Muricea pinnata</i>	4/4
<i>Erythropodium caribaeorum</i>	4/4
<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	6/6
<i>Pseudopterogorgia rigida</i>	3/3
<i>Pterogorgia guadalupensis</i>	4/4
<i>Pterogorgia citrina</i>	4/4
<i>Gorgona ventalina</i>	4/4
<i>Plexaura homomalla</i>	0/4
Total	47/60

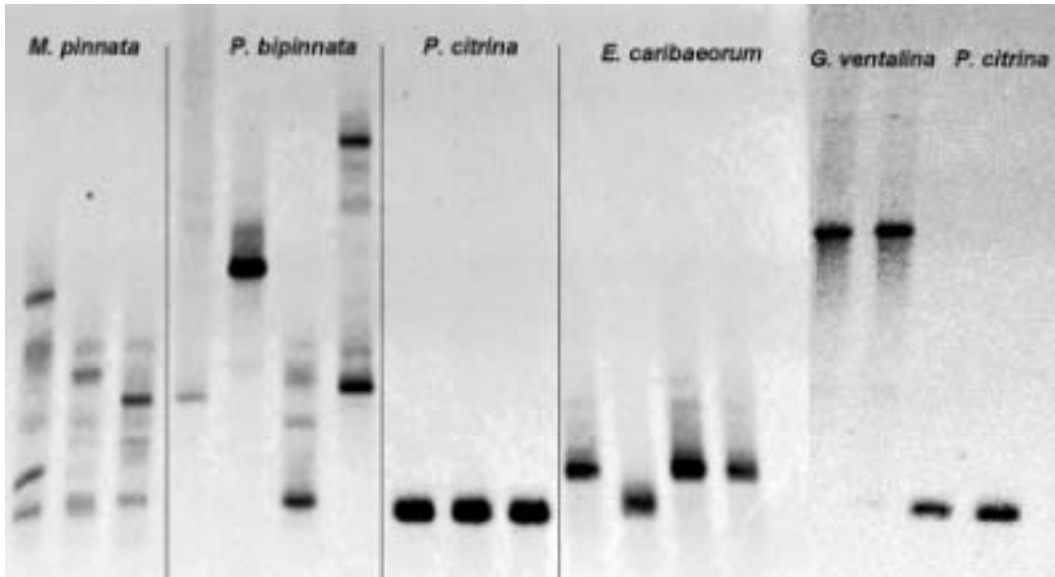


Figure 1. Examples of ITS2 DGGE banding patterns for octocorals. Multiple banding patterns: *Muricea pinnata* and *P. bipinnata*. Simple banding patterns: *Pterogorgia citrina*, *Erythropodium caribaeorum*, and *Gorgonia ventalina*.

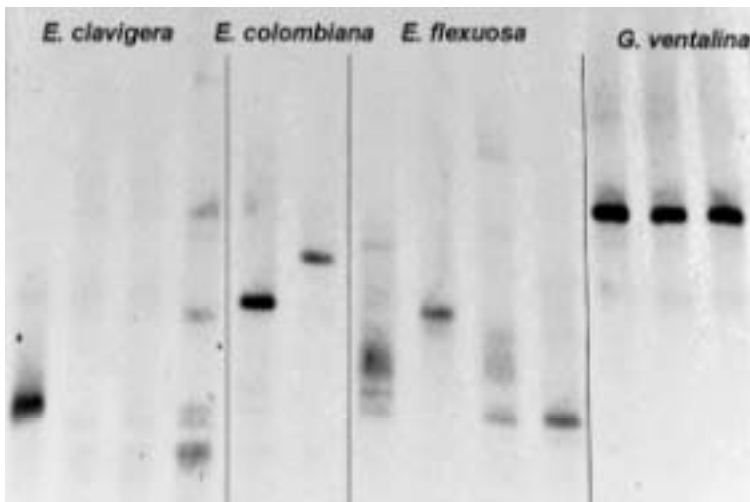


Figure 2. ITS2 DGGE multiple banding patterns of *Eunicea* spp. in comparison with *Gorgonia ventalina* (single banding pattern).

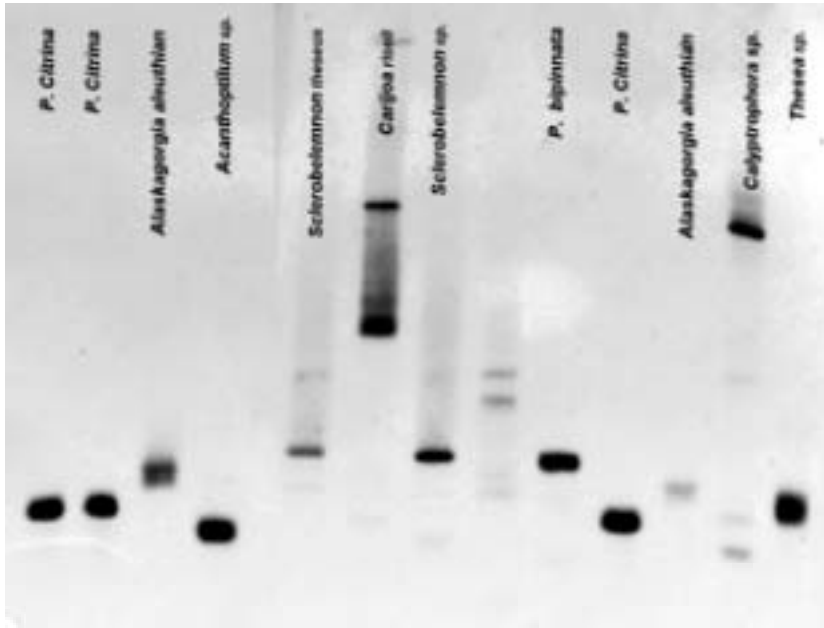


Figure 3. Miscellaneous ITS2 DGGE banding patterns including sea pens (*Sclerobelemnon theseus* and *Acanthoptilum* sp.) and Pacific species (*Alaskagorgia aleuthiana*, *Calyptrophora* sp., *Thesea* sp.)