



Universidad de Carabobo  
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT)  
Departamento de Biología



**VALIDACIÓN DEL CARÁCTER MONOCLONAL DE UN  
AGRUPAMIENTO DE *Stichodactyla helianthus* EN ISLA  
LARGA, PARQUE NACIONAL SAN ESTEBAN - EDO.  
CARABOBO**

**Autor**

Daniela López

**Tutores**

Eucandis Fuentes

Mario Palacios

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Carabobo como requisito para optar al título de Licenciado en Biología

Valencia, Octubre de 2016.



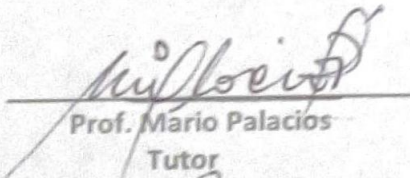
UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

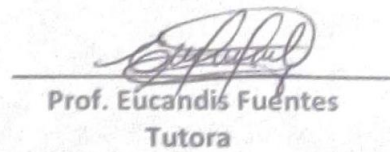


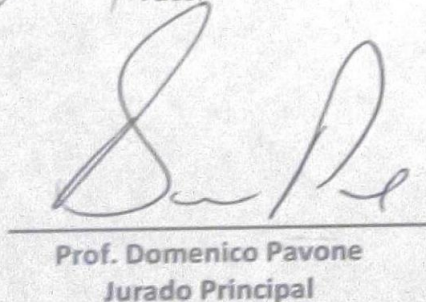
ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) Br. Daniela López, Cédula de Identidad N° 21.199.876, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: "Validación del carácter monoclonal de un agrupamiento de *Stichodactyla helianthus* en isla larga, Parque Nacional San Esteban – Edo. Carabobo", en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

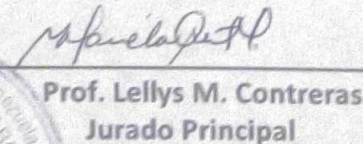
En Valencia, a los 20 días del mes de Octubre del año 2016.

  
Prof. Mario Palacios  
Tutor

  
Prof. Eucandis Fuentes  
Tutora

  
Prof. Domenico Pavone  
Jurado Principal



  
Prof. Lellys M. Contreras  
Jurado Principal

## DEDICATORIA

*Al Universo, mis padres y la Ciencia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Ilustre Universidad de Carabobo que ha sido mi alma mater durante todos los años de mis carrera.

A mis tutores por toda la paciencia, apoyo y conocimiento brindado.

A mis padres por todo el apoyo brindado durante esta larga trayectoria.

A mis amigos los cuales se han convertido en mi familia.

Al Universo por otorgarme el tiempo y espacio propicios.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	4
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Justificación .....	6
1.3. Objetivos.....	9
1.3.1. Objetivo General.....	9
1.3.2. Objetivos Específicos .....	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	10
2.1. Bases teóricas .....	10
2.1.1. Características generales de la especie .....	10
2.1.1.1. Morfología .....	10
2.1.1.2. Bioquímica.....	14
2.1.1.3. Importancia farmacológica, biotecnológica y ecológica .....	17
2.1.2. Genética de Poblaciones y Ecología Molecular .....	19
2.1.3. Polimorfismos .....	22
2.1.4. Marcadores moleculares.....	25
2.1.4.1. Tipos de marcadores moleculares.....	27
2.2. Antecedentes .....	38
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
3.1. Área de estudio.....	48
3.2. Colecta.....	49
3.3. Extracción del ADN .....	51
3.4. Selección de cebadores .....	54
3.5. Amplificación de los fragmentos a partir de IST1-5.8S-IST2 .....	55
3.6. Separación de los fragmentos amplificados .....	56
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
4.1. Resultados.....	57

4.1.1. Extracción del ADN.....	57
4.1.2. Amplificación por PCR .....	63
4.2. Discusión .....	66
4.2.1. Comparación de los procesos de extracción de ADN .....	66
4.2.2. Amplificación por PCR.....	69
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	76
5.1. Conclusiones .....	78
5.2. Recomendaciones .....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	80
APÉNDICE .....	92

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla I.** Componentes para la reacción de PCR.....55

**Tabla II.** Condiciones de la PCR.....55

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Presencia de bañistas y embarcaciones en la zona del arrecife donde habita *S. helianthus*. ..... 4
- Figura 2.** Morfología general de un pólipo. Modificado de: <http://biodidac.bio.uottawa.ca/index.htm>. ..... 12
- Figura 3.** Reproducción asexual (fisión longitudinal) de un ejemplar de *S. helianthus*. Modificado de: Lance (2008). ..... 13
- Figura 4.** Ciclo de vida de pólipo con reproducción sexual: la fecundación es externa, el embrión sufre invaginación que da lugar a la larva plánula ciliada, finalmente esta se fija por su polo aboral y se desarrolla. Modificado de: Brusca y Brusca, 2008. .... 14
- Figura 5.** Características de algunos marcadores moleculares. Modificado de: FAO (2010). .... 37
- Figura 6.** A: Ubicación geográfica del Parque Nacional San Esteban. Modificado de: ParksWatch. B: Vista satelital de la zona marino-costera del Parque Nacional San Esteban. Modificado de: Google Earth (2014). ..... 48
- Figura 7.** Ubicación geográfica del arrecife franjeante en el que fueron colectados los individuos de la especie de anémona *S. helianthus* (10°29'21.8" Norte y 67°56'58,4" Oeste). Fuente: Google Earth (Versión 2014). Consultado el: 2/9/2014. .... 50
- Figura 8.** Vista satelital del parche y esquema gráfico del método de muestreo. Transectas (denotadas como T) equidistantes a 10 m. con tres puntos de muestreo (denotados como P) cada una, desde el punto más cercano a la orilla hasta el lejano. Modificado de: Google Earth (2014). ..... 51



<b>Figura 9.</b> Región ITS 1 e ITS 2 y Primers sintetizados. ....	55
<b>Figura 10.</b> Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL1. PM: Peso Molecular. M1: Muestra del ejemplar 1. M2: Muestra del ejemplar 2. M3: Muestra del ejemplar 3. M4: Muestra del ejemplar 4. ....	58
<b>Figura 11.</b> Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL2. PM: Peso Molecular; M1: tratamiento 1; M2: tratamiento 2; BM1: blanco para el tratamiento 1; BM2: blanco para el tratamiento 2.....	59
<b>Figura 12.</b> Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL2. PM: Peso Molecular; M1-16: Muestras de 16 individuos. ....	60
<b>Figura 13.</b> Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con el kit de extracción de ADN de FAVORGEN.....	61
<b>Figura 14.</b> Resultado de la extracción de ADN a partir de tejido de disco podal de <i>S. helianthus</i> . Gel de agarosa al 0,9% p/v que muestra bandas correspondientes al ADN fragmentado de peso molecular mayor a 10.000 pb. De los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; 0, 10, 20, 30 y 40m; 10 y 40m'; 0, 10, 20, 30 y 40d; 0 y 10d'; RO y RE. ....	62
<b>Figura 15.</b> Curva de calibración con los estándares de peso molecular empleado para la determinación del peso de las bandas en las corridas electroforéticas. ....	63
<b>Figura 16.</b> Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; y 0m, con el	

marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco.  
..... 64

**Figura 17.** Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 10, 20, 30 y 40m; 0 y 10d, con el marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco.  
..... 65

**Figura 18.** Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 20, 30 y 40d; 20, 30 y 40m; RO y RE, con el marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco..... 66

**Figura 19.** Representación gráfica del patrón de expansión-contracción del parche de *S. helianthus* (Zona sombreada) durante el año 2007-2008 en Isla Larga. PN San Esteban. Tomado de: Palacios (2009). ..... 74

**Figura 20.** Resultado de la amplificación por PCR de los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; y 0m en gel de agarosa al 2%. PM 1500pb. .... 92

**Figura 21.** Resultado de la amplificación por PCR de los individuos 10, 20, 30 y 40m; 0, 10, 20, 30 y-40d; 20, 30 y 40 m'; RE y RO. PM 1500 pb. .... 93

**Figura 22.** Comparación de algunos resultados de amplificación por PCR con respecto al blanco y al Primer 18S. .... 94



Universidad de Carabobo  
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología.  
Departamento de Biología



## **VALIDACIÓN DEL CARÁCTER MONOCLONAL DE UN AGRUPAMIENTO DE *Stichodactyla helianthus* EN ISLA LARGA, PARQUE NACIONAL SAN ESTEBAN - EDO. CARABOBO**

**Autor:** Daniela López

**Tutores:** Eucandis Fuentes y Mario Palacios

### **RESUMEN**

Los marcadores moleculares se han usado ampliamente en estudios para dilucidar problemas filogenéticos y evolutivos. El presente trabajo tiene como propósito validar el carácter monoclonal de un agrupamiento de *Stichodactyla helianthus* en Isla Larga, Parque Nacional San Esteban - Edo. Carabobo. Para ello se estandarizó un protocolo de extracción de ADN para el tejido blando que presenta *S. helianthus*, el cual se logró de forma óptima con el uso de proteinasa K a temperatura ambiente y durante 72 h de incubación. Luego se usó la región ITS del ADNnr como marcador molecular, y en base a estudios anteriores se modificaron primers específicos de la región 18S y 28S de ITS1 e ITS2 para la especie. Los genes se amplificaron mediante la técnica de PCR y se determinó que casi todos los individuos dentro del agrupamiento (88,9%) mostraron el mismo patrón de bandas, lo que indica que son predominantemente monoclonales. Los pocos individuos dentro del agrupamiento (11,1%) y uno fuera de él, que mostraron una banda adicional en el patrón, se encontraban hacia el extremo oeste del arrecife. Este resultado sugiere que las condiciones medioambientales son diferentes dentro del agrupamiento, y podrían tener un nivel variable de repercusión sobre la estructura genética de *S. helianthus*, y por ende, de la población.

**Palabras clave:** marcador, reproducción, ITS, clonal, asexual.

## INTRODUCCIÓN

Las anémonas de la especie *Stichodactyla helianthus* (Actiniaria: Stichodactylidae), son invertebrados marinos, antozoos hexagonales caracterizados por un cuerpo cilíndrico de 1,5 a 10 cm de longitud por 1 a 5 cm de diámetro aproximadamente. Poseen un disco oral plano en el polo oral, cubierto por cientos de tentáculos cortos y gruesos con la punta redondeada (digitiformes). Su distribución espacial responde a diversos factores físicos y biológicos, entre los que destacan la profundidad, el régimen hidrodinámico, tipo de sustrato, competencia y depredación (Barrios *et al.*, 2002; Henríquez y Palacios, 2010).

Habitan principalmente en aguas tropicales, al sur y este del Caribe, en arrecifes de aguas poco profundas (hasta los 9 m) y en áreas ricas en algas verdes; también pueden ser crípticas, hallándose en cuevas del arrecife. Generalmente, crecen sobre el coral cubriendo amplias áreas del mismo, e incluso pueden crecer en la arena, fijándose a cualquier sustrato por un disco pedio adhesivo (Henríquez y Palacios, 2008). La especie presenta dos morfotipos, de acuerdo a la coloración de los tentáculos: puede ser verde o pardo, siendo el verde el morfotipo más común. Esta coloración está relacionada con la presencia de zooxantellas endosimbióticas que habitan en los tentáculos (González, 2007).

Son principalmente depredadores, siendo una característica fundamental la presencia de toxinas confinadas en células especializadas, llamadas cnidocitos, en los tentáculos de estos animales. Las sustancias activas del veneno, presentan actividad neurotóxica, hemolítica y antitumoral, por lo que esta especie es considerada un recurso terapéutico natural, siendo de gran interés en estudios a nivel biomédico y farmacológico. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la biología y ecología de esta especie,

lo cual resulta importante por su vulnerabilidad ante cambios ambientales y la ampliación de datos genéticos y poblacionales de la mayor cantidad de especies posibles (Macpherson *et al.*, 2008; Frazão *et al.*, 2012).

Presentan reproducción sexual y asexual, siendo esta última la más común; la observación de la fisión en ambientes naturales ha demostrado que tienen un alto potencial de reproducción asexual, este tipo de reproducción conlleva importantes consecuencias ecológicas tales como la rápida dispersión y colonización de nuevos ambientes, además de la producción de clones en un área geográficamente restringida, generando poblaciones genéticamente idénticas. El tipo de reproducción y por ende el potencial de dispersión, cumplen un rol importante en el flujo genético y la diferenciación genética intraespecífica, definiendo la estructura poblacional de la especie (Ting y Geller, 2000; Gomes *et al.*, 2003).

El estudio de los genotipos de las poblaciones naturales, permite entender el flujo genético y su influencia en la homogeneidad de la estructura genética de una especie, revelando dinámicas de poblaciones en cuanto a eventos de colonización y permitiendo entender el efecto de esto sobre los ecosistemas naturales. Los marcadores genéticos son una herramienta comúnmente usada en genética de poblaciones porque permiten detectar cualquier variación genética entre individuos de una misma especie, ayudando a definir la estructura poblacional a nivel genético (Ting y Geller, 2000; Bocharova, 2015).

El conocimiento de la estructura de las poblaciones proporciona, criterios para las estrategias de conservación y gestión de los espacios naturales, siendo objeto de estudio el análisis de la capacidad reproductiva de las especies y el reclutamiento de individuos juveniles a las poblaciones. Los marcadores moleculares permiten esclarecer criterios de la diversidad genética, la estructura y la conectividad de las poblaciones y el flujo génico,

que dependen de la capacidad de dispersión de las especies. Conocer el número de alelos intercambiados entre poblaciones y sus efectos a nivel local y regional es un dato valioso en biología de la conservación, ya que en condiciones óptimas, el flujo génico introduce nuevos polimorfismos en las poblaciones, aumentando su capacidad para resistir cambios azarosos en la frecuencia de alelos. En otras palabras, los marcadores moleculares permiten un análisis preciso del estado de las poblaciones y su relación con el entorno natural, así como de su capacidad de asimilar cambios potenciales en el ecosistema (Macpherson *et al.*, 2008).

En este trabajo se analizó la diversidad genética de los individuos de una población de *S. helianthus* en un arrecife de Isla Larga, Parque Nacional San Esteban, mediante el empleo de métodos de aislamiento de ADN de alto peso molecular y comparación de secuencias, mediante el uso de marcadores genéticos nucleares, con el fin de proporcionar conocimiento de la diversidad genómica entre individuos de *S. helianthus* sobre la base de la estructura poblacional basadas en secuencias nucleotídicas (Sánchez, 2010; Dawson *et al.*, 1998; Lohuis *et al.*, 1990).

## CAPÍTULO I. EL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del problema

Isla Larga alberga una gran variedad de especies marinas, muchas de ellas provenientes de la formación de un arrecife artificial en la zona suroeste, producto de un hundimiento. Dicho arrecife está conformado por comunidades bentónicas, incluyendo corales y otros organismos sésiles, como *S. helianthus* (Palacios, 2009). Las amenazas más comunes de los ecosistemas costeros de la isla están relacionados con la presencia de bañistas y su desconocimiento en el cuidado ambiental, principalmente de los ecosistemas bentónicos, así como el anclaje descuidado de embarcaciones y su impacto directo contra estructuras de la plataforma arrecifal (Figura 1). Esto se traduce en una amenaza a la salud de la comunidad entera, causando resuspensión de sedimentos y reducción de la materia orgánica disponible, destrucción directa de organismos y hasta poblaciones, y por destrucción del hábitat en general, provocando un impacto directo y acumulativo en este ambiente.



**Figura 1.** Presencia de bañistas y embarcaciones en la zona del arrecife donde habita *S. helianthus*.

La mayoría de las especies que conforman los arrecifes de la isla son sensibles a cambios ambientales, y su funcionamiento óptimo depende de parámetros ambientales tales como iluminación, oleaje, temperatura, calidad del agua y disponibilidad de alimento. Este es el caso de *S. helianthus*, para la cual la confluencia de ciertos niveles en los factores ambientales permite incrementos importantes en su abundancia, llegando a constituir agrupamientos particularmente numerosos en parches permanentes, que pueden tener hasta un 100% de cobertura. Bajo tales condiciones, el ciclo de vida de la anémona (en términos de reproducción), es alterado de acuerdo a cambios progresivos en el funcionamiento arrecifal (Palacios, 2009).

Bajo las condiciones del agrupamiento, factores como disponibilidad de alimento y permanencia bajo irradiación apropiada permiten a *S. helianthus* alcanzar una talla y desarrollo óptimos para su reproducción, la cual estará influenciada por cambios e interacciones entre los parámetros ambientales y balances fisiológicos, los cuales en última instancia determinarán la ocurrencia y/o alternancia de la estrategia de reproducción más adecuada en un momento determinado, bien sea asexual (más común y frecuente) o la sexual, con un mayor gasto energético (Cofforth *et al.*, 1992; Palacios, 2009). Al respecto, se reconoce que la propagación clonal es el medio de reclutamiento más importante dentro de poblaciones establecidas de anémonas, ya que la prevalencia de esta estrategia implica su éxito evolutivo (Cofforth *et al.*, 1992). De acuerdo a tales razonamientos, un agrupamiento de *S. helianthus* tendería a constituirse como una población localmente monoclonal.

Puesto que la estructura genética de la población refleja la contribución relativa de las estrategias de reproducción, es necesaria la identificación de los genotipos individuales para el análisis de dicha estructura. Esto implica el uso de marcadores genéticos apropiados, idealmente únicos para cada genotipo, ya que proveen la más precisa



medida de similitud genética en la identificación de variación y el nivel de los fragmentos de ADN individuales (Cofforth *et al.*, 1992). En este aspecto, cabe destacar que los genes de muchas poblaciones de cnidarios han sido poco caracterizados, en parte debido a la escasez de marcadores genéticos apropiados, la complejidad de los modelos de reproducción y la hibridación entre especies estrechamente relacionadas (Chomsky *et al.*, 2009).

La selección adecuada de los marcadores genéticos a emplear, se basa en primer lugar, en aspectos particulares de la clase Anthozoa, como el hecho de que la tasa de sustitución nucleotídica es mayor en el ADN nuclear que en el ADN mitocondrial, y que la información genética esté disponible en las bases de datos. Por otra parte, deben tomarse también en cuenta aspectos de la biología de *S. helianthus*, como su carácter hermafrodita y su tendencia reproductiva (Cofforth *et al.*, 1992; Chomsky *et al.*, 2009).

## **1.2. Justificación**

Los ecosistemas marinos son ricos en diversidad, y dada las frecuentes amenazas a estos ambientes, una gama de especies se encuentran expuestas constante y crecientemente a riesgos de extinción cada vez mayores, siendo las causas más comunes la sobrepesca, captura accidental, cambio climático y diversas actividades humanas. Caracterizar genéticamente poblaciones faunísticas de un ambiente determinado, es indispensable para diversos estudios de índole conservacionista o de aprovechamiento de recursos (Reitzel *et al.*, 2007). Por lo tanto, es relevante considerar la identificación de especies acuáticas a nivel molecular que son dianas vulnerables a cambios climáticos, impacto humano y diversos factores aleatorios, especialmente aquellas que son funcionales en investigaciones de índole médica y ecológica.

En Venezuela, existen algunos registros y descripciones de especies de anémonas asociadas a ambientes coralinos, pero la información acerca de la estructura poblacional es escasa. En el caso de las poblaciones de *S. helianthus*, los individuos se han adaptado a un hábitat que cumple con sus requerimientos, modificando su estructura corporal y alternando el tipo de reproducción (sexual o asexual). Habitualmente la reproducción asexual establece genotipos dominantes y puede cumplir un rol importante en la recolonización de áreas perturbadas. Además, genera poblaciones de distribución agregada que pueden presentar niveles variables de agresión intraespecífica e interespecífica (Henríquez y Palacios, 2008). Cabe destacar que la competencia intraespecífica sucede con mayor frecuencia en especies con patrones de colonización al azar, y las anémonas suelen competir por espacio con los corales al crecer sobre sus colonias, con las algas mediante sustancias químicas que inhiben la germinación de esporas, y con cualquier otro organismo bentónico de fondos duros mediante interacciones químicas o simple sombreo (Barrios *et al.*, 2002)

Al revisar la bibliografía, resalta como esta especie ha sido ampliamente caracterizada a nivel proteico, pero se ha dejado de lado la caracterización de su estructura genética de esta población. Tal caracterización permitiría encontrar grados de diversidad, que permitan entender la relación entre los individuos a nivel intraespecífico, incluso con implicaciones espaciales y temporales (Henríquez y Palacios, 2010; Barrios *et al.*, 2002). Los estudios genéticos basados en las diferencias a nivel molecular de una especie, pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones en procesos biológicos, donde el establecimiento de parentescos permita dilucidar el origen o la dinámica poblacional (Reitzel *et al.*, 2007). También se puede determinar la cantidad de entrecruzamiento entre diferentes grupos de la misma especie (flujo genético) para identificar poblaciones únicas, y se pueden comparar los

polimorfismos genéticos para esclarecer su clasificación (Avisé, 1993). Todo ello es potencialmente importante para la supervivencia de la especie.

Otro aspecto a considerar es la preservación de los ecosistemas marinos en Áreas Bajo Régimen de Administración Especial (ABRAE), como los Parques Nacionales. La permanencia de los ecosistemas coralinos depende directamente de sus procesos de reclutamiento, en el que las larvas planctónicas acceden a los sitios de fijación, traídas por los sistemas de corrientes locales y regionales (Palacios, 2009). La determinación del parentesco entre tales organismos que conforman poblaciones ya establecidas, debería ser un aspecto preponderante en la elaboración de normativas que permitan la conservación de los atributos que dieron lugar a dicha administración especial de la zona.

De acuerdo a los argumentos antes expuestos, resulta imperativo entonces determinar la variación genética y establecer medidas de la diversidad del genotipo de una población, lo que permitirá, entre otras cosas, deducir el tipo de reproducción de los individuos de la población de *S. helianthus*, permitiendo entender mejor parte de la dinámica poblacional de esta especie, y tomar decisiones apropiadas respecto a los métodos de conservación adecuados para la misma.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Validar el carácter monoclonal de un agrupamiento de *Stichodactyla helianthus* en un arrecife franjeante de Isla Larga en el Parque Nacional San Esteban, Edo. Carabobo.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Generar una base de datos de los individuos presentes en el agrupamiento y en otros sitios de fijación de *Stichodactyla helianthus* mediante el empleo de herramientas moleculares.
- Determinar la existencia de la variabilidad genética, en función de la distribución del agrupamiento y en otros sitios de fijación de *Stichodactyla helianthus*.

## **CAPÍTULO II.**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Bases teóricas**

##### **2.1.1. Características generales de la especie**

###### **2.1.1.1. Morfología**

Las anémonas, son animales invertebrados que carecen de esqueleto calcáreo, presentan simetría radial y se reconocen dos polos en su eje longitudinal, uno oral (boca) y uno aboral (disco pedio). Contienen dos capas de células, ectodermo y endodermo, separados por una mesoglea, principalmente acelular, derivada del ectodermo y del endodermo (epidermis y gastrodermis en el adulto). La mayor parte del cuerpo está formado por una gruesa columna lisa. En el extremo aboral de la columna hay un disco aplanado (disco pedio) que utiliza para la fijación; En el extremo oral hay un leve ensanchamiento de la columna que forma el disco oral, en este se encuentran los tentáculos digitiformes en *S. helianthus*. En el centro del disco oral se sitúa la boca, y ésta se continúa en una faringe aplanada con pliegues, que se extiende por el interior de la columna, y está constituida por una epidermis ciliada interna y una gastrodermis externa (Figura 2) (Rupert y Barnes, 1996; Brusca y Brusca, 2008).

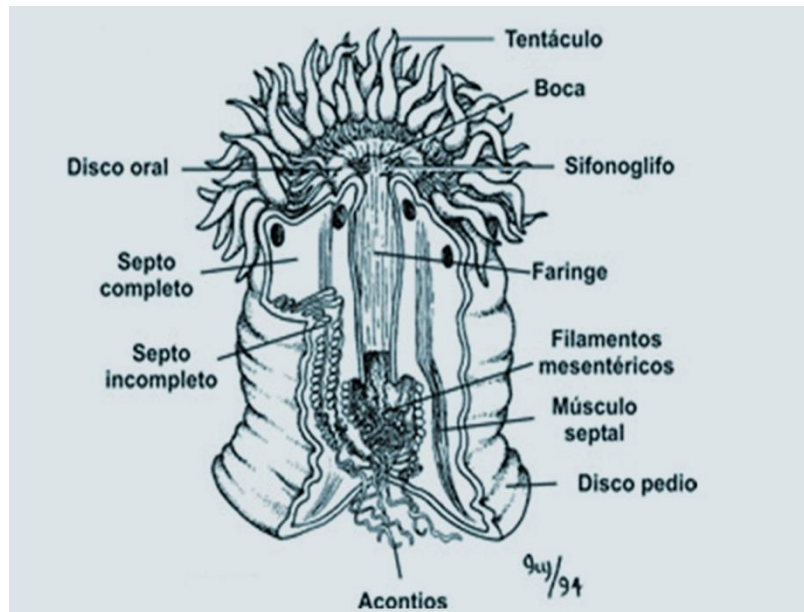
Las anémonas son principalmente depredadores, pero además pueden obtener nutrientes de forma intracelular por medio de la relación simbiótica con algas unicelulares (zooxantelas). La captura de las presas es mediada por tentáculos presentes en el disco oral, y su digestión ocurre en dos fases. La primera fase (fase extracelular) es llevada a cabo en el

celenterón o cavidad gastrovascular, ésta tiene forma de canal y paredes ciliadas, y se divide en septos denominados mesenterios; en las anémonas, estos mesenterios son salientes de la cara interna de la pared del cuerpo, por lo que están tapizados por la gastrodermis y rellenos por mesénquima, que se extienden desde la cara interna de la pared del cuerpo hasta la faringe, y generalmente llegan a fusionarse. La segunda fase es llevada a cabo en la gastrodermis mediante enzimas digestivas, que también actúan en la distribución de los materiales parcialmente digeridos. Finalmente, la digestión termina de forma intracelular por vacuolas digestivas y los residuos no digeridos en el celenterón son expulsados al exterior a través de la boca (Ruppert y Barnes 1996; Brusca y Brusca, 2008; Frazão *et al.*, 2012).

Estos animales carecen de un sistema nervioso centralizado, su estructura está caracterizada por neuronas que carecen de vaina de mielina, que son principalmente apolares y forman dos plexos, uno situado entre la epidermis y el mesénquima (mesoglea y productos celulares), y el otro entre gastrodermis y la mesoglea. Las neuronas tienen dos o más prolongaciones que pueden terminar en fibras musculares, células sensoriales, o unirse a las prolongaciones de otras células ganglionares. Las células receptoras se distribuyen a lo largo de la superficie epidérmica, siendo más abundantes en los tentáculos, y cada célula da lugar a cierto número de prolongaciones neuronales. También carecen de estructuras diferenciadas para el intercambio gaseoso, la excreción y la circulación (Ruppert y Barnes, 1996; Brusca y Brusca, 2008).

La musculatura de las anémonas es la más desarrollada dentro del phylum, está formada por células mioepiteliales que forman grupos de fibrillas contráctiles, las cuales actúan como un versátil y eficaz esqueleto hidrostático, que permite la entrada y salida de agua del celenterón, movimientos en la cavidad gástrica y retracción de la parte superior del cuerpo (llevado a cabo por los músculos gastrodérmicos y epidérmicos de los

tentáculos). Esto último ocurre mediante la formación de un pliegue denominado collar, que sirve como protección para la superficie oral, y también pueden contraer los músculos del disco pedio, permitiendo un lento desplazamiento sobre el sustrato (Brusca y Brusca, 2008).



**Figura 2.** Morfología general de un pólipo. Modificado de:  
<http://biodidac.bio.uottawa.ca/index.htm>.

El ciclo de vida de las anémonas, a diferencia de otros cnidarios, está caracterizada por no presentar alternancia de generaciones, común en otros representantes de este phylum: pólipo (con reproducción asexual) y medusa (con reproducción sexual). Las anémonas sólo presentan la forma pólipo, y su reproducción puede ser sexual y asexual. La reproducción asexual ocurre por fisión longitudinal (Figura 3), esta produce grandes agrupaciones de individuos genéticamente idénticos. La reproducción sexual se produce a partir de la formación de gametos en zonas de la gastrodermis, que son liberados para que se produzca una fecundación externa; El embrión sufre una gastrulación por invaginación para formar la larva plánula ciliada, el blastopóro se mantiene abierto y se prolonga hacia el arquenterón mediante

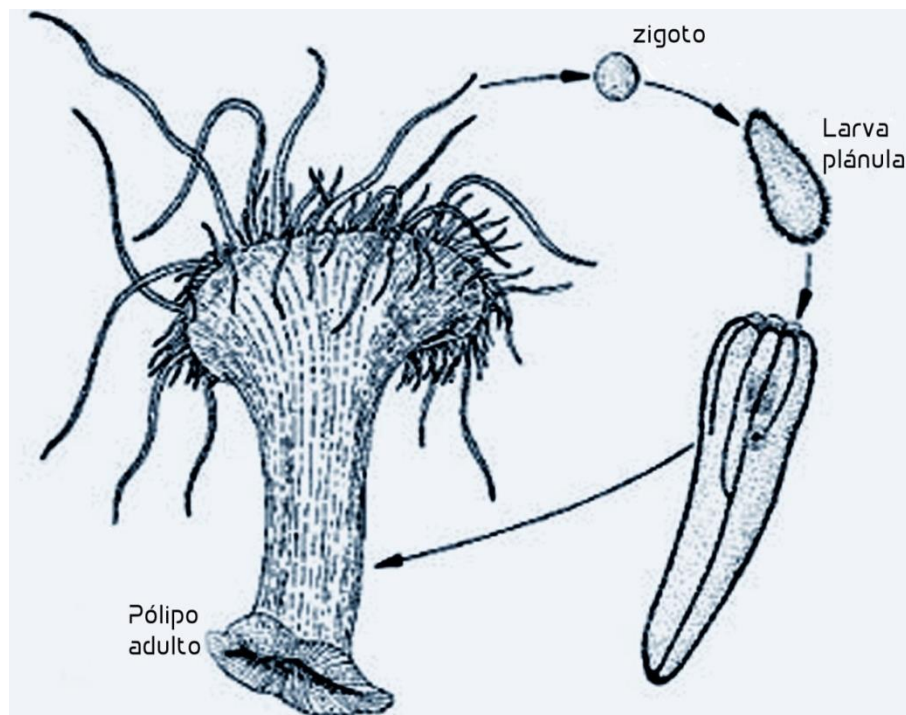
un tubo ectodérmico que, en el adulto, se convertirá en la faringe. El tiempo de vida de la larva y su capacidad de dispersión, depende de la capacidad que tiene para alimentarse, finalmente la larva se fija por su polo aboral a un sustrato y desarrollan los tentáculos alrededor de la boca y del disco oral (Figura 4) (Brusca y Brusca, 2008).



**Figura 3.** Reproducción asexual (fisión longitudinal) de un ejemplar de *S. helianthus*.

Modificado de: Lance (2008).





**Figura 4.** Ciclo de vida de pólipo con reproducción sexual: la fecundación es externa, el embrión sufre invaginación que da lugar a la larva plánula ciliada, finalmente esta se fija por su polo aboral y se desarrolla. Modificado de: Brusca y Brusca, 2008.

### 2.1.1.2. Bioquímica

Las anémonas, y los representantes del phylum Cnidaria en general, comparten la presencia de nematocistos como característica fundamental, los cuales contienen un filamento que, al ser estimulado, se proyecta e inyecta sustancias tóxicas a la víctima (Garateix y Rodriguez, 2010). Los cnidocistos se forman dentro de unas células llamadas cnidoblastos, a partir de la formación de una gran vacuola en cuyo interior se produce una compleja y poco conocida reorganización; cuando están totalmente formados, son cápsulas con una pared externa formada por proteínas globulares, y una interna formada por fibrillas parecidas al colágeno. Además, la cápsula presenta una invaginación en uno de los extremos y forma un filamento que se encuentra enrollado dentro de la misma. El veneno es inyectado a la presa o al depredador, después de la estimulación

química o mecánica (Brusca y Brusca, 2008; Frazão *et al.*, 2012). En los antozoos se reconocen tres tipos de cnidocitos:

*Nematocistos*, en los que la cápsula está formada por una pared doble y un contenido formado por fenoles y proteínas. El filamento urticante generalmente cuenta con espinas y estiletes; tienen función paralizante y contribuyen a la penetración y anclaje de la presa.

*Espirocistos*, en los que la cápsula es de pared sencilla y contiene mucoproteínas o glucoproteínas, que son sustancias adhesivas.

*Pticocistos*, estructuras que carecen de espinas y el poro terminal es netamente adhesivo; están involucrados en la protección.

El veneno en los antozoos está disperso por todo el cuerpo, en una capa mucosa que protege contra los depredadores, y constituye un recurso farmacológico de gran importancia por contener citolisinas, neurotoxinas, fosfolipasas, inhibidores de proteasas y bloqueadores de canales de sodio y potasio. Todos estos compuestos otorgan al veneno características terapéuticas en la actividad antitumoral, y además actúa sobre los canales de voltaje, permitiendo el diseño de drogas e incluso insecticidas. Entre los cnidocistos, los nematocistos poseen una gran cantidad de polipéptidos y proteínas que actúan como neurotoxinas, y de hemolisinas y enzimas que tienen diversos efectos en el ser humano, principalmente hormigueo, parálisis, dermatitis y cardiotoxicidad (Frazão *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2012).

En cuanto a la actividad fosfolipasas, *S. helianthus* contiene dos isoenzimas con actividad fosfolipasa, específicamente del tipo A<sub>2</sub>, las cuales tienen un peso 18 kDa y son inhibidas por altas concentraciones de calcio. Dicha actividad está relacionada a su vez con la actividad hemolítica, la cual

también es inhibida por concentraciones de calcio elevadas, y está dada por la actividad citolítica de las sticholisinas (González, 2007).

Una de las especies más estudiadas en cuanto a la presencia de citolisinas es *S. helianthus*, de la cual se han descrito dos tipos de citolisinas o actinoporinas llamadas Sticholisinas (StI y StII). Ambas, son proteínas de aproximadamente 20 kDa, y se unen a las esfingomielinas por dos dominios que reconocen respectivamente la regiones hidrofílica e hidrofóbica de la toxina, con alta concentración de aminoácidos no polares, elevados puntos isoeléctricos (>9,5), y peso molecular de 19,392 kDa y 19,283 kDa, respectivamente. También ambas tienen actividad hemolítica, al formar poros de catión selectivo, pero tienen estructuras diferentes debido a la sustitución de un amino N-Terminal, que cumple un rol importante en la formación de poros funcionales y en la actividad lítica, y que causa diferencia en la actividad hemolítica, siendo StII la que exhibe mayor actividad (Álvarez *et al.*, 2009; García *et al.*, 2009; Frazão *et al.*, 2012).

La mayoría de los estudios de filogenia para clasificar a los cnidarios están basados en características morfológicas, ya que la clasificación a nivel molecular aún no está bien esclarecida. Sin embargo, se pueden determinar relaciones filogenéticas entre los representantes del phylum por medio del estudio de las características de las toxinas y los canales de voltaje de sodio y potasio. De esta manera, se ha demostrado que *S. helianthus* cuenta con canales de voltaje de potasio tipo I; los cuales son tetrámeros formados por la asociación de subunidades idénticas o estrechamente relacionadas, que bloquean de forma potente los canales potasio Kv1.3 y Kv 1.2. La toxina actúa de modo que, al unirse con el receptor ubicado en la cara extracelular del canal, bloquea el paso de los iones, así por ejemplo, al entrar en contacto la neurotoxina con el Kv1.3 se genera una despolarización en la membrana celular de la célula T, atenuando la señalización de calcio que es vital para para la proliferación y la respuesta inmune de la célula T (Díaz, 1999; Yan *et*

*al.*, 2005; Frazão *et al.*, 2012; Sabogal, 2012).

Por su parte, los canales dependientes de voltaje de sodio, en *S. helianthus*, están compuestos por 46-51 residuos de aminoácidos, una hoja  $\beta$  con cuatro bandas antiparalelas, y una vuelta altamente flexible denominada "Arg-14 loop". Producen cambios conformacionales durante la activación dependiente de voltaje. Durante la despolarización, segmentos de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio, se desplazan hacia el espacio extracelular. Las toxinas se unen al lazo extracelular ubicado entre los segmentos transmembranales, estableciendo una interacción electrostática con residuos de los canales de sodio de ciertas neuronas, células cardíacas, y en los canales de sodio del músculo esquelético. La unión de estas toxinas al asa extracelular inhibe la inactivación rápida de estos canales (Sacelda y Ortega, 2009).

### **2.1.1.3. Importancia farmacológica, biotecnológica y ecológica**

El Phylum Cnidaria ha sido considerado como herramienta importante en el campo de la farmacología y a nivel molecular, con atención especial en las anémonas de mar, ya que producen citolisinas que ocasiona estrés osmótico y lisis (Basutlo *et al.*, 2006), el cuerpo entero de estos animales es rico en nematocistos y entre éstos se encuentran una gran diversidad de toxinas capaces de unirse a los canales iónicos de diferentes membranas excitables. Este mecanismo interviene en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como la contracción muscular y la comunicación de señales entre las células nerviosas (Del monte *et al.*, 2012). En este sentido, los nematocistos han sido aislados para usarlos como fuente de compuestos con actividad farmacológica, el estudio de la estructura molecular y las propiedades funcionales de los canales iónicos (Garateix y Rodríguez, 2010). En *S. helianthus*, se han aislado y probado *in vivo* las toxinas características de la especie, con especial atención en Sticholisina II, que

bloquea canales de potasio lo que resulta funcional en casos de esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis reumatoide, encefalomiелitis y otras enfermedades autoinmunes (Quiroz y Retuerto, 2005).

Debido a la relación de los canales iónicos a numerosas enfermedades, ha existido en la actualidad cierto interés por las toxinas capaces de unirse a canales iónicos de diferentes membranas excitables, y es por ello que los nematocistos han sido utilizados como fuente de compuestos con actividad farmacológica. Tanto por sus características bioquímicas, como por sus efectos fisiológicos, estos compuestos han tenido una contribución importante como herramientas farmacológicas para el análisis de diversos procesos a nivel molecular, y muy posiblemente podrán devenir en moléculas promisorias para el desarrollo de nuevos fármacos de aplicación médica (Garateix y Rodríguez, 2010).

Así como son importantes en biotecnología, las anémonas se encuentran dentro de los organismos que cumplen un rol importante en la ecología de los arrecifes de coral; los arrecifes son los sistemas más complejos y diversos del medio marino, en ellos coexisten especies de prácticamente todos los grupos de organismos marinos existentes. Dentro de estos ecosistemas, las anémonas mantienen relaciones simbióticas del tipo mutualista con cangrejos de la especie *Mithraculus cinctimanus* y *Periclimenes yucatanicus*, y zooxantelas. Los cangrejos utilizan los tentáculos urticantes de la anémona a modo de protección, y esta se beneficia de la limpieza de su disco oral y tentáculos como consecuencia de los continuos movimientos de estos. Mientras que las algas se benefician de ciertos catabolitos de la anémona principalmente fósforo y nitrógeno, y esta a su vez aprovecha el oxígeno y azúcares producto de la fotosíntesis. Cabe destacar, que además las zooxantelas son buenas indicadores de agentes que son causantes estrés en el arrecife (Ponce *et al.*, 1997; Henriquez y Palacios, 2008).

Las anemonas, también cumplen un rol importante en las redes tróficas de los ecosistemas que habitan, ya que ocupan los niveles tróficos superiores de la zona intermareal, incluso, pueden llegar a ser los depredadores dominantes en algunas comunidades, contribuyendo al mantenimiento del flujo de materia y energía en el ecosistema (Fueyo. 2008. Quesada, 2013). Por otra parte, debido a las características de su ciclo reproductivo, *S. helianthus* tiene la capacidad de aprovechar condiciones locales para aumentar su densidad de manera drástica, formando grandes grupos de individuos clonados por división, atribuyéndole la característica de especie dominante en zonas de su rango, lo cual causa efecto disruptivo en las comunidades biológicas de la columna de agua e incluso la eliminación de depredadores tope en las tramas tróficas (Gasca y Loman. 2014).

### **2.1.2. Genética de Poblaciones y Ecología Molecular**

Una población puede definirse como un grupo local de individuos que pertenece a una especie, dentro de la que ocurren apareamientos reales o potenciales, siendo la especie la mayor unidad evolutiva. El conjunto de informaciones genéticas que llevan todos los miembros de una población, se denomina acervo génico, de forma que, para un locus dado, este acervo incluye todos los alelos de dicho gen que están presentes en la población. Una de las características que resulta distintiva de la población, es que, a diferencia de la especie, puede intercambiar genes con otras poblaciones de la misma especie, es decir, es una entidad genética abierta, por lo que su constitución genética, se describe por medio del arreglo de las frecuencias génicas; esto es, por la especificación de los alelos presentes en cada locus y los números o proporciones de los diferentes alelos en cada locus, mientras que la especie al ser una entidad cerrada, su destino evolutivo está escrito en su acervo (Falconer, 1971; Cabrero y Camacho, 2002).

La genética de poblaciones es una disciplina interesada en el origen, cantidad y distribución de la variabilidad genética presente en las poblaciones naturales, así como el destino de esta variación a través del tiempo y el espacio, centrándose en la cuantificación de las frecuencias alélicas y genotípicas en generaciones sucesivas (esto constituye la base fundamental del cambio evolutivo, por lo que la evolución se considera como la transformación genética de las poblaciones en el tiempo y el espacio). La ecología molecular es una rama de la ecología que busca el análisis formal de la genética de poblaciones y para lo cual emplea herramientas moleculares, principalmente marcadores moleculares, para resolver problemas clásicos de la ecología de poblaciones, análisis de paternidad (con el fin de obtener una estimación directa del flujo genético), estudio de la conducta, la evolución de los sistemas reproductivos y la selección sexual. La ecología molecular ha dado nuevas perspectivas en cuanto a temas de variación, selección, mutación, deriva, flujo génico, etc. Además, resuelve incógnitas evolutivas a diferentes escalas de organización (poblaciones, especies, comunidades) y rango geográfico (hábitats, localidades, regiones, continentes, subregiones biogeográficas). Esta rama de la ciencia permite el desarrollo de nuevos tipos de marcadores y métodos analíticos (estadísticos) para el escrutinio de la variabilidad genética (Eguiarte *et al.*, 2007; Jordano, 2009; Esquivel, 2014; Barbadilla, 2014).

Las poblaciones son dinámicas; pueden crecer y expandirse o disminuir y contraerse mediante cambios en las tasas de nacimiento o mortalidad, o por migración o fusión con otras poblaciones. Esto tiene consecuencias importantes y, con el tiempo, puede dar lugar a cambios en la estructura genética de la población. La variación en las características de los organismos de una población se origina a través de mutaciones al azar de secuencias de ADN que las determinan. Además, la variación genética aumenta por recombinación durante la reproducción sexual, que produce

nuevas combinaciones de genes, y también por el flujo génico. El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos, así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras; sin embargo los migrantes que no se reproducen en la población a la que migraron no contribuyen al flujo génico. El estudio del flujo génico es un componente importante en la estructura de las poblaciones ya que generalmente es alto en todas las poblaciones, conllevando a la integración de la especie (evolución de forma conjunta), e influyendo en procesos ecológicos tales como recolonización. La mayor precisión y resolución de los marcadores moleculares para la identificación individual ha permitido relacionar variaciones en el grado de parentesco, y la variación infra-específica e intra-poblacional ha permitido comprender mejor los patrones de flujo génico en ambientes naturales, y establecer patrones de flujo génico en tiempo real asociados a variaciones del ecosistema (Cabrero y Camacho, 2002; Eguiarte *et al.*, 2007).

En los ambientes marinos, especialmente en los arrecifes de coral, resulta interesante la estructura génica de las poblaciones y el flujo génico, siendo el tipo de reproducción determinante en la estructura génica de sus poblaciones, ya que existe una contribución relativa de la reproducción sexual y asexual, las cuales se pueden encontrar juntas en ciertas especies de invertebrados marinos, tales como las anémonas. La reproducción sexual genera descendientes genotípicamente diversos dentro de una misma población, mientras que, la reproducción asexual conlleva al reclutamiento de genotipos clonales y con la predominancia de uno o unos pocos genotipos y en algunos casos a excesos de heterocigotos en la mayoría de los loci en una población, ya que, si todos los individuos de una población son



genéticamente idénticos para un cierto locus, es decir, son homocigotos para el mismo alelo, no puede haber evolución en ese locus, porque las frecuencias alélicas no pueden cambiar de una generación a otra. El estudio formal del flujo génico, a partir de herramientas moleculares, permite en general, conocer elementos que aportan información sobre las poblaciones a nivel de estructura génica, lo que permitiría plantear estrategias de conservación exitosas (Cabrero y Camacho, 2002; García, 2005)

### **2.1.3. Polimorfismos**

Los polimorfismos se definen como la variación estructural o funcional encontrada entre miembros de una misma especie, que puede estar determinada por diferencias genéticas o por el medio ambiente; estas mutaciones dan lugar a variaciones alélicas entre individuos y diversidad de la misma especie. En tal sentido, el ADN está expuesto a alteraciones genéticas tales como reorganizaciones cromosómicas, duplicaciones y deleciones de fragmentos o de cromosomas enteros. Estas mutaciones pueden ser originadas por errores en el mecanismo de replicación y reparación del ADN, así como por factores ambientales. (Gómez, 2003; Checa, 2007).

Se considera polimorfismo y se diferencia de mutación cuando la frecuencia de variación de uno de los alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas), pero los más frecuentes son los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) (Checa, 2007). Los SNP's consisten en la sustitución de un nucleótido por otro, pueden dar lugar a variaciones en la secuencia del ADN, y se localizan por todo el genoma. Son típicamente bialélicos, y muy raramente tri- y tetraalélicos. La mayoría de los SNP's se encuentran en regiones no codificantes del ADN o son sinónimos (se produce un cambio de nucleótido que genera el mismo aminoácido,

alterando la cadena de ADN, pero no a la proteína), careciendo de efecto biológico. Otros afectan a regiones codificantes o funcionales del genoma, pudiendo modificar la expresión de un gen. Se ha propuesto la hipótesis de que estos últimos polimorfismos son los responsables de gran parte de las diferencias hereditarias entre individuos, pudiendo determinar la respuesta individual a factores ambientales y farmacológicos, y la predisposición genética a muchas enfermedades (Sánchez, 2010).

Otro tipo de polimorfismo común está dado por el ADN repetitivo en tándem, que son secuencias repetitivas agrupadas en tándem, y se pueden subdividir según su tamaño y distribución dentro del genoma en tres tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite; los primeros pesan desde 100 Kb hasta varias Mb y se sitúan en la región centromérica; los segundos pesan de 0,1 a 40 Kb, la unidad de repetición es de 10 a 100 pb, y se ubican en los telómeros; los últimos tienen un tamaño de hasta 400 pb y están dispersos por todo el genoma (Cal, 2001; Sánchez, 2010).

Los polimorfismos, además, se puede clasificar según el tipo de cambio que se produce y el número de alelos que presentan:

- *Polimorfismos de secuencia*, se producen por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia del ADN, sin modificación de tamaño. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN codificante (Checa, 2007).
- *Polimorfismos de longitud*, se producen por la inserción o delección de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en el ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini- y microsatélite (Checa, 2007).
- *Polimorfismos bialélicos*, aquellos que se presentan únicamente con dos variantes posibles. Ejemplo de ellos son los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), alelos nulos y polimorfismos de inserción/delección (Checa, 2007).

- *Polimorfismos multialélicos*, aquellos que presentan más de dos variantes para el mismo locus. Algunos ejemplos son el ADN repetitivo (minisatélites, microsatélites) o el sistema HLA (Checa, 2007).

Los polimorfismos han sido ampliamente utilizados para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva, y, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades multigénicas. Ambos tipos de estudios han servido de pauta para la creación de nuevas disciplinas como la ecogenética y la farmacogenética; la primera define las bases genéticas de las diferencias individuales en respuesta a los factores ambientales, mientras que la segunda se centra en la definición de las diferencias individuales en respuesta a un tratamiento farmacológico (Gómez, 2003; Checa, 2007).

En los estudios basados en polimorfismos actualmente se emplean cuatro mecanismos generales para llevar a cabo la discriminación alélica: hibridación alelo-específica, ligación de oligonucleótidos alelo-específicas, incorporación de oligonucleótidos alelo-específica y corte enzimático alelo-específico. Algunos ejemplos de estas técnicas son:

*PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)*: se usan enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN; es decir, un fragmento de ADN amplificado por PCR se somete a digestión con una endonucleasa, ésta tendrá un sitio de corte específico y las variaciones alterarán este patrón de corte; dando como resultado un patrón diferente de migración de fragmentos de ADN que puede ser visualizado mediante el corrimiento de estos fragmentos en geles de agarosa, comparando y distinguiendo los distintos genotipos (Checa, 2007).

*Hibridación*: en ésta se diseñan dos pruebas alelo-específicas para hibridar a una secuencia blanco, solamente cuando éstas sean totalmente

complementarias. Cuando las sondas alelo-específicas son inmovilizadas sobre un soporte, se capturan las muestras de ADN y se visualizan los eventos de hibridación detectando una marca fluorescente. La hibridación es una de las formas más fáciles para la discriminación alélicas ya que no se usan enzimas (Checa, 2007).

*Extensión de oligonucleótidos (Primer extensión):* prueba muy sólida y flexible de discriminación alélica. Hay tres categorías de variaciones del método, basadas en que la ADN polimerasa puede incorporar nucleótidos específicos complementarios a la secuencia del templado: a) secuenciación (incorporación de nucleótidos alelo-específicos), en donde se determina la identidad de la base polimórfica en el ADN blanco, b) prueba de PCR alelo-específica, donde se usa la ADN polimerasa para amplificar el ADN blanco solamente si los oligos de PCR alelo-específico son perfectamente complementarios a la secuencia blanco, y c) prueba de “primer extensión” alelo-específica, donde una o muy pocas bases son incorporadas solamente si el extremo 3’ de la sonda reconoce la base polimórfica en la secuencia blanco (Checa, 2007).

*PCR en tiempo real:* método basado en la aplicación de la técnica de PCR y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado. Este tipo de análisis es más utilizado hoy en día porque ya existen sondas prediseñadas para un sinnúmero de polimorfismos, ya descritos (Checa, 2007).

#### **2.1.4. Marcadores moleculares**

La ecología molecular es un área multidisciplinaria, que hace uso de marcadores moleculares basados en genealogías soportadas por herencia y principios genéticos, en una búsqueda de solucionar problemas en ecología y evolución mediante relaciones genéticas entre individuos, poblaciones o

especies, para abordar problemas a diferentes escalas biológicas jerarquizadas. Los marcadores moleculares son una herramienta que permiten localizar y aislar genes de interés, revelando sitios de variación a nivel de secuencia de ADN, que no se muestran en el fenotipo (Burke *et al.*, 1992; Astorga, 2007).

El objetivo de la obtención de marcadores moleculares es establecer variantes polimórficas que permitan discriminar entre grupos de estudio al nivel que este sea necesario, permitiendo obtener una marca que diferencia un grupo de otro (Astorga, 2007). Los marcadores moleculares dan información sobre diversidad genética, relacionada a diferencias entre características moleculares de los individuos, permitiendo conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN (Velasco, 2005; Picca *et al.*, 2006). Debido al grado en incongruencias entre los datos morfológicos y moleculares de los organismos, el uso de marcadores genéticos ha originado polémica en cuanto al establecimiento de hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, estimación de la variación dentro de las poblaciones y comprobación de hipótesis de adaptaciones ecológicas. Sin embargo, los caracteres moleculares no dejan de ser caracteres taxonómicos cuyo estudio permite establecer relaciones entre los individuos de la misma o diferentes especies. Entre las ventajas más importantes que presentan los caracteres moleculares se encuentran (Rentarúa, 2007; Lara, 2008):

1. Son caracteres transmitidos genéticamente y las características moleculares son universales.
2. Existen genes presentes en todos los genomas celulares (son ubicuos) y permiten estudiar las relaciones entre todas las formas de vida.
3. Constituyen una fuente “ilimitada” de caracteres.

4. Permiten realizar comparaciones a cualquier nivel de diferenciación genética.
5. Su valor en los estudios comparativos es el mismo indistintamente del estadio de desarrollo de que se trate.
6. Constituyen una fuente de datos alternativa cuando la ausencia de caracteres morfológicos conducen a resultados controversiales.

En general se utilizan principalmente las secuencias de ADN como método para inferir relaciones filogenéticas a todos los niveles taxonómicos, así como los análisis de microsatélites y minisatélites (DNA fingerprinting) para estudios más precisos sobre la estructura de poblaciones naturales, de determinación de parentesco, selección sexual, comportamiento reproductor y ecología de poblaciones. Los marcadores moleculares se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (patrones de bandas distinguible en homocigos y heterocigos), se pueden diferenciar según su origen (principalmente nuclear o mitocondrial), lo cual lleva implícito el tipo de herencia (biparental o uniparental) y según si codifican proteínas o no (Burke *et al.*, 1992; Carranza, 2002; Rentarúa, 2007).

#### **2.1.4.1. Tipos de marcadores moleculares**

- *Isoenzimas*: son formas moleculares múltiples de las enzimas que tienen funciones idénticas y están presentes en el mismo, pueden presentar varias formas alélicas, denominadas aloenzimas. En su mayoría son selectivamente neutras y se utilizan como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos, como estimador de la composición genética de una población. Los resultados obtenidos son analizados por comparación de bandas en geles de poliacrilamida, agarosa, almidón, o nitrato de celulosa (Rentarúa, 2007).

*Ventajas:* los genotipos homocigos y heterocigos pueden ser distinguidos con precisión, muchos de sus loci son polimorficos, es económico (Rentaría, 2007).

*Desventajas:* es poco reproducible y revela poca variación (Rentaría, 2007).

- *AFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados):* Este método consiste en la utilización de dos enzimas de restricción (MseI y EcoRI) con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción usando primers marcados basados en las secuencias ligadas, y dos amplificaciones de PCR: la primera llevada a cabo mediante iniciadores con una base extra en el extremo 3', lo que produce un conjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al iniciador, complementan a la base extra adicionada. La segunda, llevada a cabo a partir de los productos de la primera, los fragmentos resultantes son complementarios, además del iniciador, a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es finalmente amplificado por PCR. Los resultados son visualizados mediante electroforesis y analizados por presencia-ausencia de un locus dado, por lo cual corresponden a un marcador dominante (Rentaría, 2007; Astorga, 2008).

*Ventajas:* es de bajo costo, capaz de detectar un alto índice de polimorfismo, no requieren conocimiento previo del genoma y es altamente reproducible (Igea, 2012).

*Desventajas:* se dificulta lectura y aportan bajo contenido de información por locus, existe alto riesgo de asignación incorrecta de la homología de algunos fragmentos homoplasia, como resultado de la comigración de fragmentos de ADN de individuos diferentes o incluso el mismo individuo, entre los perfiles de AFLP (Igea, 2012).

- *Microsatélites o SSR (secuencias simples repetitivas):* estos consisten en secuencias de ADN constituidas por repeticiones en tándem de 2 a 5

nucleótidos. Son marcadores altamente polimórficos y abundantes a lo largo del genoma. Las regiones adyacentes a estas zonas generalmente son conservadas, por lo cual su análisis está basado en amplificación por PCR. Los resultados pueden ser visualizados mediante gel de agarosa de alta resolución por tinción con bromuro de etidio o nitrato de plata, o mediante lectura automatizada en un secuenciador de ADN con marcaje fluorescente (Bello, 2001; Astorga, 2008; Igea, 2012).

*Ventajas:* son abundantes en el genoma, por su elevado número de alelos por locus presentan una alta variabilidad, su forma de herencia codominante le permite aplicar una gran variedad de análisis estadísticos, tienen un alto polimorfismo lo cual los hace idóneos para identificaciones individuales y éxito reproductivo (Bello, 2001; Astorga, 2008).

*Desventajas:* se presentan cambios de longitud en los alelos durante la meiosis, tasas muy variables entre loci y alelos (falta de aplicabilidad general), tienden a acumular cambios homoplásicos, alto riesgo de aparición de alelos nulos o de las llamadas “stutter bands” (amplificaciones de productos de PCR algo menores que el alelo real y que se producen por errores de la polimerasa al trabajar con secuencias tan repetitivas), además debido al proceso de desarrollo de estos marcadores, existe un riesgo de incurrir en un sesgo de muestreo (Igea, 2012).

- *RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción):* fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales, consiste en la obtención de fragmentos de ADN mediante el uso de endonucleasas de restricción, resultando en la expresión de diferencias específicas de ADN entre los individuos. Los fragmentos resultantes por esta técnica pueden ser analizados mediante southern blot, en el cual el ADN digerido, es separado mediante electroforesis, transferido a una membrana y visualizado mediante sondas específicas (Rentarías, 2007; Astorga, 2008).



*Ventajas:* comprenden un número potencialmente ilimitado de loci (alta cobertura genómica), permiten una amplia cobertura del genoma, son altamente reproducibles, permiten homologar mapas de ligamiento diferentes, y en algunos casos se pueden usar las mismas sondas en especies relacionadas (Rentarías, 2007).

*Desventajas:* es un método altamente costoso y laborioso, puede presentar bajo nivel de polimorfismo en algunas especies, se requiere disponer de sondas específicas para la especie en estudio, y requiere altas cantidades de DNA (Rentarías, 2007).

- *PCR-RFLP:* este método corresponde a una variante del método anterior, se utilizan cebadores particulares en cada caso para amplificar por replicación selectiva segmentos discretos de DNA, mediante PCR. Por lo cual en este proceso se realiza la digestión enzimática posterior a la obtención de las copias del fragmento de interés, los fragmentos son visualizados mediante electroforesis simple en gel de agarosa. El resultado será la visualización de la información codominante (Pérez, 1996; Astorga, 2008).

*Ventajas:* detecta un alto índice de polimorfismos, es económico y sencillo, por lo que ha sido ampliamente utilizado en la construcción de mapas genéticos, y taxonomía (Rentarías, 2007).

*Desventajas:* requiere grandes cantidades de ADN de buena calidad para la detección de loci de copias únicas, además demanda muchas manipulaciones y solamente se detecta una fracción de la variabilidad de secuencias existentes en el genoma, es decir, su información es limitada (Rentarías, 2007).

- *Minisatélites o VNTR (número variable de repeticiones en tándem):* son repeticiones en tandem de secuencias del genoma que contienen de 9 a 100 pares de bases. El número de repeticiones es variable pero en general es

menor a 1000. El método para su detección se lleva a cabo por hibridación o PCR. El resultado serán fragmentos de diferentes longitudes para cada individuo (patrón de bandas complejo), que son detectados mediante sondas diseñadas a partir de la secuencia de ADN que corresponde a cada repetición. Estos fragmentos pueden ser considerados como un tipo específico de RFLP (Picca *et al.*, 2006).

*Ventajas:* dan información de los fragmentos de restricción en cada locus hipervariable, el número y distribución de los loci a lo largo del genoma, posibilitando la visualización simultánea de diversas regiones del mismo (Picca *et al.*, 2006).

*Desventajas:* son muy laboriosos, costosos y difíciles de automatizar (Picca *et al.*, 2006).

- *RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar):* este método consiste en la amplificación al azar de secuencias cortas de nucleótidos, se basa en la probabilidad de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 8 a 10 pb a lo largo del genoma, que luego son amplificados por PCR. Mediante este método es posible obtener una alta cantidad de fragmentos que son visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. A diferencia de los marcadores anteriores, estos son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular, y se considera que cada fragmento corresponde a un locus bialélico, que es leído como presencia o ausencia de un producto amplificado, por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy- Weinberg (Rentaría, 2007; Astorga, 2008).

*Ventajas:* amplifican regiones codificantes y no codificantes del ADN y revelan niveles de variación más altos que los métodos anteriores, es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la

secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas, por lo que ha sido utilizado ampliamente en la elaboración de mapas genéticos, estudios de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación (Rentarías, 2007).

*Desventajas:* problemas en cuanto a la presencia de bandas erróneas, reproducibilidad de los resultados, mal interpretación de los resultados por la presencia de alelos desconocidos y dan menos información genética por locus que los marcadores codomiantes (Rentarías, 2007).

- *Secuenciación:* Consiste en la lectura de las bases nucleotídicas presentes en un gen o fragmento de ADN, permitiendo obtener un análisis más detallado de las diferencias en regiones de interés en el ADN de diferentes individuos. Este método se lleva a cabo amplificando por PCR los fragmentos del ADN que se desea analizar, que luego serán secuenciados automáticamente mediante un secuenciador de ADN (Rentarías, 2007; Astorga, 2008).

*Ventaja:* alcanza la mayor resolución posible en la obtención de la información genética (Rentarías, 2007).

*Desventaja:* es altamente costoso (Rentarías, 2007).

- *SNP (Polimorfismo de nucleótido simple):* es un cambio puntual en la composición nucleotídica de una secuencia de ADN, es el polimorfismo más frecuente (aproximadamente uno cada 300 – 1000 pares de bases) en todos los genomas. Es un marcador bialélico, determinado por la baja tasa de mutación de las sustituciones únicas que originan los SNP (Astorga, 2008; Igea, 2012).

*Ventaja:* es abundante dentro del genoma (Astorga, 2008).

*Desventajas:* requiere un conocimiento extensivo del genoma de la especie en estudio, su aplicación intraespecífica no es factible y es altamente costoso (Astorga, 2008; Igea, 2012).

- *EST (secuencia de genes expresados):* son secuencias generadas al azar de clones de ADN complementarios, permitiendo identificar genes y analizar su expresión por medio de perfiles de expresión de genes. Este tipo de marcador permite el desarrollo de microarreglos, que son arreglos de cientos de millares de secuencias de ADN inmovilizadas y ordenadas en forma de matriz adheridas a una superficie sólida que contiene todos los genes conocidos de una especie, y ya que cada secuencia corresponde a un gen diferente, se pueden identificar los genes activos del tejido del organismo (Rentarías, 2007; Astorga, 2008).

*Ventaja:* debido a que las frecuencias de EST particulares reflejan la abundancia del ARNm correspondiente en una célula, los datos proporcionan una estimación aproximada de los genes que se expresan de forma activa en un genoma bajo una condición fisiológica en particular (Martín, 2013).

*Desventajas:* las secuencias EST suelen ser de baja calidad, ya que se generan de forma automática y sin verificación, las secuencias de genes en el extremo 3' tienden a ser más fuertemente representadas que aquellas en el extremo 5', presentan clones quiméricos debido a artefactos de clonación en la construcción de la biblioteca, en la que más de una transcripción se liga a un clon resultante del extremo 5' de un gen y el extremo 3' de otro gen (Martín, 2013).

Es importante resaltar que uno de los criterios importantes en los estudios a nivel poblacional, o evolutivo es el muestreo, este debe considerar muestras representativas de todo el rango ecológico y distribución del o los taxones en cuestión, el segundo criterio a considerar es el genómico (Pérez, 1996), este puede ser:

*ADN nuclear:* se encuentra empaquetado en el núcleo de las células eucariotas, está asociado a histonas conformando los cromosomas, está conformado por secuencias interrumpidas de regiones codificantes (exones) y abundantes regiones no codificantes (intrones), y contiene valores comprendidos entre mil y diez mil millones de pares de bases. Los genes nucleares presentan tasas de mutación menor a las de ADN mitocondrial, por lo que no dan información suficiente para resolver problemas de filogenia a nivel intraespecífico, sin embargo, los exones han sido ampliamente utilizados en la resoluciones de problemas a otros niveles jerárquicos (Klug *et al.*, 2006; Rentarúa, 2007; Igea, 2012).

*ADN mitocondrial:* se encuentra en las mitocondrias de las células eucariotas, está organizado en forma de una doble hélice circular, y codifica para diversas proteínas implicadas en el transporte de electrones, más de veinte RNA de transferencia y dos RNA ribosómicos (12S rRNA y 16S rRNA). A diferencia del ADN nuclear, este no presenta intrones, tiene una mayor tasa de mutación, no es recombinante y es de herencia uniparental, por lo que es ampliamente utilizado en la resolución de problemas de filogenia a nivel poblacional. Otro aspecto resaltante, es que como las mitocondrias suelen encontrarse en el citoplasma en gran número, existen múltiples genomas mitocondriales todos ellos iguales, por lo que es muy fácil obtener ADN a partir de cantidades muy pequeñas de tejido (Carranza, 2002).

Las principales ventajas que supone el uso de marcadores de ADN mitocondrial son (Carranza, 2002):

- “Las diferencias encontradas entre individuos se deben única y exclusivamente a fenómenos de mutación y no son el resultado de recombinación”.
- “En una población donde machos y hembras se encuentran en igual proporción el número efectivo de genes mitocondriales estará reducido por

cuatro, incrementando el efecto de la deriva génica y la tasa de renovación genética dentro de las poblaciones”.

- “La elevada tasa de mutación incrementa el nivel de variabilidad entre poblaciones, eliminando más rápido que los genes nucleares los polimorfismos (alelos) ancestrales existentes a nivel inter e intraespecífico”.
- “La comparación de marcadores genéticos uniparentales (mitocondriales) *versus* biparentales (nucleares) podrá utilizarse para identificar casos de hibridación entre organismos y detectar diferencias en el comportamiento entre los dos sexos”.

*ADN ribosomal*: hace referencia a las secuencias de ADN que se encuentran en mitocondrias, cloroplasto y núcleo, que contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. Por lo general, son secuencias repetitivas (en tándem) formadas por subunidades altamente conservadas, y con baja sustitución, por lo cual son útiles en la comparación de taxas (Rentarías, 2007).

*ADN de cloroplasto*: es un ADN circular de doble cadena, que a diferencia del ADN nuclear, no está unido a histonas y con un peso molecular entre 120-200 kb, con intrones y exones que se considera muy conservado. Posee muy pocas secuencias repetitivas y codifica para un número limitado de proteínas (Rentarías, 2007).

Algunos factores que disminuyen la sensibilidad o incrementa el error de algunos marcadores moleculares son:

*Alelos nulos*: son alelos que no pueden ser amplificados porque presentan una mutación en la región de hibridación del cebador, por lo que el individuo es catalogado como homocigo. No son de fácil detección ya que se presentan en una frecuencia muy baja, desviando la estimación de la

frecuencia alélica de la población, sin embargo, en algunos casos pueden ser detectados por la estimación de la frecuencia de individuos homocigos por equilibrio de Hardy-Weimber (Bello, 2001).

*Homoplasia*: son alelos de igual tamaño por lo que son considerados idénticos, sin embargo presentan diferencias importantes en su estructura. Son detectables únicamente por secuenciación y representa uno de los errores más comunes en análisis por gel (Bello, 2001).

La caracterización molecular puede desempeñar un papel en dilucidar la historia, y estimar la diversidad, caracteres distintivos y estructura poblacional de los recursos zoogenéticos, siendo una herramienta útil, no solo en estudios de tipo poblacional o evolutivo, sino también en trabajos referentes a mejoras genéticas, permitiendo diseñar mejores formas de perpetuar y conservar la biodiversidad (FAO, 2010, Pérez, 1996). La Figura 5 resume y compara las características más resaltantes de algunos marcadores moleculares:

Característica	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	Isoenzimas	STS / EST
Origen	Anónimo / génica	Anónimo	Anónimo	Anónimo	Génica	Génica
El número máximo teórico de posibles loci en el análisis	Limitado por el sitio de restricción (nucleótidos) polimorfismo (decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma y el número de repeticiones simples en un genoma (decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma, y por el polimorfismo de nucleótido (decenas de miles)	Limitado por el sitio de restricción (nucleótidos) polimorfismo (decenas de miles)	Limitado por el número de genes de enzimas y ensayos histoquímicos enzimáticos disponibles (30-50)	Limitado por el número de genes expresados (10.000-30.000)
Dominio	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Alelos nulos	Raro muy raro	Ocasional a frecuente	No aplicable (presencia / ausencia tipo de detección)	No aplicable (presencia / ausencia tipo de detección)	Raro	Raro
Transferibilidad	A través de géneros	Dentro de los géneros o especies	Dentro de las especies	Dentro de las especies	A través de las familias y géneros	A través de las especies relacionadas
Reproducibilidad	Alto a muy alto	De medio a alto	Bajo a medio	De medio a alto	Muy alto	Alto
Cantidad de muestra requerida por muestra	2-10 mg de ADN	10-20 ng de DNA	2-10 ng de DNA	0.2-1 g de ADN	Varios mg de tejido	10-20 ng de DNA
Facilidad de desarrollo	Difícil	Difícil	Fácil	Moderado	Moderado	Moderado
Facilidad de ensayo	Difícil	Fácil a moderado	Fácil a moderado	De moderada a difícil	Fácil a moderado	Fácil a moderado
Automatización / multiplex	Difícil	Posible	Posible	Posible	Difícil	Posible
Genoma y el potencial de mapeo de QTL	Bueno	Bueno	Muy bueno	Muy bueno	Limitado	Bueno
Potencial de mapeo comparativo	Bueno	Limitado	Muy limitada	Muy limitada	Excelente	Buena a muy buena

Figura 5. Características de algunos marcadores moleculares. Modificado de: FAO (2010).



## 2.2. Antecedentes

Fujii (1987), estudió la predominancia de clones de *Anthopleura asiática* en el mar de Japón, y mostró que resulta importante el estudio de los ciclos de reproducción de las anémonas para responder preguntas en cuanto al rol de la reproducción, y las consecuencias de los modos de reproducción, en la estructura genotípica de una población y en la interacción entre los individuos de la misma. Indicó que el organismo en estudio es conocido porque se puede reproducir tanto de forma sexual como asexual, por lo que tuvo como objetivo el estudio de la relación entre el modo de reproducción y la presencia de especies de *A. asiática* en diez locaciones en el mar de Japón, para acceder a la estructura poblacional de la especie. Para ello evaluó los sexos de cada población, y observó que en muchas locaciones había un fuerte sesgo; encontró que en ocho de las diez locaciones el sexo predominante era masculino, encontrando también femeninos solo en dos poblaciones. Sugirió que los resultados del estudio indican que las poblaciones de *A. asiática* tienen una muy baja diversidad, y que ocho de las diez locaciones consisten en clones, mientras que las otras dos consisten en la dominancia de clones. Concluye que la reproducción asexual tiene una fuerte influencia en la estructura genética de una población, y que una población con reproducción asexual tiene una muy baja diferencia genotípica que una población con reproducción sexual ya que última involucra procesos de recombinación.

Lohuis *et al.* (1990), enfrentan un problema de taxonomía de corales blandos, debido a la variación de los caracteres morfológicos usados comúnmente para clasificar a estos organismos. Por lo cual, deciden utilizar criterios de carácter molecular, tales como comparación de secuencias de ADN e hibridación para el estudio de la filogenia y sistemática en corales blandos, a partir de ejemplares del género *Alcyonium*. Para ello, describen un método de aislamiento de ADN de alto peso molecular, enfrentándose a

problemas como la presencia de nucleasas, pigmentos y metabolitos secundarios presentes en invertebrados marinos. Utilizaron el método de southern blot para la hibridación de ADN y la comparación de secuencias, con lo cual obtuvieron diferencias en cuanto a las bandas observadas, no relacionadas directamente con el género.

Moraes y Solé (1991), se fijan en el contraste de la estructura poblacional de diferentes especies de anémonas, entre ellas los géneros *Actinia* y *Sargatia* con una alta variación genética, en comparación de los bajos niveles de variación observados en especies sub-tropicales como *Metridium*, *Anthopleura*, y *Urticina*, relacionados con el potencial de dispersión y el balance entre la reproducción sexual y asexual. Tuvieron como objetivo estimar parámetros genéticos básicos de tres poblaciones de *Bunodosoma caissarum* y la relación con la alta densidad poblacional, en función de su dinámica poblacional, y basados en su modo de reproducción (principalmente sexual). Para ello, realizaron geles de electroforesis en los que observaron patrones de isoenzimas bien conservados para 19 loci, y además, en algunos individuos observaron la presencia de una única banda o un par de bandas que interpretaron como la expresión de un locus bi-alélico que codifica para carotenoproteínas comunes de invertebrados marinos. De los 47 loci estudiados, encontraron significancia en 3 de ellos ( $0,01 < p < 0,05$ ) sugiriendo una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg como resultado de selección o fenómeno estocástico; sin embargo, la significancia de las 47 muestras fue considerada normal. Obtuvieron altos niveles de heterocigosidad (0,284-0,299) característico de organismos marinos de zonas templadas, y un bajo nivel de diferencia genética (1-0,954) indicando una alta homogeneidad poblacional.

Ting y Geller (2000), se centran en el problema de la introducción de especies en los ambientes marino costeros, específicamente de la especie *Diadumene ineata*, anémona originaria de Asia e introducida en Norte

América, y cuya reproducción es principalmente asexual. Sobre la base de esto plantean que la estructura poblacional de esta especie es policlonal, y para probarlo, colectaron individuos de diferentes poblaciones de Asia y Norte América. Emplearon marcadores moleculares, específicamente ITS, para amplificar genes nucleares de ARN ribosomal mediante PCR, examinados por secuencias de variación de ADN usando polimorfismos de cadenas de conformación simples (SSCP). Obtuvieron 56 patrones de bandas electroforéticas en 268 individuos consideradas como diferentes genotipos y solo cuatro genotipos fueron comunes en más de una población, además observaron que el rango de genotipos para una población fue uno de treinta y que seis de las poblaciones en estudio eran dominadas por un simple genotipo y solo un ejemplar resultó monoclonal. Finalmente, basados en estudios anteriores, concluyeron que hay un cambio rápido en la frecuencia genotípica para esta especie y que los diferentes genotipos son de principal importancia en la propagación y colonización de poblaciones de especies introducidas.

Shearer *et al.* (2002), argumentan que el genoma mitocondrial animal posee ciertas características que lo hacen ideal para el análisis de genética de poblaciones, tales como altas tasas de sustitución y ocurrencia de polimorfismos, siendo los genes mitocondriales más empleados el citocromo subunidad c y b oxidasa. Pero a pesar de que son ampliamente utilizados en el estudio de genética de poblaciones, presentan bajos niveles de divergencia en especies antozoas, debido a que las tasas de evolución de ADN mitocondrial en este grupo difieren al de otras especies animales, como resultado de una baja acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. Reportan que en invertebrados las tasas de sustitución nucleotídica son similares tanto en el ADN nuclear y mitocondrial; sin embargo, estudios con representantes de la clase han demostrado que la tasa de evolución en el ADN nuclear, tanto en regiones codificantes como no codificantes, es mayor

específicamente en las regiones ITS-5,8S-ITS2, que expresan altos niveles de polimorfismos intra e interespecíficos. Finalmente, concluyen que debido a que la evolución en este grupo es extremadamente baja es casi imposible estimar datos de separación a nivel de evolución y que los marcadores genéticos mitocondriales para estudios de filogenia en y entre algunas especies antozoos no son apropiados.

Pearson *et al.* (2002), buscan evaluar la flexibilidad de reproducción de *Nemastotella vectensis* en ambientes sometidos a cambios extremos de condiciones ambientales (turbidez, salinidad y temperatura). Señalan que el tipo de reproducción de estos organismos en condiciones extremas es incierta; sin embargo, basados en trabajos anteriores, sugieren que en muchos casos se generan “genotipos con propósitos generales” como plasticidad adaptativa en ambientes altamente variables. Además, explican que cuando una especie coloniza un medioambiente limitado con baja diversidad los individuos pueden sufrir una diversificación fenotípica inducida por la expansión del nicho, en cuyo caso la reproducción clonal es eficiente; mientras que, en ambientes de condiciones ambientales extremas, la mejor estrategia de reproducción es la sexual. Para evaluar la variación genética de diferentes poblaciones de *N. vectensis* utilizaron RAPD's, y no obtuvieron diferencia significativa de variación genética entre las diferentes poblaciones. Sin embargo, obtuvieron una alta significancia ( $p < 0.0001$ ) entre grupos de una misma población. Sobre la base de los resultados sugieren que *N. vectensis* tiene una reproducción principalmente asexual, que presenta reproducción sexual en áreas geográficamente limitadas, y destacan la importancia de “genotipos con propósitos generales” para la prevalencia de la especie en condiciones ambientales no favorables, abriendo paso a estrategias de conservación para esta especie.

Gomes *et al.* (2003), exponen las consecuencias ecológicas de la reproducción asexual, entre ellas la exclusión de la competencia de

reproducción sexual por la producción de colonos en áreas limitadas geográficamente. A fin de entender la reproducción asexual en condiciones naturales, optan por ejemplares de *Anthopleura krebsi*, cuyo organismo presumen que presenta netamente reproducción asexual, dos morfotipos diferentes, y diferentes conductas de agresión entre los distintos morfotipos. Para corroborar el tipo de reproducción, usaron aloenzimas como marcadores moleculares y digestión con enzimas de restricción, y observaron altos niveles de variación genética en ambos morfotipos; sin embargo, no hubo desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los loci analizados, es decir, no había diferencia significativa a nivel molecular entre ambos morfotipos. Esto demostró *A. krebsi* presenta reproducción asexual y una elevada similaridad genética entre ambos morfotipos, por lo que descartan el color como una característica relevante a nivel taxonómico, y se lo atribuyen la plasticidad fenotípica o polimorfismos intraespecíficos.

Acuña *et al.* (2007), buscaron dilucidar el problema de identificación de los miembros de la familia Actiniidae, a partir de ejemplares de *Aulactinia reynaudi* y *Aulactinia marplatensis*, como las mejores representantes de dicha familia en zonas costeras de sustrato duro, debido al grado de similitud en cuanto a morfología, ecología y biología reproductiva, siendo la única característica distintiva entre ambas el color y la longitud de los tentáculos. Para ello, hicieron uso de caracteres morfológicos externos y caracteres moleculares, amplificando regiones conservadas de ADN nuclear ribosomal (ITS 1 y 2). Obtuvieron una alta similaridad entre ambas especies a nivel morfológico, lo que sugiere que ambas especies deberían ser consideradas una misma. En cuanto a la data molecular, construyeron árboles filogenéticos con los resultados para ITS y observaron que los individuos de ambas especies no se ubican en dos grupos de especies específicos. Sin embargo, el clado indicó que hay pequeñas variaciones entre ambas especies, por lo

que sugieren que la región ITS acumula variaciones dependiendo del patrón de reproducción (reproducción sexual específicamente) que permiten distinguir claramente entre diferentes especies de un mismo género.

Reitzel *et al.* (2007), abordan el tema de la introducción de especies y sus efectos ecológicos sobre el ecosistema local, tanto por el decremento de la diversidad, como por la reconfiguración del hábitat. Hacen énfasis en el tipo de reproducción como una de las principales causas en el proceso de colonización y desplazamiento de las especies. Recurren al análisis de las bases moleculares de diferentes poblaciones, separadas por grandes distancias, de la anémona *Nemastostella vectensis*, con el objetivo de conocer su estructura poblacional a partir del modo de reproducción, y con ello formular un plan de conservación para especies de distribución cosmopolita. Emplearon AFLP y ADN mitocondrial, específicamente la subunidad I de la citocromo c oxidasa, con lo cual identificaron 156 bandas diferentes (de las cuales 153 eran polimorfismos) que no obtuvieron valores significativos de heterocigosidad y polimorfismo. Por ello, concluyeron que cada una de las poblaciones en estudio están dominadas por un único genotipo. Sin embargo, había pequeñas diferencias entre las poblaciones que revelan la baja tasa de evolución de estos organismos, y la alta capacidad de reproducción asexual, esto último característico de poblaciones introducidas. Finalmente, sugieren que en los esfuerzos de mantener la especie y en forma general el hábitat, es necesario entender la viabilidad de las poblaciones locales y la distribución geográfica en relación con la variabilidad genética.

Chomsky *et al.* (2009), reportan que la genética de poblaciones de muchos cnidarios ha sido pobremente estudiada, en parte debido a lo complejo de sus modos de reproducción e hibridación entre especies estrechamente relacionadas. En tal sentido, buscaron elucidar la variación genética entre poblaciones de anémonas de *Actinia equina*, sometidas a

diferentes condiciones medioambientales, principalmente de temperatura. Para ello, usaron la amplificación de fragmentos que sirven como marcadores de polimorfismo (AFLP) para dicha especie, reportaron sobre el modo de reproducción de estas poblaciones y compararon los niveles de especiación, polimorfismo y diversidad genética, entre las poblaciones de la zona más cálida (aprox. 30 °C) y de la zona más fría (aprox. 12 °C). Analizaron la variabilidad sobre las bases biológicas, condiciones medio ambientales y los factores que favorecen el tipo de reproducción. El análisis de las distancias genéticas reveló que no había una diferencia significativa en cuanto a polimorfismo en las zonas cálidas, pero obtuvieron valores significativos para reproducción sexual y diversidad genética en la población de zona fría, y concluyeron que la alta variabilidad es una respuesta biológica ante condiciones medioambientales extremas y otros factores que favorecen la reproducción sexual, generando altos niveles de heterogeneidad genética.

Palacios (2009), explica que en las zonas submareales, los factores físicos más importantes que intervienen en el ciclo reproductivo de algunos animales son el oleaje y la temperatura, y que la estabilidad de la población en estas zonas depende de su relación con los factores físicos, químicos y biológicos, por lo que especies principalmente sésiles generan agrupaciones que dejan espacios libres susceptible de colonización por larvas o juveniles. En tal sentido, la estructura final de la población estará compuesta por organismos de diferentes edades e incluso diferentes especies. Expone la necesidad de los estudios de caracterización de las especies menos estudiadas en los parques nacionales, por lo que busca caracterizar ciertos aspectos ecológicos de *S. helianthus* en el Parque Nacional San Esteban. Dentro de los parámetros evaluados se encuentra el porcentaje de cobertura, en el cual obtuvo que la población de *S. helianthus* en la plataforma no se distribuye en forma homogénea, sino que presenta cambios de densidad generalmente muy rápidos en áreas relativamente pequeñas. Los bordes son

los de menor densidad y corresponden a la zona con mayor dificultad de fijación, mientras que la mayor cobertura se encontró hacia el centro con sustrato duro; la zona de adelante y posterior mostraron coberturas discontinuas. En cuanto a las tallas, la mayor parte del año se presentaron las mayores en el centro (entre 100 y 260 mm), mientras que las menores se encontraron en los bordes (<99 mm); se presentaron fluctuaciones a mediados de mayo con un incremento del diámetro en los sectores del Este y un descenso en los del centro, mientras que en junio se presentó una homogeneización de las tallas en todo el parche, en Agosto hubo un descenso, siendo la máxima 122 mm de diámetro, correspondiente a los individuos más viejos ubicados en el centro, y a partir de septiembre hubo una sectorización nuevamente de las tallas hasta noviembre, cuando se repite el ciclo nuevamente. Finalmente, a partir de esto, concluye que la población de *S. helianthus* aparentemente presenta una reproducción asexual con períodos reproductivos de Marzo a Mayo y de Noviembre a Diciembre.

Bucklin *et al.* (2010), reconocieron la importancia del ADN en la identificación de especies, y los usos de las secuencias del material genético como el primordial diagnóstico para identificar y clasificar especies. Resaltan el hecho de que los estudios en biología molecular permiten detectar novedosas secuencias en ejemplares de una especie, lo cual permite dar un diagnóstico inequívoco que requiere la secuencia de un ADN en particular, asociado con la secuencia de un grupo de organismos. Destacan que los genes más usados frecuentemente para metazoos es el citocromo c oxidasa subunidad I (COXI), ya que tiene regiones conservadas que son usualmente utilizadas en el diseño de primers conservados de PCR y exhiben diferencias genéticas intra e interespecíficas. Sin embargo, explican que, aunque es ampliamente usado para metazoos no es idóneo para algunos cnidarios, entre ellos corales, anémonas y esponjas, ya que la tasa de evolución del



ADN mitocondrial en estos animales es entre 10 y 20 veces menor que los otros metazoos, y usualmente es insuficiente para observar una diferencia real entre especies estrechamente relacionadas. La baja divergencia de COXI para cnidarios, indican la necesidad de optar por alternativas de marcadores moleculares, o secuencias de ADN, entre estas alternativas sugieren el uso de los espaciadores de transcripción interna (ITS) del ADN nuclear ribosomal, que son genes que permiten observar variabilidad intra e interespecífica de organismos marinos, cuando el COXI causa problemas.

Daly *et al.* (2010), compararon los marcadores comúnmente usados en hexacoralia (marcadores nucleares y mitocondriales), evaluados con respecto a los ejemplares generales de mayor linaje (aproximadamente a nivel de familia) de Actiniaria, especialmente miembros de la familia Hormathiidae que no es una especie monofilética. Tomaron en cuenta la baja tasa de evolución molecular, reportada anteriormente por otros autores para estos organismos, y propiedades generales de los marcadores moleculares. Emplearon los marcadores 12S, 16S, 18S y 28S, y observaron que todos los hexacoralias son similares en cuanto a marcadores ribosomales, y en cuanto al rol del marcador por taxón; además, indicaron que estos marcadores permiten revelar tasas de evolución. Reportaron que el 12S es el marcador más robusto para el estudio por clados de Actiniaria, mientras que el 16S es el menos efectivo para resolver problemas de relación entre grupos de la misma especie en Actiniaria. Por otra parte, reportan que el 28S aunque ha sido pobremente estudiado, es ideal para estudios de diversidad de actinarios, y concluyen que aunque no se ha estudiado el potencial de este marcador para Actinarias, los resultados sugieren que pueden ser ampliamente utilizados para establecer relaciones en cuanto a variación genética.

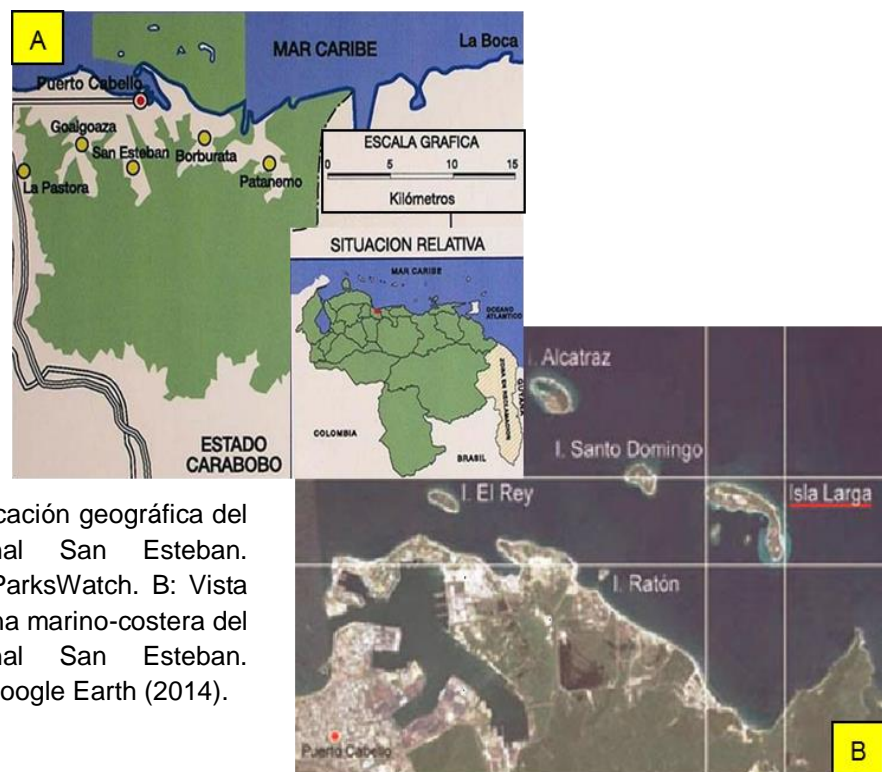
Bocharova (2015), discute sobre la estructura poblacional de *Aulactinia stella* sobre la base de hallazgos que parecen sugerir que la

población está conformada sólo por individuos femeninos e individuos sin gameto en el Mediterráneo y Rusia. Por ello, estudia la misma especie en el Océano Pacífico, en donde está representada por poblaciones de ambos sexos. Con el fin de observar la relación entre individuos adultos y juveniles, hace uso de los análisis moleculares de ADN nuclear (ITS-1 e ITS-2) y ADN mitocondrial (16S, 12S y COXIII). A partir de los ITS obtuvo cuatro haplotipos no heterocigos entre 55 adultos y 74 juveniles de los mares de Rusia y el Mediterráneo, y sin diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de adultos y juveniles; por otra parte, en el Océano Pacífico los ITS revelaron seis haplotipos y 20 individuos heterocigos. Los marcadores de ADN mitocondrial, permitieron observar cinco haplotipos para los individuos de ambas poblaciones y el 16S una diferencia de 62 pb. Los resultados sugieren que en los mares de Rusia y el Mediterráneo las poblaciones consisten de cuatro clones homocigos, mientras que en el Océano Pacífico por la presencia de individuos femeninos y masculinos la población se compone individuos heterocigos, lo que a su vez confirma la reproducción sexual de esta especie, y concluye que el tipo de reproducción y la composición sexual depende de las características del hábitat, siendo más común la reproducción asexual en el litoral.

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Área de estudio

El Parque Nacional se encuentra ubicado en la región central de la cordillera de la costa entre los estados Carabobo y Aragua, con una elevación sobre el nivel del mar de 1.830 m.s.n.m y un área de 44.500 Ha, que comprende una gran variedad de ecosistemas (Figura 6A). La zona marino-costera del parque incluye los espacios ubicados entre la costa Noreste de Puerto Cabello, que comprende islas con arrecifes coralinos (Isla del Rey, Alcatraz, Ratón, Santo Domingo e Isla Larga) y Punta Cambiadores en el límite Este de San Esteban y Oeste del Parque Nacional Henri Pittier (Figura 6B) (Barreto, 2002; Henríquez y Palacios, 2008).



### 3.2. Colecta

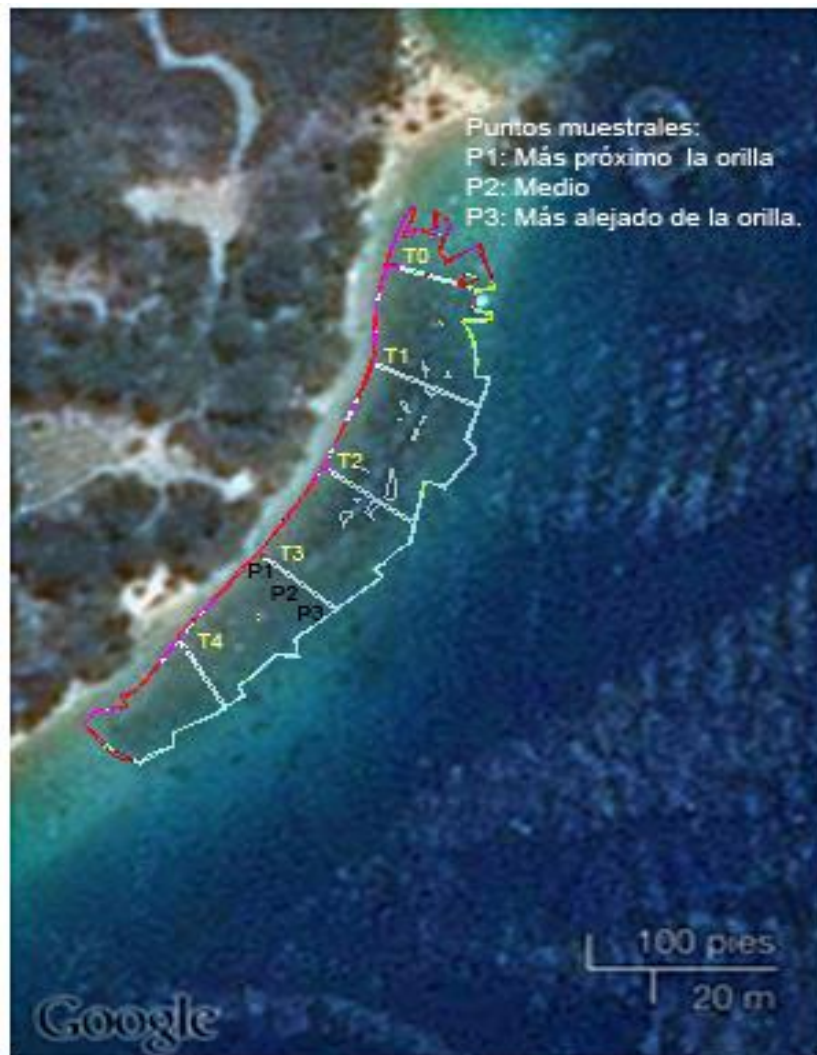
La colecta se realizó en la plataforma de un arrecife franjeante, ubicado en la zona Suroeste de Isla Larga, zona insular del Parque Nacional San Esteban (Puerto Cabello, Estado Carabobo) (Figura 7). Se realizó un muestreo sistemático, con transectas equidistantes perpendiculares a la costa, de 10 m de distancia entre sí, cubriendo un total de 40 m lineales (medida del agrupamiento de anémonas en la plataforma). Los individuos se colectaron aleatoriamente en los puntos de intercepción entre cada transecta próximo, medio y distante a la costa (Figura 8), 1 o 2 individuos por punto para un total de 21 individuos colectados en el parche. Adicionalmente, se colectaron individuos fuera del agrupamiento del extremo este (RE) y oeste (RO). Los individuos se procesaron *in situ*, cortando el disco podal y preservándolo en etanol absoluto frío. Se identificaron según la transecta y la distancia a la costa como:

P: Próximo a la costa; M: Medio. D: Distal a la costa; N: Transecta correspondiente a los N metros. Ej: 0d indica 0 metros de la región distal a la costa.

Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la extracción del material genético.



**Figura 7.** Ubicación geográfica del arrecife franjeante en el que fueron colectados los individuos de la especie de anémona *S. helianthus* (10°29'21.8" Norte y 67°56'58,4" Oeste). Fuente: Google Earth (Versión 2014). Consultado el: 2/9/2014



**Figura 8.** Vista satelital del parche y esquema gráfico del método de muestreo. Transectas (denotadas como T) equidistantes a 10 m. con tres puntos de muestreo (denotados como P) cada una, desde el punto más cercano a la orilla hasta el lejano. Modificado de: Google Earth (2014).

### 3.3. Extracción del ADN

La extracción del material genético se estandarizó, mediante pruebas con diferentes protocolos, a fin de seleccionar los mejores resultados para la posterior amplificación de los fragmentos ITS. A continuación se describen los protocolos empleados, los cuales se basan en las metodologías descrita por Dellacort (1994) y Díaz *et al.* (2013):

**Protocolos 1 y 2:** se cortaron 0,6 g de tejido del disco podal de *S. helianthus*, y se homogeneizaron en 2 mL de tampón de lisis a 4°C. Para estandarizar el tampón de lisis empleado se usó un Tampón de Lisis 1 (TL1), cuya composición es: NaCl 5 M y pH 7.2; y un Tampón de Lisis 2 (TL2), cuya composición es: Tris 25 mM, EDTA 25 mM, sacarosa al 10% p/v, pH 7.2 y Lisozima 10 mg/mL. Luego, se centrifugó el homogenato durante 5 min a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 200 µL de tampón de lisis a 4°C y se incubó durante 10 min a 4°C.

A partir de este punto, se empleó un tratamiento diferente para las muestras procesadas con cada uno de los tipos de tampón de lisis:

- **Muestras procesadas con TL1:** transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 300 µL de CTAB 10% m/v y NaCl 0.7 M a 4°C, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 60 min, hasta no observar interfase. Se separó el sobrenadante, se le añadieron 400 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:11) a 4°C, y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 60 min. Finalmente, se separó la fase acuosa obtenida y se reservó para realizar el análisis electroforético
- **Muestras procesadas con TL2:** transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 300 µL de SDS 1% v/v y NaOH 0.2 M a 4°C, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se añadieron 400 µL de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. En este punto, y debido a la heterogeneidad que presentaron las muestras (cúmulo blanquecino en un líquido transparente), también se estandarizó el tratamiento posterior de la siguiente forma:
  - *Tratamiento 1 (M1):* transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 2000 rpm por 5 min, luego se tomaron 100 µL del líquido

transparente (sobrenadante), y se le añadieron 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1). Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm durante 60 min, y se separó la fase acuosa para realizar el análisis electroforético.

- *Tratamiento 2 (M2)*: transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 100  $\mu$ L de muestra completa (que se intentó mezclar mediante resuspensión) y se le añadieron 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1). Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm durante 60 min, y se separó la fase acuosa para realizar el análisis electroforético.
- *Blanco para M1 (BM1)*: transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, y luego se separó el líquido transparente, el cual se reservó para realizar el análisis electroforético.
- *Blanco para M2 (BM2)*: muestra completa (que se intentó mezclar mediante resuspensión) para realizar el análisis electroforético.

Todas las muestras procesadas fueron analizadas en gel de agarosa (AGAROSE D-1 LE GQT X 100G) al 0.7% p/v, y la corrida electroforética se realizó en una cámara modelo FB 1000 a 95 v.

**Protocolo 3:** se adquirió un Kit de extracción de ADN (FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit) de la casa comercial FAVORGEN, se siguieron las instrucciones del fabricante para muestras frescas.

**Protocolo 4:** la extracción se realizó modificando el protocolo publicado por Pinto *et al.* (2000). Se cortaron piezas de 1 cm<sup>2</sup> del disco podal (aprox. 0.3 g), y se incubaron a 37°C por 2 h a fin de retirar el etanol excedente. Posteriormente, el tejido fue macerado sumergiéndolo en nitrógeno líquido por lapsos de tiempo de 10 seg., hasta que se obtuvo una disgregación total del tejido. Inmediatamente se le añadieron 400  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.25 M pH 8 y SDS 2% p/v), y RNAsa a una concentración final de 0.06 mg/mL, y luego se incubó a 37°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió proteinasa K a una concentración final de

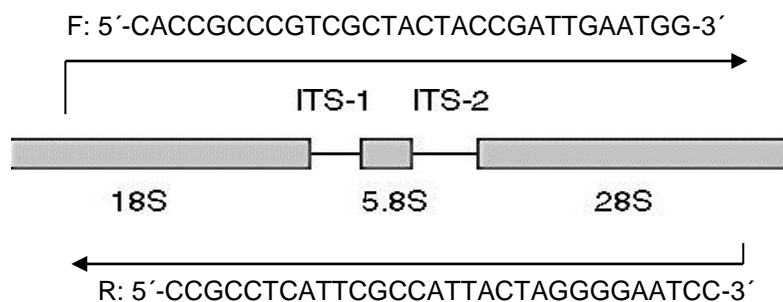


0.5 mg/mL y se incubó en agitación por 92 h a 37°C. Posterior a la incubación, se añadió un volumen igual al volumen total de la solución (420 µL) de fenol, se mezcló durante 15 min. y se centrifugó a 6500 rpm por 4 min. El sobrenadante obtenido (200 µL) se transfirió a un tubo estéril y se repitió el paso anterior. Nuevamente el sobrenadante fue trasvasado y se añadió el mismo volumen (al volumen total del sobrenadante) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se mezcló y centrifugó como en los pasos anteriores. Una vez finalizado los lavados con fenol y cloroformo-alcohol isoamílico, se transfirió el sobrenadante a un tubo con 10 µL de NaCl 6 M, se agitó suavemente y se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se centrifugó a 13000 rpm por 4 min., se descartó el sobrenadante, y se lavó el precipitado con etanol 70% v/v. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente con el tubo invertido por 24 h.

Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 500 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 M), y se incubó a 37°C por 48 h, hasta la completa solubilización del precipitado. Los resultados fueron observados en geles de agarosa (AGAROSE D-1 LE GQT X 100G) al 0.8% m/v, y la corrida electroforética se realizó en una cámara modelo FB 1000 a 95 v. El peso molecular (PM) del ADN se estimó a partir del PM estándar de 1 Kb DNA Ladder de la casa comercial Promega.

#### **3.4. Selección de cebadores**

Se seleccionaron los cebadores para 18S ITS-1 e ITS-2 28S Forward y Reverse respectivamente, modificados a partir de los reportados por Acuña *et al.* (2007), los cuales se muestran en la Figura 9. Ambos cebadores fueron probados en la herramienta Primer BLAST disponible en NCBI en línea.



**Figura 9.** Región ITS 1 e ITS 2 y Primers sintetizados.

### 3.5. Amplificación de los fragmentos a partir de IST1-5.8S-IST2

Se realizó la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 mediante PCR de cada uno de los individuos, según lo establecido por Pinto *et al.* (2000). El ADN empleado fue el obtenido mediante el protocolo 4, y se amplificó en un volumen total de 30  $\mu$ L, y la composición de la PCR se describe en la Tabla I. Las condiciones de la PCR se establecieron de acuerdo a Acuña *et al.* (2007), y se indican en la Tabla II.

**Tabla I.** Componentes para la reacción de PCR.

Componentes	C <sub>i</sub>	C <sub>f</sub>
ADN	5 $\mu$ g/mL	1 ng/mL
Green Go <i>Taq</i> Flexi buffer (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9 y Tritón X-100 al 0.1% v/v)	5X	10 mM
dNTP's	10 mM	0.1 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM
Oligonucleótido Forward 5'-CACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGG-3'	100 pmol	5 pmol
Oligonucleótido Reverse 5'-CCGCCTCATTGCGCCATTACTAGGGGAATCC-3'	100 pmol	5 pmol
<i>Taq</i> Polimerasa		1,5 U

**Tabla II.** Condiciones de la PCR.

<b>Ciclo 1:</b> 2 min.	94°C	Desnaturalización inicial
<b>Ciclo 2 – 35:</b> 30 seg. 1 min. 5 min.	94°C 50°C 72°C	Desnaturalización Hibridación Elongación
<b>Ciclo 36:</b> 5 min.	72°C	Elongación adicional

### **3.6. Separación de los fragmentos amplificados**

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v, teñido en la fase de preparación del gel con 1  $\mu$ L de Bromuro de Etidio concentrado, y como buffer de corrida se utilizó TBE 1X. La corrida electroforética en una cámara modelo FB 1000 a 95 v. Finalmente, el patrón de bandas fue visualizado en un transiluminador UV y fotografiado para la posterior comparación de los resultados de cada individuo. El peso molecular aproximado de las bandas presentadas por cada individuo se determinó a partir de una curva de calibración realizada a partir de los estándares de peso molecular del marcador 100 pb DNA Ladder de la casa Promega, que van de 100 a 1500 pb, e incluyendo como estándar también al Primer 18S (24 pb).

## **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Resultados**

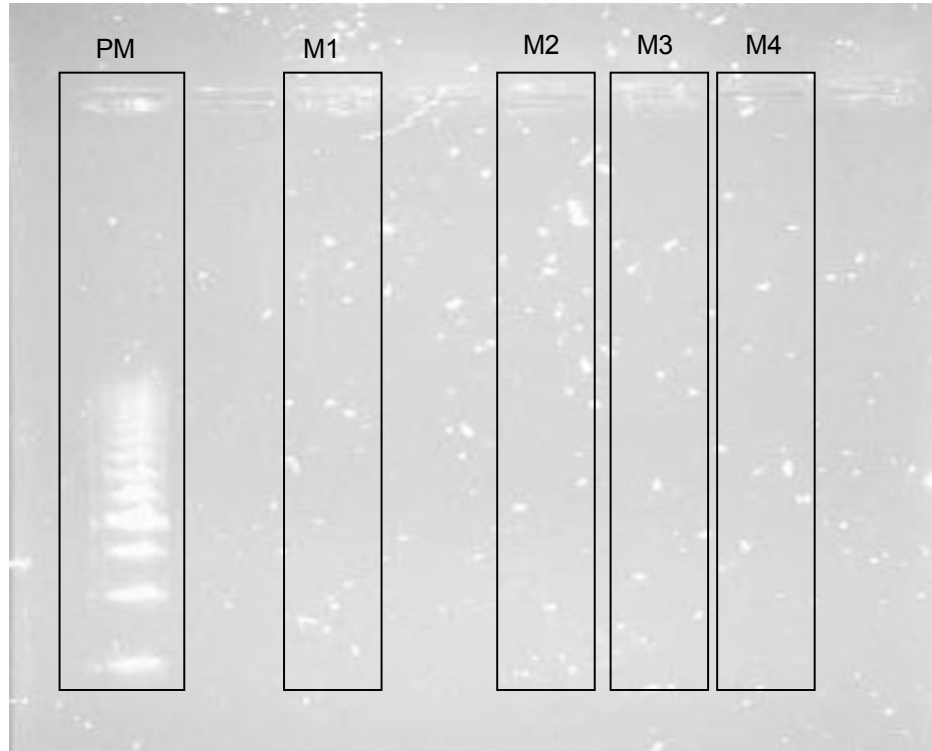
#### **4.1.1. Extracción del ADN**

Aunque existen diferentes técnicas para la extracción del ADN, bajo el uso de los mismos principios y fundamentos, suele ser necesario estandarizar los materiales y procedimientos empleados, a fin de adecuarlos al tipo de tejido que se pretende utilizar. Se muestran a continuación los resultados de los diferentes protocolos para la estandarización de la extracción del material genético de *S. helianthus*:

- **Extracción de ADN con TL1 (Protocolo 1)**

En el protocolo de extracción con TL1 se utilizaron altas concentraciones de NaCl (5 M) con el objetivo de prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del ADN, pudiendo de igual modo, inhibir la actividad de algunas enzimas como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción. En este protocolo, se usó además Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) como detergente iónico, con el fin de solubilizar proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad significativa de ADN quede retenida en los desechos o restos celulares. El CTAB forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino, de ese modo, los polisacáridos, los compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavado (Velasco, 2005; Somma, 2001). A pesar de ello, no resultó ser

eficiente en el proceso de extracción ya que, como se observa en la Figura 10 no se obtuvo ADN por este método.

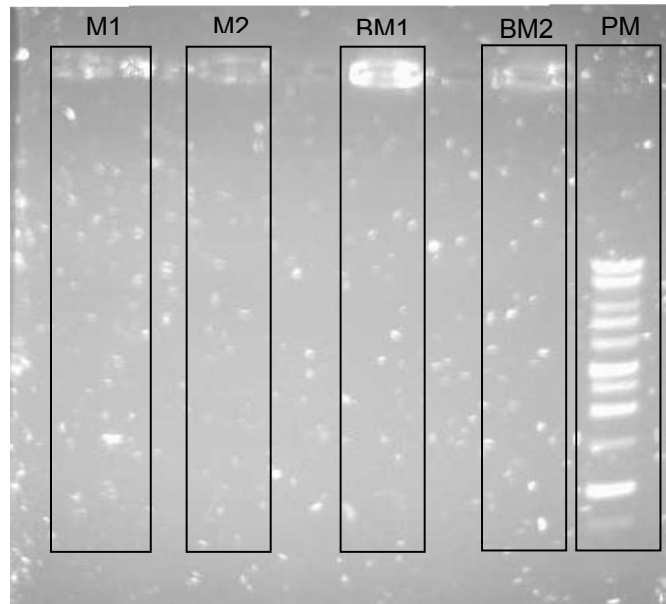


**Figura 10.** Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL1. PM: Peso Molecular. M1: Muestra del ejemplar 1. M2: Muestra del ejemplar 2. M3: Muestra del ejemplar 3. M4: Muestra del ejemplar 4.

- **Extracción de ADN con TL2 (Protocolo 2)**

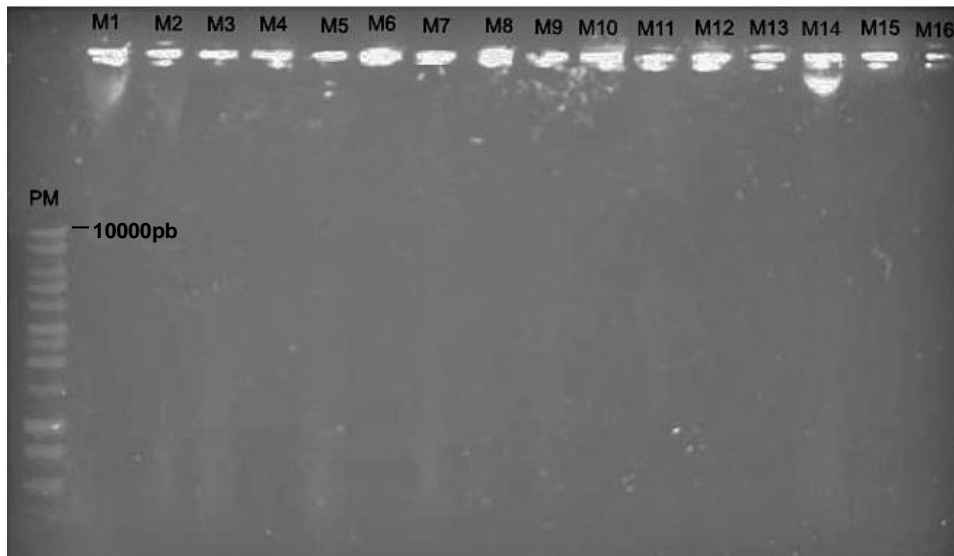
En la Figura 11, se observa el resultado de la extracción de ADN con TL2. La fluorescencia observada en los carriles corresponde al material genético, y al comparar M1 y M2 con sus respectivos blancos, se observa que en estos últimos hay una mayor intensidad de luz, correspondiente a la presencia de ADN y su concentración. Probablemente, esto pudo deberse a la dilución de las muestras durante el tratamiento con fenol-cloroformo. Además, al ser ADN cromosómico gran parte de este tiende a precipitar con la fracción protéica mediante el uso de acetato de amonio (Newsletter

Microbial, 2009), lo que se observó en las muestras como un acumulación blanquecina, que al ser de consistencia mucilaginosa y espesa queda en el bolsillo del carril y no migra en el gel.



**Figura 11.** Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL2. PM: Peso Molecular; M1: tratamiento 1; M2: tratamiento 2; BM1: blanco para el tratamiento 1; BM2: blanco para el tratamiento 2.

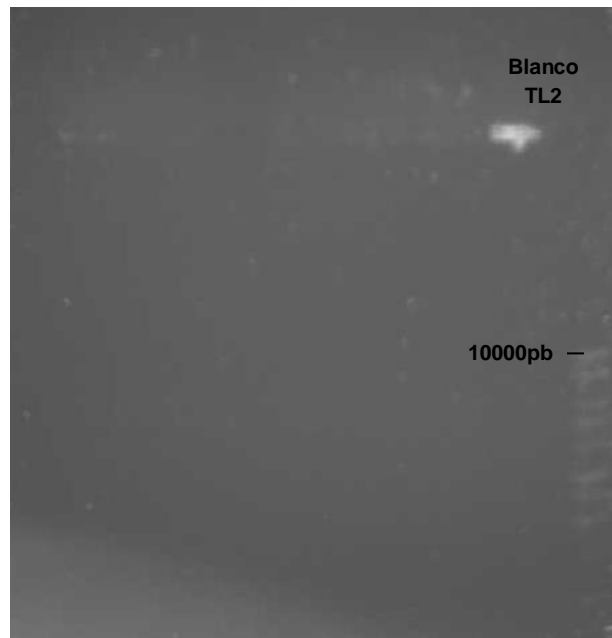
En vista de los resultados obtenidos, con este protocolo, se probó nuevamente con diferentes muestras a fin de replicar y corroborar la calidad de los resultados anteriores, y estos resultados se muestran en la Figura 12. En la imagen, se puede apreciar la intensidad de luz en cada uno de los bolsillos de los carriles, y una leve migración en algunos de ellos, lo que sugiere que hay material genético. Sin embargo, los resultados no son satisfactorios en cantidad y calidad para la posterior amplificación de la región ITS por PCR.



**Figura 12.** Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con TL2. PM: Peso Molecular; M1-16: Muestras de 16 individuos.

- **Extracción de ADN con el Kit comercial (Protocolo 3)**

En la Figura 13, se observan los resultados obtenidos con el kit de extracción de ADN de FAVORGEN. Se puede apreciar, que a diferencia del protocolo de extracción con TL2, en este no se observa ninguna evidencia de material genético en ningún carril, razón que se puede atribuir a la naturaleza del tejido. Al ser mucilaginoso este puede tapar la membrana del filtro de las columnas que trae el kit, evitando con ello que percole el material genético.

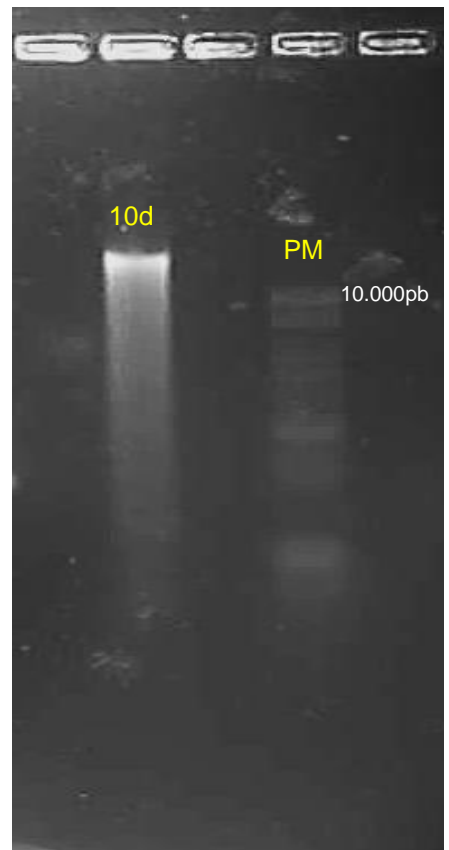
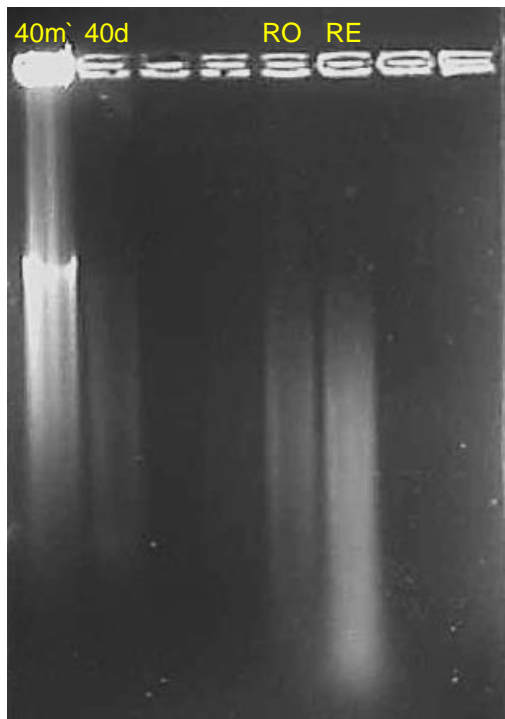
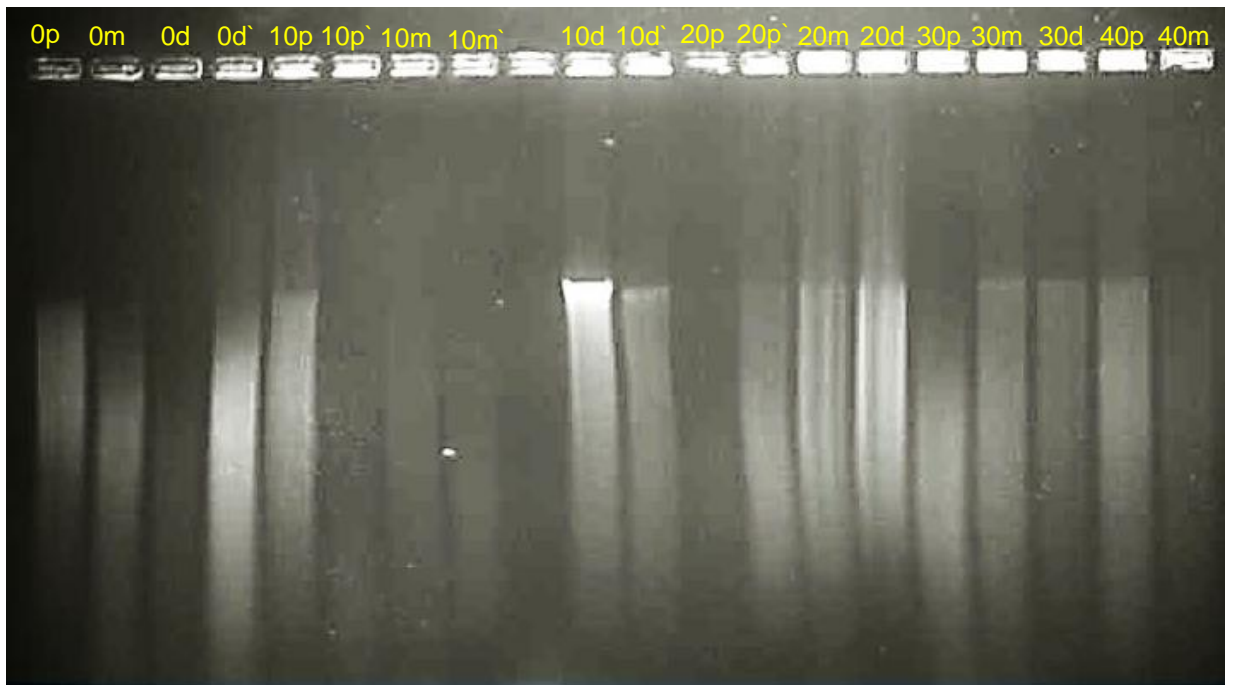


**Figura 13.** Análisis electroforético del proceso de extracción de ADN en las muestras procesadas con el kit de extracción de ADN de FAVORGEN.

- **Extracción de ADN con Proteinasa K (Protocolo 4)**

En la Figura 14, se observan los resultados del uso de este protocolo para la extracción de ADN del tejido del disco podal de *S. helianthus*, que resultó ser la más efectiva ya que se evidenció un ADN íntegro, de peso molecular mayor a 10,000 pb, el cual es más pequeño que el tamaño de ADN estimado para otras especies pertenecientes al mismo orden tales como *Nemastotella vectensis* y *Exaiptasia pallida*, cuyos genomas son de 356,61 y 256,13 MB, respectivamente.

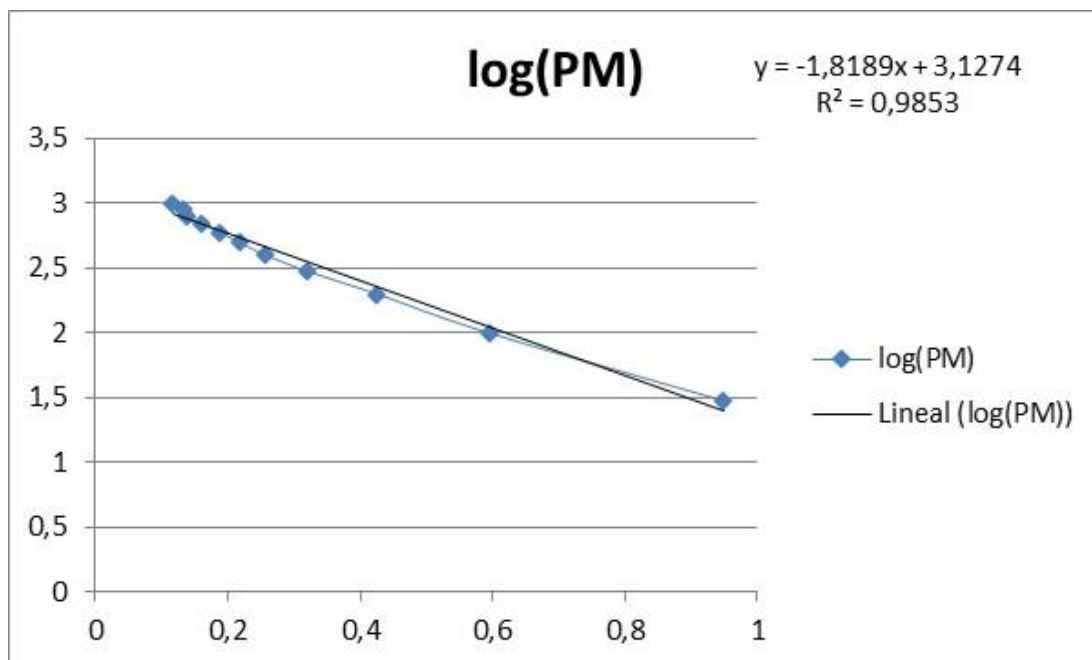




**Figura 14.** Resultado de la extracción de ADN a partir de tejido de disco podal de *S. helianthus*. Gel de agarosa al 0,8% p/v que muestra bandas correspondientes al ADN fragmentado de peso molecular mayor a 10.000 pb. De los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; 0, 10, 20, 30 y 40m; 10 y 40m'; 0, 10, 20, 30 y 40d; 0 y 10d'; RO y RE.

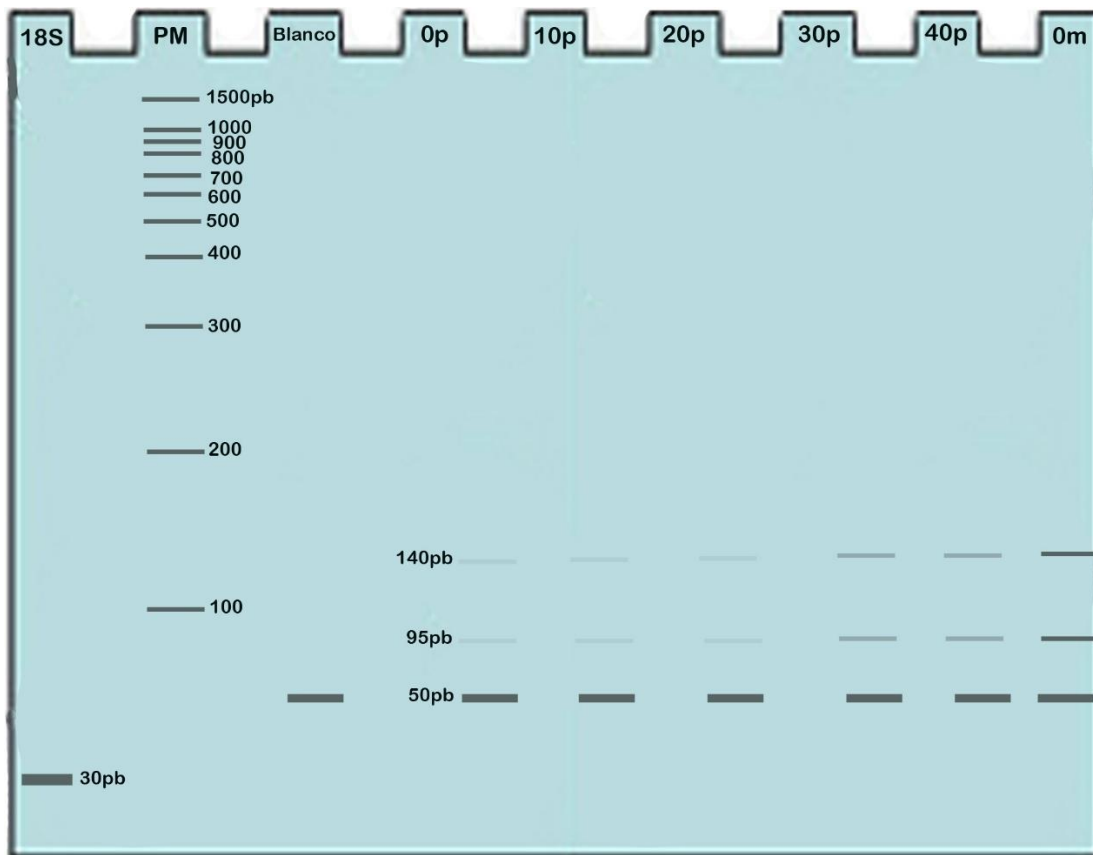
#### 4.1.2. Amplificación por PCR

Los primers utilizados amplifican secuencias con un peso molecular entre 29 y 58 pb para la región correspondiente a 28S, y entre 629 y 658 pb para la región correspondiente a 18S. En función de ello, se puede suponer que los productos de la amplificación corresponden a la región ITS1-5.8S-ITS2. Con los estándares de peso molecular empleados, tanto el marcador DNA Ladder, que va de 100 a 1500 pb, como el Primer 18S de 24 pb, se logró realizar una curva de calibración en cuyo rango logran entrar todas las bandas que aparecen en los patrones de cada individuo. El ajuste lineal obtenido para determinar el peso molecular aproximado de las bandas, resultó altamente significativo, así como el coeficiente de correlación ( $R=0.98$ ), indicando un ajuste elevado de las observaciones a la tendencia lineal, al tiempo que el modelo rectilíneo explicó el 98% de la varianza total del sistema, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9853 (Figura 15).

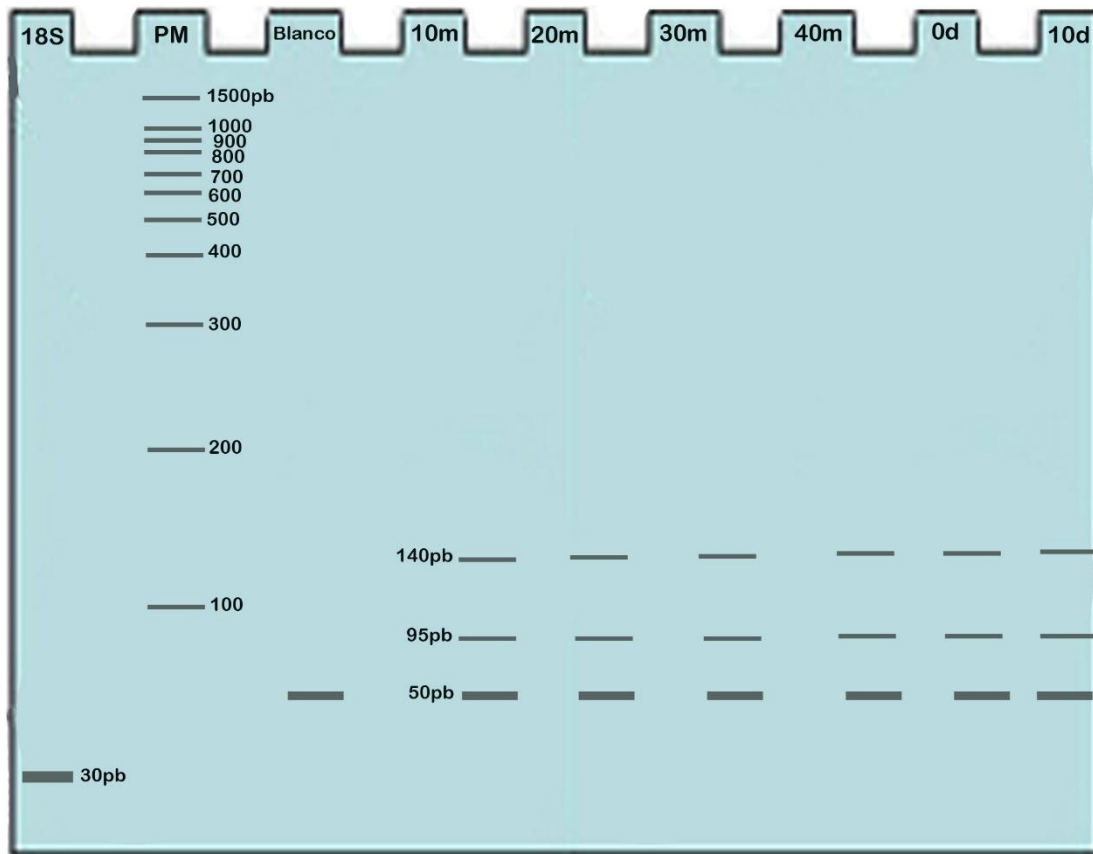


**Figura 15.** Curva de calibración con los estándares de peso molecular empleado para la determinación del peso de las bandas en las corridas electroforéticas.

Una vez determinado el peso aproximado de cada una de las bandas presentes en el patrón de cada individuo, se realizó una representación gráfica, la cual se muestra en las Figuras 16, 17 y 18 (en el apéndice se encuentran las imágenes de los geles correspondientes). En todas se puede evidenciar que la mayoría de los individuos comparten un patrón de dos bandas de peso molecular de 95 y 140 pb aproximadamente, respecto a la región amplificada. Se descarta la banda de aproximadamente 50 pb del patrón de cada individuo, debido a que el blanco evidencia que corresponde a dímeros de primer.

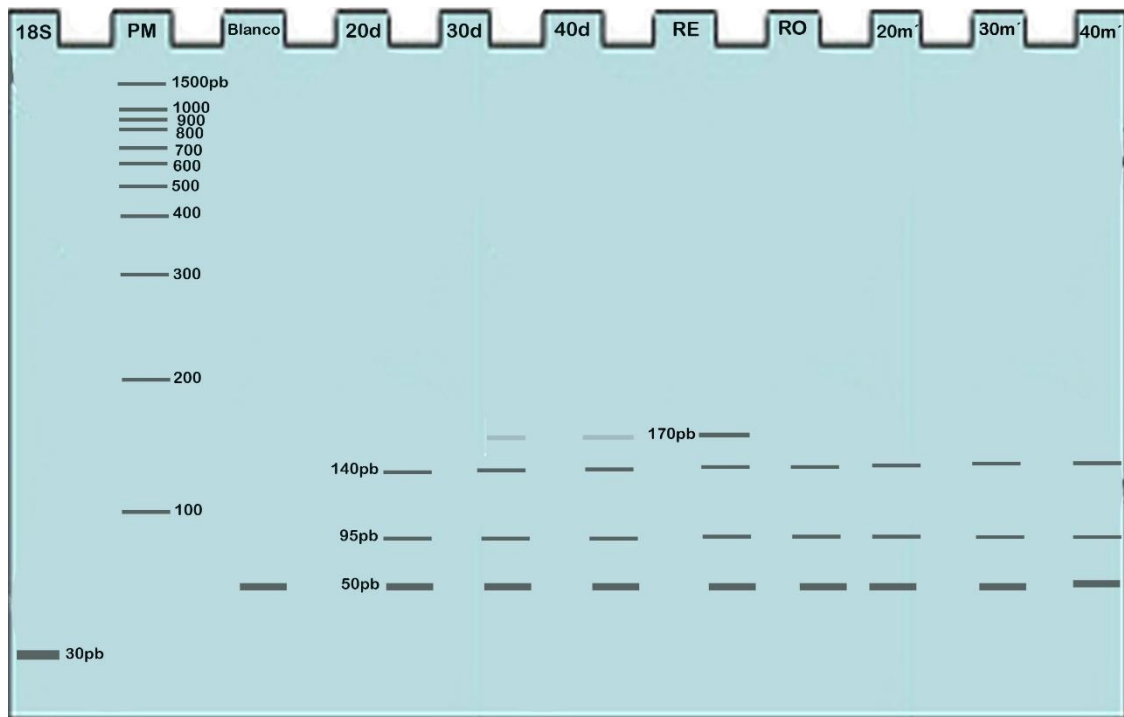


**Figura 16.** Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; y 0m, con el marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco.



**Figura 17.** Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 10, 20, 30 y 40m; 0 y 10d, con el marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco.

Cabe destacar que en la Figura 18 se puede apreciar una tendencia que diferencia a algunos de los individuos distales a la costa y próximos al oeste (30 y 40d; y RO), del resto de los individuos. Estos individuos presentan un patrón de bandas diferente, debido a la presencia de una banda adicional de aproximadamente 170 pb, además de las otras dos bandas que presentan los demás individuos.



**Figura 18.** Representación gráfica de la corrida electroforética de los productos de PCR para los individuos 20, 30 y 40d; 20, 30 y 40m; RO y RE, con el marcador de Peso Molecular (PM) de 100-1500 pb, el Primer 18S y el blanco.

## 4.2. Discusión

### 4.2.1. Comparación de los procesos de extracción de ADN

Una efectiva extracción de ADN de los tejidos es dependiente de las soluciones empleadas, especialmente de los mecanismos que permiten romper la membrana y acceder al material nucleico sin degradarlo. En tal sentido, el primer paso en cualquier protocolo de extracción es la homogeneización del tejido por acción mecánica, combinado con la acción de una solución de taponamiento. Esta última contribuye al proceso de lisis celular con el fin de romper la membrana y acceder al material genético, pero además, limita su degradación por acción enzimática (Pinto *et al.*, 2000).

Lo anteriormente expuesto refleja la importancia de la composición de los tampones de lisis, lo que en este estudio fue determinante para la efectividad y calidad de los resultados obtenidos mediante los protocolos probados. Se observó que una efectiva extracción del ADN se llevó a cabo en presencia de agentes quelantes y amortiguadores de pH (protocolo 2), tales como el EDTA y el Tris-HCl, los cuales resultaron más efectivos en comparación al NaCl 5 M (protocolo 1). La disrupción celular se logró por acción mecánica, proceso complementado con el uso del nitrógeno líquido y buffer de lisis, para evitar la degradación del material genético. Este último efecto se logra principalmente en presencia de EDTA como agente quelante en el buffer, ya que se une al magnesio, el cual es un cofactor de la desoxirribonucleasa, inhibiendo su actividad (Alejos *et al.*, 2014). Cabe destacar, que la adición de RNAsa permitió hidrolizar el ARN, evitando la interferencia de este en el análisis final de los resultados.

Tal como se mencionó anteriormente, la extracción de ADN mediante el uso de un kit de extracción para tejidos animales (protocolo 3), no funcionó de forma adecuada debido a las características particulares de los tejidos blandos que constituyen a las anémonas, y que bloquearon los filtros de las columnas del kit. El protocolo 4 resultó efectivo ya que, además de presentar las ventajas del protocolo 2, la presencia de SDS en el buffer permitió solubilizar la membrana celular, completando la ruptura de esta. Por su parte, la proteinasa K destaca entre los métodos para de extracción del ADN de tejido animal, ya que digiere proteínas y remueve contaminaciones proteicas de las preparaciones de ácidos nucleicos; además, la adición de proteinasa K inactiva rápidamente nucleasas que degradan el ADN o el ARN durante la extracción (González *et al.*, 2011). Aunque esta proteinasa suele presentar una mayor actividad a altas temperaturas (60°C aprox.), como se indica en las instrucciones de kit utilizado en el protocolo 3, en este caso se obtuvo una mayor calidad de ADN con largos períodos de incubación (72 h) a 37°C

y una alta concentración (1 mg/mL) (Pinto *et al.*, 2000).

La eliminación de proteínas se realizó mediante la adición de fenol y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en pasos de centrifugación; esto provoca que el ADN permanezca en el sobrenadante y en la interfase queden las proteínas, lo que se debe a que el ADN posee una alta polaridad negativa por lo que permanece en la fase acuosa de la solución. Las proteínas quedan tras la centrifugación en la interfase y en la fase orgánica debido a su polaridad. Finalmente, la precipitación y limpieza del ADN se realizó añadiendo al sobrenadante recuperado del paso anterior, una sal a alta concentración (NaCl 6 M). Con la adición de la sal, el ADN obtiene una capa iónica positiva que facilita su precipitación. Luego el etanol permite eliminar la concentración residual de sales y promover la precipitación del ácido nucléico, por deshidratación (Pinto *et al.*, 2000).

De acuerdo a los resultados de la presente investigación, puede aseverarse que, en general, al momento de extraer ADN de *S. helianthus* hay que considerar que:

- ✓ El uso de fenol-cloroformo, en la fase de purificación del ADN, puede implicar pérdida de la muestra por dilución.
- ✓ Es necesario asegurarse de observar una correcta disgregación celular durante la fase de homogeneización.
- ✓ La presencia de agentes quelantes como el EDTA y de amortiguadores de pH como el Tris-HCl, en la composición en el tampón de lisis, es clave para la extracción de ADN del tejido del disco podal de *S. helianthus*.
- ✓ El ADN cromosómico puede precipitar con la fracción protéica, al añadir acetato de amonio, debido a la naturaleza mucilaginoso del tejido, y en las condiciones del protocolo probado.

- ✓ La presencia de proteinasa K, a una temperatura adecuada para su actividad y durante un largo tiempo de incubación, permite una óptima obtención del ADN.
- ✓ Al igual que en la mayor parte de los protocolos de extracción de ADN, se obtiene mayor cantidad de las muestras de tejido frescas.

Obtener ADN relativamente puro y amplificable resulta fundamental para el uso de marcadores moleculares que permiten el estudio y análisis de la estructura y flujo génico de una población. Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, a partir de pequeñas muestras de tejido, especialmente en representantes del Phylum Cnidaria. En estos individuos los métodos para aislar macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos no suelen ser efectivos, debido en parte a la presencia de grandes cantidades de mucopolisacáridos presentes en los tejidos de estos organismos (de naturaleza mucilaginosa), el cual es constantemente producido y secretado, provocando la contaminación de la muestra y la inhibición de la acción de las enzimas de restricción sobre el ADN (Dellacorte, 1994; Pérez *et al.*, 2011; Riera *et al.*, 2010). Es por ello que se deben tomar en cuenta las consideraciones mencionadas anteriormente, ya que éstas están basadas principalmente en la naturaleza del tejido, para una óptima obtención de ADN, que permita a su vez una correcta amplificación por PCR, disminuyendo los riesgos de amplificación de agentes contaminantes.

#### **4.2.2. Amplificación por PCR.**

La región ITS involucra dos espacios (ITS1 e ITS2) separados entre sí por los genes 18S, 5.8S y el 28S. Ambos espaciadores tienen una tasa de sustitución nucleotídica que genera variabilidad intra e inter específica (Fuentes *et al.*, 1999). Por otra parte, los cnidarios pertenecen a la línea más basal en tiempo evolutivo, y se ha observado que en estos organismos, y en



invertebrados marinos en general, la tasa de evolución mitocondrial es 100 veces más lenta que en cualquier otro organismo, y aunque no se ha estudiado la tasa evolutiva nuclear, se sabe que en estos invertebrados, tiende a fijar mutaciones más rápidamente. Es por tal motivo que los marcadores de ADN nuclear ribosomal presentan una ventaja sobre el mitocondrial en estudios moleculares sobre cnidarios (Daly *et al.*, 2010).

Como se pudo apreciar en los resultados, la mayoría de los individuos presentan el mismo patrón de bandas. Una de las principales razones que explican estos resultados es la acumulación de variabilidad genética, ya que ésta causa la homogeneización por repeticiones de secuencias de ADN ribosomal en tándem, lo que se traduce en una baja variabilidad intraespecífica del ITS; además, la ausencia de reproducción sexual retarda el proceso de evolución incluso después de eventos de hibridación, lo que explica que los individuos hayan mostrado un patrón de bandas similar (Fuentes *et al.*, 1999).

La homogeneidad de los resultados, puede pensarse como consecuencia del tipo de reproducción, la cual en *S. helianthus* es principalmente asexual, generando una población que podría considerarse clonal. Resulta oportuno resaltar que la clonalidad es una opción ecológica que favorece la perpetuación e incluso la dispersión de un genotipo, favorables para los individuos que comparten el mismo tiempo y espacio bajo ciertas condiciones. En tal sentido, puede proponerse que los parámetros ambientales influyen de forma directa en la expresión de proteínas necesarias para el soporte de dichos factores, y esto se puede reflejar en cambios en el ADN que pueden dar lugar a mutaciones (Mandujano, 2007).

Por otra parte, aunque es común encontrar altos niveles de homogeneidad en especies con reproducción asexual, se ha demostrado que a través del tiempo no es posible que dos o más individuos compartan una

copia genética exacta, ya que durante cada ciclo de replicación celular se acumulan ciertas diferencias en el ADN (León *et al.*, 2008). En este estudio se pudo apreciar al examinar los resultados de la amplificación, que tres individuos presentaron una banda extra de mayor peso molecular respecto a las dos que conforman el patrón que mostró el resto de las anémonas. Resulta claro que la frecuencia de aparición de tales variantes individuales (apenas 10% de la muestra, incluyendo todo el muestreo), fue suficientemente baja como para demostrar que no puede considerarse la norma, sino por el contrario, casos raros. Sin embargo, basados en que la muestra correctamente refleja la frecuencia de aparición de los diferentes eventos en la población, llama poderosamente la atención la ubicación de los ejemplares con genoma variante, ya que dos de los mismos provenían de la región distal a la costa y el tercero del extremo oeste, fuera del agrupamiento, lo que constituye la evidencia de una cierta tendencia a que las diferencias se presenten entre los individuos que se encuentran distales a la costa y fuera del parche de anémonas.

Desde un punto de vista ambiental y de acuerdo a Palacios (2009), la plataforma arrecifal en estudio presenta una dinámica de expansión-contracción en su superficie, con movimientos de sus componentes sueltos (colonias de coral, trozos de roca y/o coral muerto) y dinámica de desplazamiento. Por esta razón hay que considerar al clon como unidad evolutiva independiente con un posible destino diferente a la unidad que le dio origen, sometido bajo ciertas condiciones ambientales (Mandujano, 2007). Siguiendo este razonamiento, los individuos a diferentes profundidades podrían explicar las tendencias antes señaladas, ya que las anémonas ubicadas en diferentes sectores del arrecife y a distintas profundidades estarían sujetas a diferencias en algunas condiciones ambientales. Esto implica que los mecanismos fisiológicos serían hasta cierto punto diferentes y consecuentemente, los genes requeridos serían también afectados en cierto grado de forma diferente, incrementándose así la

probabilidad de que se presentaran diferencias genómicas detectables por lo métodos utilizados en el estudio. Contrario a esto y al ser alta la correlación genética entre los individuos, entonces la actuación en los tres ambientes diferenciados durante el muestreo (próximo, medio y distal), representarían con bastante seguridad al mismo carácter, el cual es determinado por aproximadamente el mismo grupo de genes (Falconer, 1971).

Por otra parte, la similaridad entre la mayoría de los individuos, también puede deberse a que el muestreo se realizó a finales de febrero-principios de marzo, época de reproducción de *S. helianthus*, hecho reportado por Palacios (2009), quien registró fotográficamente un individuo durante su reproducción asexual a mediados de dichas fechas. Según Palacios (2009), la época de reproducción está asociada a la confluencia de ciertos parámetros ambientales, entre los que se pueden mencionar:

*Temperatura Ambiental:* este parámetro se mantiene oscilando entre los 28,7°C en Enero hasta los 41,6°C en Septiembre, con fluctuaciones promedio diarias de 33,18, 37,46 y 34,89°C para la temperatura mínima, máxima y promedio respectivamente, con tendencia a fluctuaciones constantes de 9°C en el día durante todo Febrero y Abril.

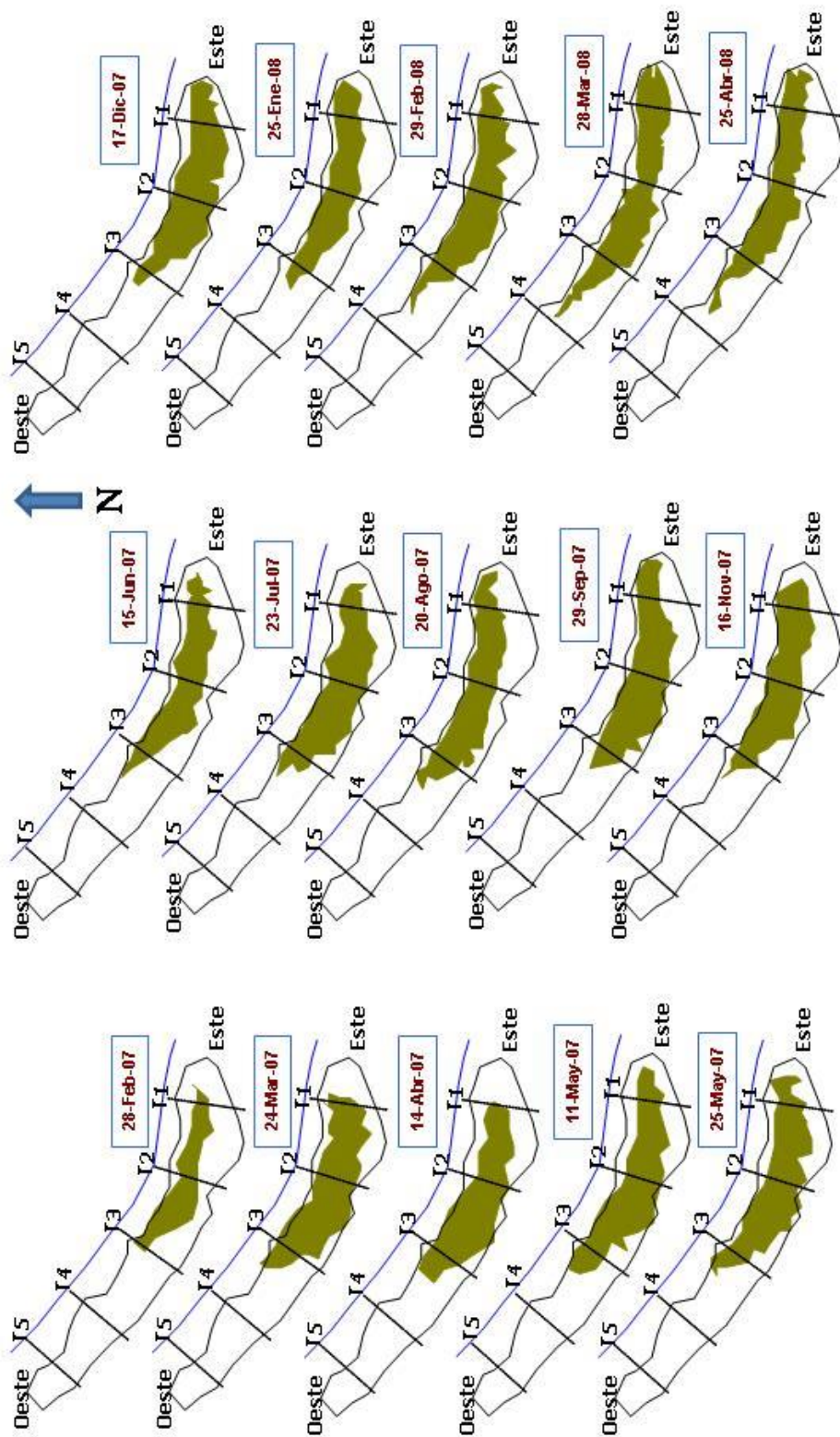
*Concentración de Oxígeno disuelto:* la concentración de oxígeno en la columna de agua varía entre 7,148 y 8,364 mg/L en el lapso Marzo-Abril, con un descenso marcado hacia los menores reportes de Mayo a Julio entre 2,662 y 4,584 mg/L. Seguidamente, vuelve a ascender de Agosto a Diciembre.

*Materia Orgánica:* el promedio registrado es de 16,44%, con un máximo de 99,565% en el borde posterior de la plataforma, entre T4 y T5, en Marzo y mínimo de apenas 0,146% en los sectores delanteros del extremo Este hasta T2 en Noviembre. Además la tendencia de los promedios en general señala mayores valores de materia orgánica a cumulada en la zona central de la plataforma, entre T2 y T5.

*Sedimentación neta*: la mínima registrada es de 0,002 g/m<sup>2</sup>h en la parte delantera del agrupamiento de anémonas en Junio y Agosto, mientras que el máximo es de 8,898 g/m<sup>2</sup>h en la parte trasera del agrupamiento en Marzo, con un promedio general de 0,58 g/m<sup>2</sup>h.

Además de la confluencia de los factores antes mencionados, lo cual de acuerdo al autor, muy probablemente establece las condiciones ideales para la reproducción de *S. helianthus*, se puede adicionar principalmente la posibilidad de que durante tales periodos incremente también la disponibilidad de alimento. De aquí que es lógico pensar que la dinámica reproductiva del agrupamiento durante el año estaría estrechamente ligada a los resultados genéticos obtenidos en este estudio, con los factores biológicos implicados.

Continúa diciendo Palacios (2009) que durante el mes de marzo se registra la máxima expansión del agrupamiento, que se caracteriza por presentar cambios de densidad generalmente muy rápidos en áreas relativamente pequeñas. De tal manera que la cobertura podía pasar desde 1% hasta 100% en apenas un metro, siendo la franja posterior de la plataforma la de menor cobertura. Estas características son comunes en especies con reproducción asexual (Falconer, 1971). La Figura 19, muestra el complejo patrón de expansión-contracción del agrupamiento de *S. helianthus*, en donde se observa que entre febrero y marzo hay la mayor expansión, y entre julio y septiembre se observa contracción.



**Figura 19.** Representación gráfica del patrón de expansión-contracción del parche de *S. helianthus* (Zona sombreada) durante el año 2007-2008 en Isla Larga. PN San Esteban. Tomado de: Palacios (2009).

Cabe destacar que la población de *S. helianthus* en la plataforma no se distribuye de forma homogénea; por el contrario, el diámetro del disco oral, como una medida de la talla de *S. helianthus*, muestra variaciones importantes, no solo temporales sino también espaciales. En tal sentido, el diámetro mínimo registrado coincide con la época de reproducción propuesta (marzo y abril), de apenas 30 mm en casi toda la plataforma. Además, las mayores fluctuaciones de tamaño ocurren entre marzo y abril, época en la cual hay un descenso significativo de las tallas, estabilizándose entre mayo y agosto, con un ascenso en septiembre y disminuyendo nuevamente entre noviembre y diciembre. Se ha evidenciado además que las anémonas de menor tamaño se encontraban principalmente hacia los sectores donde las condiciones tienden a ser soportables pero no las más favorables, como son los sectores E-T1 y T3-T4. Esto posiblemente ocurre por desplazamiento competitivo por parte de los individuos de mayor talla, los cuales tenderían a ubicarse en las zonas más favorecidas ambientalmente, siendo difícil a las pequeñas desplazar a los mayores y/o permanecer en las mejores zonas (Palacios, 2009).

Lo antes planteado sustenta los resultados obtenidos a nivel genético, ya que se observa una mayor semejanza entre las del medio y los extremos, que entre los individuos de ambos extremos. El desplazamiento competitivo además somete a los clones de menor tamaño a condiciones ambientales menos ideales, obligando a los individuos desplazados a recurrir a los recursos por medio de pequeños cambios reflejados en su material genético. En cuanto al individuo ubicado en la región oeste fuera del agrupamiento (RO), que presentó claro patrón de bandas diferente, puede deberse al hecho de que antes de la época de reproducción este haya estado en el extremo Oeste, y luego de la época de reproducción, por desplazamiento competitivo, este haya sido desplazado aún más al oeste, quedando en el remante desde entonces. O quizá haya provenido de otra población cercana al agrupamiento y su origen sea por reproducción sexual.

Otro aspecto que cabe destacar en cuanto al resultado obtenido para RO, es que las condiciones ambientales hacia el Este, son en cierta medida mejores, en términos de estabilidad, ya que los hundimientos que dieron origen al arrecife funcionan como protección e impiden el impacto directo del oleaje sobre la especie. Este hecho lo sustenta Palacios (2009), al reportar la mayor profundidad en el Este, y hace notar que las regiones internas de la plataforma arrecifal pueden estar siendo protegidas del oleaje en forma diferencial por el borde delantero, dependiendo de su ubicación en sentido este-oeste. En el extremo oeste no hay ninguna barrera, por lo cual los individuos son sometidos a estrés ambiental, ya que quedan expuestos a la zona de rompientes, dificultando su fijación al sustrato y/o hasta su regreso al grupo donde muy probablemente tuvo origen. Asimismo, al no ser una zona muy profunda los individuos pueden incluso quedar expuestos al aire durante la marea baja, lo que tiene impacto directo sobre los individuos en dicha zona (Palacios, 2009).

Por otro lado, los parámetros ambientales tales como salinidad, el pH y la turbidez, separan además la plataforma en dos secciones (Este y Oeste) de la plataforma, con máximos hacia el Oeste, apoyando la premisa de que existen diferencias locales a nivel micro, principalmente relacionadas con su posición en la plataforma, pero que generan microambientes muy probablemente capaces de favorecer la aparición de una variación a nivel genético (Palacios, 2009).

Este trabajo permitió relacionar variables ambientales con niveles de similitud genético entre los individuos de *S. helianthus*, dentro de la plataforma arrecifal de Isla Larga. Se muestra que si bien la especie tiende a reproducirse de forma asexual, se pueden encontrar diferencias entre los individuos a nivel genético, dependiendo del lugar ocupado dentro del parche, ya sea por estratos de profundidad y/o por la instauración de microambientes u ambientes locales. A pesar de que es lógico esperar que la

tendencia sea asexual dentro del parche, fuera de él no se puede descartar la idea de la reproducción sexual, debido al resultado obtenido en uno de los individuos fuera del parche (RO), en donde las condiciones ambientales son más cambiantes, lo cual afirmaría el hecho que la reproducción depende de las variables ambientales.

Finalmente, es necesario señalar que aunque el paso constante de lanchas cerca de la plataforma podría causar un impacto ambiental negativo para el agrupamiento, este parece no ser aún causal de disturbio dentro de la población. En cualquier caso, de ser así, habría que evaluar otras poblaciones de *S. helianthus* cercanas a fin de corroborar este hecho ya que la larva presenta cierto nivel de movilidad, asociado directamente a las corrientes y a las mareas (Barnes & Rupert, 1977).



## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- La extracción de ADN de *S. helianthus* se logró realizar de forma óptima con el uso de proteinasa K a 37°C y largos períodos de incubación, mientras que la PCR se logró a altas concentraciones de MgCl<sub>2</sub>.
- Se evidenció que la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2, permite determinar diferencias intraespecíficas entre los individuos de *S. helianthus*. Además, permitió establecer el carácter predominantemente monoclonal entre los individuos dentro del agrupamiento, y puede llegarse a establecer relación entre las pequeñas y poco frecuentes variaciones a nivel molecular y su entorno. Esto confirma que las anémonas son excelentes indicadores de calidad ambiental, y su estudio a nivel genético permite determinar la calidad de los factores ambientales.
- La mayoría de los individuos son más similares entre sí por sectores y por estratos de profundidad, evidenciando una estratificación espacial de grupos genéticamente homogéneos muy probablemente asociados al estrés ambiental.
- Aún cuando los estudios revelan que *S. helianthus* es predominantemente clonal en el parche, se observaron algunas diferencias a nivel molecular, que parecieran estar relacionadas con la zona en la que se encuentran los individuos, lo que indicaría que los factores físicos si pueden estar influyendo en la estructura genética de la población. En tal sentido, algunos de los individuos que están más al oeste son los que se diferencian genéticamente, debido a las diferencias en cuanto a factores

físicos con respecto al este. Esto puede deberse, principalmente, a la falta de una barrera física que impida el impacto directo de ciertos parámetros ambientales.

## **5.2. Recomendaciones**

Aun cuando los resultados del presente estudio representan un enorme aporte respecto al conocimiento de la genética de *S. helianthus* y sus implicaciones ecológicas en la formación de agrupamientos y la posible influencia de factores ambientales, valdría la pena mencionar algunas consideraciones especiales que surgieron como aspectos a ser abordados en próximas investigaciones. Así, sería necesario:

- Secuenciar los productos de PCR a fin de establecer relaciones precisas entre las secuencias amplificadas y dilucidar de forma específica la relación entre cada uno de los individuos y su ambiente.
- Realizar muestreos al menos dos veces al año, en diferentes estaciones, para analizar molecularmente la data y compararla con los resultados obtenidos en este trabajo.
- Estudiar poblaciones cercanas al agrupamiento, a fin de realizar seguimiento de las características genéticas de la especie en cuanto a su reproducción, pudiendo de igual forma, complementarse con estudios ecológicos y morfométricos que respalden los resultados obtenidos a nivel molecular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ACUÑA, F., E. EXCOFFON, S. MCKINSTRY & D. MARTÍNEZ.** (2007). Characterization of Aulactinia (Actiniaria: Actiniidae) species from Mar del Plata (Argentina) using morphological and molecular data. *Hydrobiologia* (592):249-256.
2. **ALEJOS, L., M. ARAGÓN, & A. CORNEJO.** (2014). Extracción y purificación de ADN. In: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos.* (A, Cornejo., A, Serrato., B, Rendón., y M, Rocha, eds.), 1-25 pp. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México D.F. México
3. **ÁLVAREZ, A., J. MANCHEÑO, D. MARTÍNEZ & M. TEJUCA.** (2009). Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon* 54(8):1135-1147.
4. **ASTORGA, M.** (2007). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. In: (LOVATELLI, A., A. FARIAS & I. URIARTE, eds.), *FAO Actas de Pesca y Acuicultura.* (12):277-287.
5. **AVISE, J.** (1993). *Molecular markers, natural history and evolution.* Segunda Edición. Editorial Chapman & Hall. New York. Estados Unidos. 511 p.
6. **BARBADILLA, A.** (2014). La genética de poblaciones. Departamento de genética y microbiología. Universidad de Barcelona. Barcelona. España. 1-10 pp.
7. **BARNES R. & RUPPERT E.** (1977). Zoología de los Invertebrados. Barcelona. España. 766 p.

8. **BARRETO, Y.** (2002). Caracterización y comparación de la estructura comunitaria de un arrecife coralino natural y un arrecife artificial de Isla Larga, P.N. San Esteban. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.
9. **BARRIOS, L., J. REYES, G. NAVAS & GARCÍA. B.** (2002). Distribución de las anémonas (Anthozoa: Actiniaria y Corallimorpharia) en el área de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Cien. Marinas*. 28(1):37-48.
10. **BASULTO, A., L. CASADELVALLE, A. OTERO & M. PICO.** (2006). Sticholysin II, a cytolyisin isolated from the caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*, interacts with serum lipoproteins, Freund adjuvant and specific antibodies to this protein. *Rev. Invest. Mar.* 27(1):41-48.
11. **BAPTISTE, M., N. CASTAÑO, D. LÓPEZ, F. GUTIÉRREZ, D. GIL & C. LASSO.** (2010). Análisis de riesgo y propuesta de categorización de especies introducidas para Colombia. Instituto de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá. Colombia. 73-96 pp.
12. **BATTISTA, G., B. MURGIA, A. PARODI, L. VALISANO, C. CERRANO, G. PALMISANO, G. BAVESTRELLO & M. SARA.** (2006). The assessment of DNA from marine organisms via a modified salting-out protocol. *Cellular & molecular biology letters* 11(2):155-160.
13. **BELLO, N.** (2001). Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. España. 16-26 pp.
14. **BOCHAROVA, E.** (2015). Reproductive biology and genetic diversity of the Sea Anemone *Aulactinia stella* (Verrill, 1864). *Hidrobiología*. 759(1):27-38.
15. **BUCKLIN, A., D. STEINKE & L. BLANCO.** (2010). DNA barcoding of marine

metazoa. *Rev. Mar. Sci.* 3:471-508.

16. **BURKE, T., R. SEIDLER & H. SMITH.** (1992). Técnicas moleculares en ecología y biología de la conservación. *Molecular Ecology* 1:1-15.
17. **BROUGH, C & C, MCBIRNEY.** (2013). Caribbean Carpet Anemone: Sun Anemone, Caribbean Sea anemone. Artículo en línea. Disponible a través de: <http://animal-world.com/Aquarium-Coral-Reefs/Caribbean-Carpet-Anemone>. Consulta: 10/02/2015
18. **CABRERO, J & J. CAMACHO.** (2002). Fundamentos de Genética de Poblaciones. Departamento de genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada. España. 83-126 pp.
19. **CASTRO, M., R. SÁNCHEZ & L. TRONCOSO.** (2008). ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819). *Rev. Tumbaga* 1(3):128-140.
20. **CAL, M.** (2001). Análisis de polimorfismos de ADN microsatélite de cromosoma y estudio de la población de Galicia y aplicaciones forenses. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. España. 4-20 pp.
21. **CARRANZA, S.** (2002). Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos. In: *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España* (PLEGUEZUELOS, J., R. MÁRQUEZ & M. LIZANA, eds.). Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española (2ª impresión). Madrid. España. 551-579 pp.
22. **COFFROTH, M., H. LASKER, M. DIAMOND, J. BRUENN & E. BERMINGHAM.** (1992). DNA fingerprints of a gorgonian coral: a method for

- detecting clonal structure in a vegetative species. *Marine Biology* 114:317-325.
23. **COOPER, G., & R. HAUSMAN.** (2007). La célula. Tercera Edición. Editorial Marbán. Madrid. España. 89-135 pp.
  24. **CHECA, M.** (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev. inst. nal. enf resp. mex* 20(3):213-221.
  25. **CHOMSKY, O., J. DOUEK, N. CHADWICK, Z. DUBINSKY & B. RINKEVICH.** (2009). Biological and population-genetic aspects of the sea anemone *Actinia equina* (Cnidaria: Anthozoa) along the editerranean coast of Israel. *Journal of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 375:16-20.
  26. **DAWSON, M., K. RASKOFF & D. JACOBS.** (1998). Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnology* 7(2):145-152.
  27. **DEL MONTE, A., J. GONZÁLEZ, C. ARAGÓN, J. PALOMO, J. GUISÁN & J. DÍAZ.** (2012). Selective and oriented immobilization of phospholipases from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus* (Ellis, 1768) by interfacial adsorption. *Rev. CENIC Cien. Biol.* 43(1):3-8.
  28. **DELLACORT, C.** (1994). Isolation of nucleic acids from the sea anemone *Condylactis gigantea* (cnidaria:anthozoa). *Tissue and cell* 26(4):613-619.
  29. **DÍAZ, A.** (1999). Efecto agregante plaquetario de 2 citolisinas: StI y StII purificadas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. Facultad de Biología. Instituto de Hematología e Inmunología. Universidad de La Habana. La Habana. Cuba.
  30. **ESQUIVEL, A.** (2014). Population genetics: A revision of the theory of

coalescence. PADI (Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingeniería). 1(2):1-4.

31. **EGUIARTE, L., V. SOUZA & X. AGUIRRE.** (2007). Ecología molecular. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecología. Universidad nacional autónoma de México. México. 1-272 pp.
32. **FAO.** (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Roma. Italia. 393-411 pp.
33. **FALCONER, D.** (1971). Introduction to Quantitative Genetics. Primera Edición. Ronald Press Company. Tlalpan. México 19-382 pp.
34. **FUJII, H.** (1987). The predominance of clones in populations of the sea anemone *Anthopleura asiatica* (uchida). *BioL BUILL* 172(2):202-211.
35. **FUEYO, S.** (2008). Redes tróficas y flujo de energía en comunidades de pozas de marea de Mar de Plata. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de Luján. Buenos Aires. República de Argentina. 4-19 pp.
36. **FUERTE, A., A. ROSSELLÓ & G. NIETO.** (1992). Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Mol. Ecol.* 8(8):1341-1346.
37. **FLORIDA FISH AND WILDLIFE CONSERVATION COMMISSION.** (2011). Florida's Wildlife Legacy Initiative: Florida's State Wildlife Action Plan. Tallahassee, Florida, USA. Artículo en línea. Disponible a través de: <http://myfwc.com/media/2235922/ActionPlan.pdf>. Consultado el: 22/02/2015
38. **FRAZÃO, B., V. VASCONCELOS & A. ANTUNES.** (2012). Sea Anemone

(Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* 10(8):1812-1851.

39. **GARATEIX, A. & A. RODRÍGUEZ.** (2010). Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. *Rev. electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* (19):1-6.
40. **GARCIA, T., D. MARTINEZ, A. PALMERO, C. SOTO, M. TEJUCA, F. PAZOS, R. MENÉNDEZ, C. ALVAREZ & A. GARATEIX.** (2009). Pharmacological effects of two cytolytins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J. Biosci.* 34(6):891-898.
41. **GARCÍA, A.** (2005). Flujo génico entre dos poblaciones de dos especies de corales en arrecifes de Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela. 1-6 pp.
42. **GASCA, R & L. LOMAN.** (2014). Biodiversidad de Medusozoa (Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) en México. *Rev. Mex. Biod.* 85:154-163.
43. **GOMES, P., M. ZAMPONI & A. SOLÈ.** (2003). Asexual reproduction and molecular systematics of the sea anemone *Anthopleura krebsi* (Actiniria: actiniidae). *Rev. Biol. Trop.* 51(1):147-154.
44. **GÓMEZ, A.** (2003). Polimorfismo genético. Instituto de Genética Humana. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
45. **GONZALEZ, R., N. SIMOÑES, M. MASCARO, J. TELLO, M. BRUGLER & E. RODRÍGUEZ.** (2014). Morphological and molecular variability of the sea anemone *Phyumanthus crucifer* (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria, Actinoidea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1-15 pp. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315414000988>. Consultado el: 01-11-2014.



46. **GONZÁLES, J.** (2007). Purificación, inmovilización y caracterización de una esterasa interfacial con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> a partir de una fracción de alto peso molecular procedente del extracto total acuoso de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. Tesis de postgrado. Centro de estudios de las proteínas. Facultad de Biología. Universidad de la Habana. La Habana. Cuba. 1-70 pp.
47. **GONZÁLEZ, N., N. RODRÍGUEZ, W. TORRES, J. O'CALLAGHAN & ROSA DE JESÚS.** (2001). Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima bromelina. *Rev. Científica, FCV-LUZ* 21(3):233-238.
48. **HENRÍQUEZ, Y & M. PALACIOS.** (2008). Distribución del antozoo *Stichodactyla helianthus* en un arrecife franjeante de isla larga, parque nacional San Esteban, Estado Carabobo, Venezuela. *FARAUTE Ciens. y Tec.* 3(1):5-16.
49. **IDT.** (2005). Enzimas de restricción. Artículo en línea. Disponible a través de: [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). Consultado el: 24-09-2014.
50. **IGEA, J.** (2012). Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. España. 1-23 pp.
51. **JORDANO, P.** (2009). Ecología y genes. *Ecosistemas* 18(1):1-2.
52. **KARTHIKAYALU, S., V. RAMA, R. KIRUBAGARAN & R. VENKATESAN.** (2010). Characterization, purification and phylogenetic analysis of a cytolysin from the sea anemone *Heteractis magnifica* of the Indian Ocean. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 16(2):223-240.
53. **KOVALL, R & B. MATTHEWS.** (1998). Structural, functional, and

evolutionary relationships between  $\lambda$ -exo814nuclease and the type II restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(14):7893-7897.

54. **KLUG, W., M. CUMMINGS & C. SPENCER.** (2006). *Conceptos de genética*. Editorial Pearson Educación. Madrid. España. 529-561 pp.
55. **LODISH, H., A. BERK, P. MATSUDARIA, C. KAISER, M. KRIEGER, M. SCOTT, A. ZIPURSKY & J. DARNELL.** (2005). Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 351-378 pp.
56. **LOHUIS, M., P. ALDERSLADE & D. MILLER.** (1990). Isolation and cloning of DNA from somatic tissue of soft corals (Cnidaria: Octocorallia). *Marine Biology* 104:489-492.
57. **LEÓN, G., C. BARBOSA. & C. JIMENEZ.** (2008). Clones, copias exactas o replicas únicas. *ContactoS* 67:34-39.
58. **MACPHERSON, E., X. TURON & I. URZI.** (2008). Biodiversidad genética de organismos marinos en el Parque Nacional Cabrera: aplicaciones para la conservación. *Proyectos de investigación en parques nacionales 2005-2008*. 135-144 pp.
59. **MARTÍN, A.** (2013). Genómica funcional. Seminario de Tesis I. Centro de investigaciones y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. México, D.F. México. 5-56 pp.
60. **MARÍNEZ, M., M. HELGUERA, & A. CARRERA.** (2006). Marcadores moleculares. In: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (LEVITUS, G., V. ECHENIQUE, C. RUBINSTEIN, E. HOPP & L. MROGINSKI, eds.), INTA. Buenos Aires. Argentina. 61-68 pp.
61. **MARUJANO, C.** (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de

- poblaciones. In: *Ecología molecular*. (L, Eguiarte., V, Souza., y X, Aguirre). 250-250 pp. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México D.F. México.
62. **MORAES, C & A. SOLÉ.** (1991). High levels of gene variation and the population structure of *Bunodosoma caissarum* (Cnidaria: Actiniidae). *Rev. Biol. Trop.* 39(1):41-46.
63. **PÉREZ, I., L. ANGULO, G. OSORIO, C. RAMIS, Á. BEDOYA, R. FIGUEROA, S. MOLINA & D. INFANTE.** (2011). Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro* 23(1):27-34.
64. **PALACIOS, M.** (2009). Dinámica ecológica de una población de *Stichodactyla helianthus* en una plataforma arrecifal de Isla Larga, Parque Nacional San Esteban, Carabobo, Venezuela. Trabajo de acenso. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Carabobo. Venezuela.
65. **PEREZ, M.** (1996). Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. III Simposio científico en biología celular y molecular. A Coruña. España. 247-266 pp.
66. **PEARSON, M., D. ROGERS & M. SHEADER.** (2002). The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. *Molecular Ecology* 11(11):2285-2293.
67. **PINTO, S., F. FERNANDES & E. SCHLENZ.** (2000). DNA extraction from sea anemone (Cnidaria: Actiniaria) tissues for molecular analyses. *Genetics and Molecular Biology* 23(3):601-604.

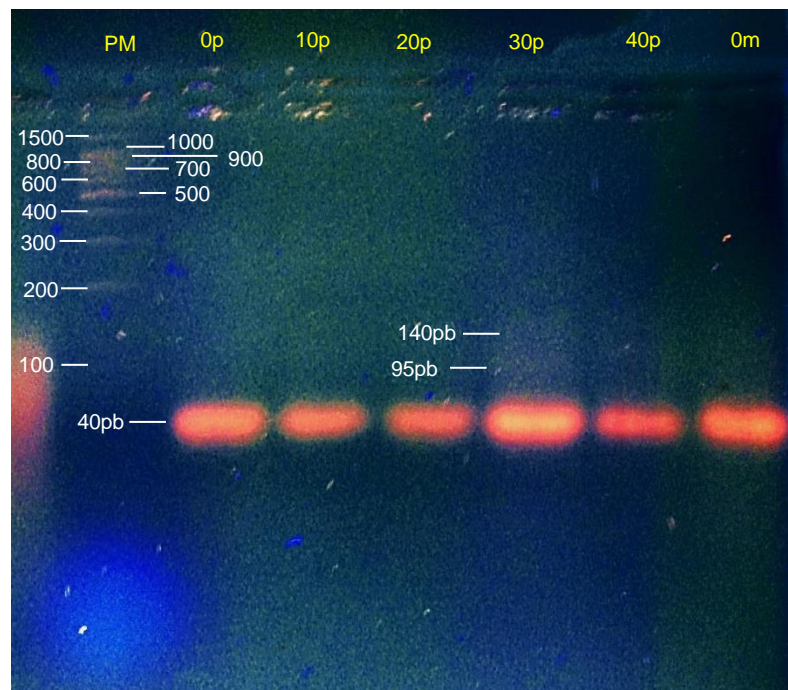
68. **PONCE, E., J. CARABIAS, G. QUADRI & J. MAZA.** (1997). Conservación y usos sustentables de los arrecifes en México. México D.F. México. 3-11 pp.
69. **PUERTA, C & C. UREÑA.** (2005). Prácticas de biología molecular. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 15-16 pp.
70. **QUESADA, A.** (2013). Ecología trófica de la anémona de mar *Anthopleura nigrescens* (Cnidaria: Actiniaria). Tesis presentada para optar el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Zoología. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José. Costa Rica.
71. **QUIROZ, Y & F. RETUERTO.** (2005). Estudio de las toxinas de la anémona de mar *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagatiidae). Tesis para optar por el título profesional de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 13-18 pp.
72. **RÅDSTRÖM, P., R. KNUTSSON. P. WOLFFS, M. LÖVENKLEV & C. LÖFSTRÖM.** (2004). strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Mol. Biotechnol* 26(2):133-46.
73. **REITZEL, M., J. DARLING, J. SULLIVAN & J. FINNERTY.** (2007). Global population genetic structure of the starlet anemone *Nematostella vectensis*: multiple introductions and implications for conservation policy. *Biol Invasions* 10:1197-1213.
74. **RENTARIA, M.** (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In: *Ecología molecular*. (Eguiarte. L., V. Souza & X. Aguirre, eds.), Instituto Nacional de Ecología. 541-566 pp.

75. **RIERA, M., M. ROJAS & P. ZAPATA.** (2010). Protocolo de extracción de DNA por *salting-out* para pequeños volúmenes de sangre. *Rev. Cienc. Technol.* (14):1-10.
76. **RODRÍGUEZ, J & L. MARTÍNEZ.** (2011). Isolation and prepurification of active compounds in venom from *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) from the Caribbean Sea. *Cien. Mar.* 37(3):369-377.
77. **RUPPERT, E & R. BARNES.** (1998). Zoología de los invertebrados. Sexta edición. McGraw Hill interamericana. México D.F. México. 98-163 pp.
78. **SABOGAL, A.** (2012). Modelamiento molecular de la interacción entre las neurotoxinas de *Stichodactyla helianthus* Y *Bunodosoma granulifera*, con el canal de potasio Kv1.3. Trabajo de Grado. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 1-32 pp.
79. **SÁNCHEZ, M.** (2010). Estudio de polimorfismos genéticos en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca. España. 4-18 pp.
80. **SÁNCHEZ, J., O. SANTOS, A. FALCÓN, A. RAMÍREZ & E. HEIMER DE LA COTERA.** (2012). Purificación y evaluación hemolítica de fracciones de bajo peso molecular de la anémona *Stichodactyla helianthus*. 13ª Feria de postgrados de calidad. Toluca. México. 1-4 pp.
81. **SACELDA, E & A. ORTEGA.** (2009) Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción. *Elementos* 16(74):29-37.
82. **SHEARER, T., M. VAN OPPEN, S. ROMANO & G. WÔRHEIDE.** (2002). Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol.*

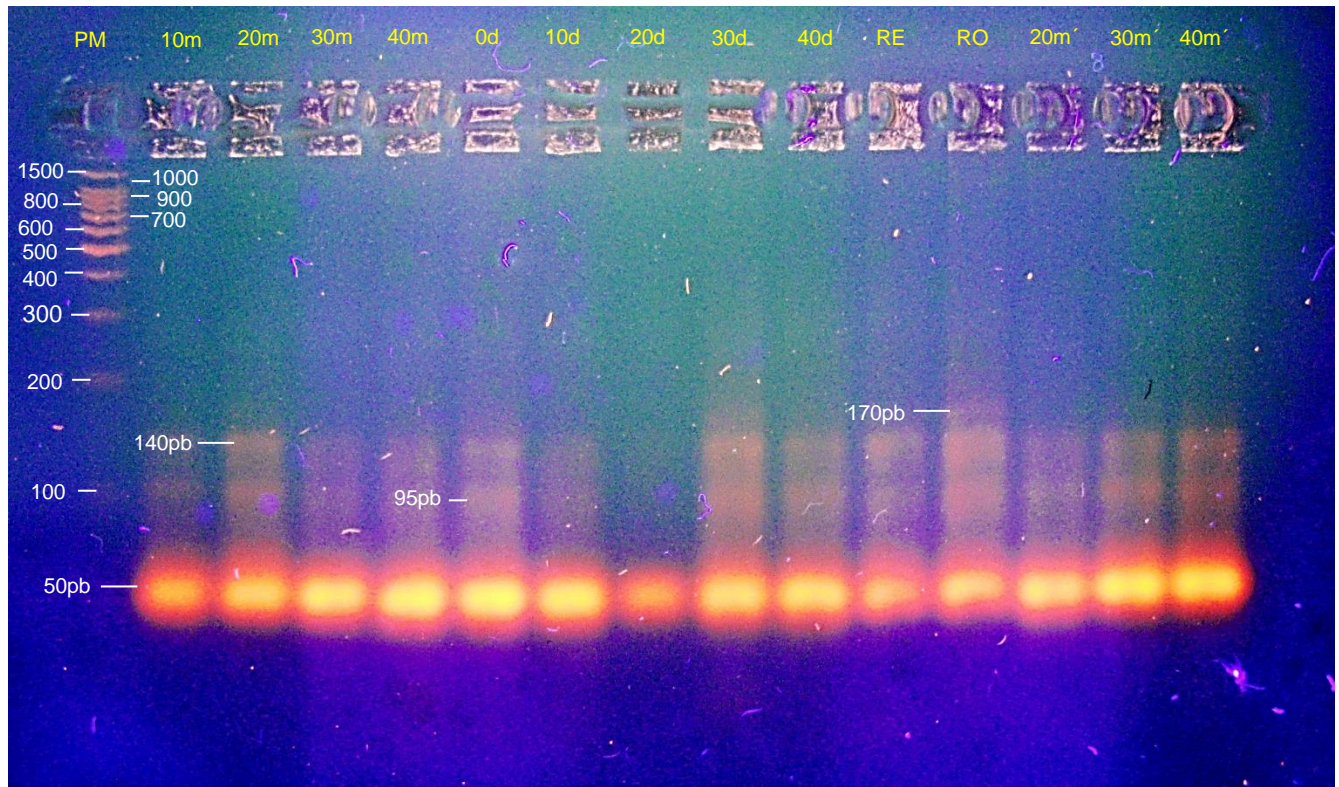
*Ecol.* 11(12):2475-2487.

83. **TING, J & J. GELLER. (2000).** Clonal diversity in introduced population of an Asian sea anemone in North America. *Biological Invasions* 2(1):23-32.
84. **VELASCO, R. (2005).** Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Fac. Cien. Agrop.* 3(1):14-17.
85. **YAN, L., J. HERRINGTON, E. GOLDBERG, P. DULSKI, R. BUGIANESI, R. SLAUGHTER, P. BANERJEE, R. BROCHU, B. PRIEST, G. KACZOROWSKI, B. B. RUDY & L. GARCIA. (2005).** Stichodactyla helianthus Peptide, a Pharmacological Tool for Studying Kv3.2 Channels. *Mol Pharmacol.* 67(5):1513-1521.

## APÉNDICE

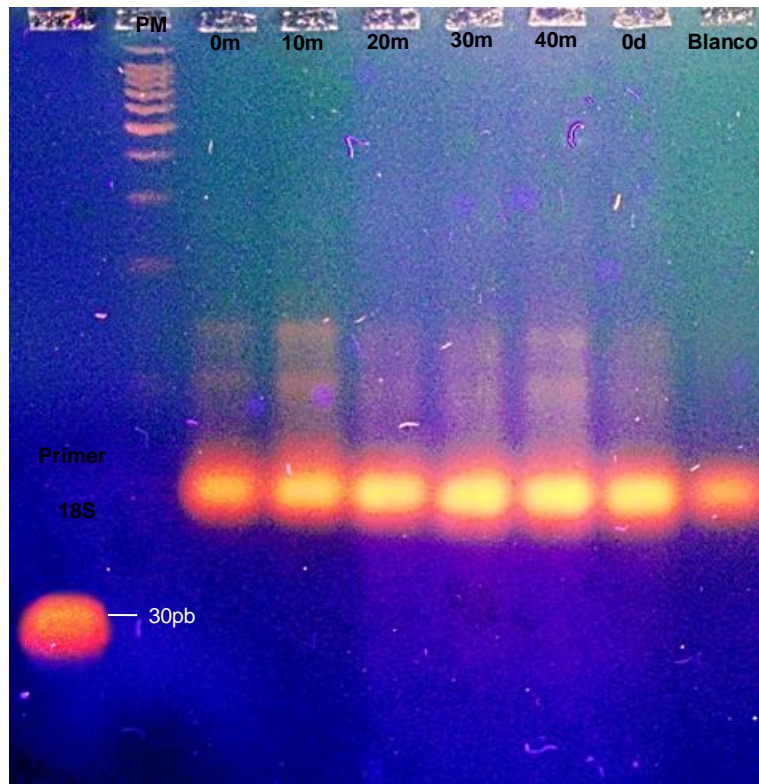


**Figura 20.** Resultado de la amplificación por PCR de los individuos 0, 10, 20, 30 y 40p; y 0m en gel de agarosa al 2%. PM 1500pb.



**Figura 21.** Resultado de la amplificación por PCR de los individuos 10, 20, 30 y 40m; 0, 10, 20, 30 y-40d; 20, 30 y 40 m'; RE y RO. PM 1500 pb.





**Figura 22.** Comparación de algunos resultados de amplificación por PCR con respecto al blanco y al Primer 18S.