



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

Obtención de marcadores moleculares de tipo secuencia para la caracterización de *Eisenia cokeri*
y *E. gracilis* (Ochrophyta: Laminariales) y primeros resultados de diversidad genética

Por

Francisca Daniela Cisterna Pizarro

MEMORIA PARA OPTAR AL

TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO MARINO

Profesora guía: Florence Tellier

Profesora co-guía: Karla Pérez-Araneda

Concepción, Chile

Año 2018

ACTA DE CERTIFICACIÓN



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

Certifico que el presente trabajo de Memoria de Título se realizó bajo mi dirección y ha sido aprobado.

Profesora Guía: Florence Tellier

Declaro que el contenido de esta Memoria de Título no ha sido presentado total o parcialmente para optar a otro Título o Grado Académico.

Francisca Daniela Cisterna Pizarro

Nota del Examen de Título: ____

Fecha de aprobación del Examen de Título:

_____ de _____ de 201_

Ministro de Fe: _____

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se enmarca en un trabajo colaborativo involucrando la Mg.(c) Patricia Carbajal-Enzian, la Dra. Natalia Arakaki (IMARPE, Callao, Perú), la Dra. Patricia Gil-Kodaka (Universidad Nacional Agraria La Molina – UNALM, Lima, Perú) y la Dra. Florence Tellier (UCSC), y financiado a través de los proyectos DIN N°22/2016 de la UCSC y Fondecyt N°1160930 de CONCYTEC, Perú.

Agradezco a mi profesora guía: Dra. Florence Tellier y profesora co-guía: Karla Pérez por el tiempo entregado y por todo lo enseñado en esta memoria. También por su preocupación por pulir mis habilidades blandas, tales como la manera de exponer frente a un público, entre otras cosas.

Agradezco a mi papá, mamá, hermana y pololo (R.O.) por todo el amor, apoyo y paciencia entregados, por siempre ahí cuando los necesité. También agradecer a mis amigas D.F., M.I., C.H. y M.P. por todo el apoyo, paciencia y cariño que me han dado.

También agradezco a mi Jefe de Carrera Dr. Guillermo Herrera por todas las enseñanzas, sus consejos y apoyo entregado. Gracias por su total disponibilidad a ayudar, por ser un buen jefe de carrera, el cual más de una vez nos trató como a un hijo(a). Realmente agradezco todo lo que ha hecho por mí a lo largo de estos 6 años.

Agradezco también a la Dra. Jessica Bórquez y al encargado del laboratorio 26, Mg. Francisco Silva, por la ayuda académica y enseñanzas en laboratorio.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	8
Problemática.....	13
Objetivos	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos	14
Métodos.....	15
Revisión bibliográfica y creación de una base de datos genéticos para las especies focales	15
Selección de muestras para los ensayos	15
Ensayos de amplificación en laboratorio.....	17
<i>Extracción de ADN</i>	17
<i>Selección de marcadores moleculares para ensayos</i>	17
<i>PCR (reacción en cadena de la polimerasa)</i>	18
<i>Electroforesis</i>	19
Secuenciación	19
Edición y análisis de las secuencias	20
Estimación de polimorfismo y distancias genéticas	22
Resultados	23
Información de la literatura	23
Ensayos de amplificación por PCR	27
Secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas en BLAST	29
Divergencia de secuencia a nivel intraespecífico y entre especies focales	31
Divergencia de secuencia entre las especies focales y especies de <i>Ecklonia</i> de otros continentes	33
Discusión.....	35
Ensayos de amplificación y secuenciación.....	35

Diversidad intraespecífica en las especies focales	35
<i>E. cokeri</i> y <i>E. gracilis</i> : ¿dos especies distintas?	36
<i>E. cokeri</i> y <i>E. gracilis</i> , especies distintas de <i>E. arborea</i> y <i>E. radiata</i>	37
Conclusiones	38
Referencias bibliográficas	39
Anexo 1	43

RESUMEN

Las Laminariales (o huiros) destacan por su importancia ecológica, como especies ingenieras ecosistémicas, y por su importancia económica, en particular en la industria de alginatos. No obstante, las especies son difíciles de distinguir en base a las características morfológicas, debido a la alta plasticidad fenotípica de los huiros, y los estudios recientes de filogenia han provocado reorganizaciones taxonómicas. Así, los géneros *Eisenia* y *Ecklonia* fueron cambiados de familia (de Alariaceae a Lessoniaceae), dos especies de *Eisenia* fueron transferidas a *Ecklonia*, y se ha cuestionado la diferencia entre ambos géneros y entre ciertas especies. En el Pacífico Sur Este, dos especies han sido reportadas, ambas aun consideradas como parte del género *Eisenia*: *E. cokeri* y *E. gracilis*. La primera es reportada entre 4°S y 14°S en la costa peruana así que en las Islas Desventuradas (San Félix; 26°S), en Chile, a 1400 km de la costa peruana. A su vez, *E. gracilis* ha sido reportada en un único sitio, ubicado en 15°S, en la costa peruana. Las especies se diferencian por ciertos caracteres morfológicos, por su rango de distribución geográfica y por su batimetría. Últimamente ha crecido el interés económico para estas especies, pero aún no se sabe mucho de su biología evolutiva y de su ecología, y por lo tanto no se pueden tomar medidas de manejo y conservación adecuadas. Este trabajo tuvo como objetivo obtener marcadores moleculares de tipo secuencia que permitan a futuro realizar estudios de filogenia y filogeografía de ambas especies, clarificando así su estatus taxonómico: ¿son dos especies distintas evolutivamente? ¿Deben ser transferidas al género *Ecklonia*? Se reporta aquí (i) el proceso de selección de marcadores para ensayos de amplificación y las condiciones de amplificación adecuadas para los 6 marcadores considerados – 3 mitocondriales, 2 cloroplastidiales y 1 nuclear; y (ii) los primeros resultados de diversidad genética para 6 muestras de *E. cokeri* (3 localidades en la costa peruana) y 2 muestras de *E. gracilis*. De los 6 marcadores, 1 requiere seguir con ensayos de amplificación. Los demás marcadores sugieren una cercanía de las especies focales con especies de *Ecklonia*. Hay incongruencia entre marcadores respecto a la divergencia entre *E. cokeri* y *E. gracilis*, del orden de una divergencia intraespecífica para los marcadores mitocondriales y similar a la divergencia entre estas especies y especies de otros continentes (*Ecklonia radiata* y *E. arborea*) para los marcadores cloroplastidiales. Son las primeras secuencias generadas para estas dos especies.

Palabras clave: Diversidad genética, *Ecklonia*, *Eisenia*, marcadores moleculares, Perú.

ABSTRACT

Laminariales (or kelps) stand out for their ecological importance, as ecosystem engineer species, and for their economic importance, particularly in the algininate industry. However, species are difficult to distinguish based on morphological characteristics, due to the high phenotypic plasticity of kelps, and recent phylogenetic studies have led to taxonomic reorganizations. Thus, the *Eisenia* and *Ecklonia* genera were transferred from the Alariaceae family to Lessoniaceae, two species of *Eisenia* were transferred to *Ecklonia*, and the difference between both genera and between some species has been questioned. In the South East Pacific, two species have been reported, both still considered as part of the *Eisenia* genus: *E. cokeri* and *E. gracilis*. The first one is reported between 4 °S and 14 °S on the Peruvian coast, and on the Desventuradas Islands (San Felix, 26 ° S), in Chile, 1400 km from the Peruvian coast. In turn, *E. gracilis* has been reported in a single site, located at 15 °S, on the Peruvian coast. The two species are differentiated by several morphological characters, by their geographical distribution range and by their bathymetry. Lately the economic interest for these species has grown, but little is known yet regarding the evolutionary biology and ecology of both species, and therefore no adequate management and conservation measures can be taken. The objective of this work was to obtain molecular markers (sequences) that allow future studies of phylogeny and phylogeography of both species, thus clarifying their taxonomic status: are they two species with distinct evolutionary histories? Should they be transferred to the *Ecklonia* genus? We report here (i) the markers selection for amplification assays and the amplification conditions suitable for the 6 markers considered - 3 mitochondrial, 2 chloroplastic and 1 nuclear; and (ii) the first results of genetic diversity for 6 samples of *E. cokeri* (3 locations on the Peruvian coast) and 2 samples of *E. gracilis*. Of the 6 markers, 1 requires further amplification assays. The other markers suggest the focal species are closely related with *Ecklonia* species. There is inconsistency between markers regarding the divergence between *E. cokeri* and *E. gracilis*, similar to intraspecific divergences for mitochondrial markers and similar to the divergence observed between the focal species and species from other continents (*Ecklonia radiata* and *E. arborea*) for the chloroplastic markers. These are the first sequences generated for these two species.

Key words: *Ecklonia*, *Eisenia*, genetic diversity, molecular markers, Peru.