## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS



# CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *hsp70* Y *18S* EN EL ERIZO NEGRO *Arbacia stellata* (GMELIN 1788) (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)

# $T \mathrel{E} S \mathrel{I} S$

# QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

## $B \ I \ O \ L \ O \ G \ O$

### PRESENTA

# LEONEL PÉREZ CARRASCO

ENSENADA B.C.

**JUNIO 2014** 

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS

# CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *hsp70* Y *18S* EN EL ERIZO NEGRO *Arbacia stellata* (GMELIN 1788) (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA)

**TESIS PROFESIONAL** 

QUE PRESENTA

LEONEL PÉREZ CARRASCO

APROBADO POR:

DRA. CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ

DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES

DR. ALFREDC GARZA

Resumen de la tesis de Leonel Pérez Carrasco presentada como requisito parcial para la obtención de la licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Junio 2014.

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES hsp70 Y 18S EN EL ERIZO NEGRO

Arbacia stellata (GMELIN: 1788) (EQUINODERMATA: EQUINOIDEA)

Resumen aprobado:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

**RESUMEN:** Las Proteínas del choque térmico o "Heat Shock Protein" (HSP por sus siglas en inglés) de la familia de 70 kda juegan importante papel en los procesos celulares durante el desarrollo embrionario, la organogénesis y como respuesta al estrés térmico evitando el despliegue o desdoble de las proteínas. Es por esto que el gen de hsp70 ha sido caracterizado en varios organismos especialmente en invertebrados marinos (como los equinodermos) para usarlo en investigaciones de cambios en la expresión génica como respuesta al estrés ambiental (especialmente el causado por incrementos de temperatura). El erizo negro Arbacia stellata posee una amplia distribución geográfica, que abarca la costa del Pacifico desde Chile hasta la costa de Baja California (México) y en este rango de distribución se encuentra expuesto a amplias diferencias de temperaturas durante su etapa de desarrollo embrionario y larval (durante la cual se transportan por las corrientes antes de la metamorfosis y habitan en el bentos durante la etapa adulta). El uso de este gen y del gen 18S ribosomal mediante la técnica PCR en tiempo real puede dar respuesta de cómo afecta la temperatura a la especie, por eso el objetivo de caracterizar estos genes. En este trabajo se logra caracterizar el gen 18S ribosomal que comparándolo con secuencias de 18S de otros Echinoideos y especialmente con especies del género Arbacia (A. punctulata y A. lixula) se observó que guardan una relación cercana. En el caso del gen hsp70 se consiguió amplificar un fragmento usando cebadores diseñados en regiones conservadas del gen en la especie Cancer antenarius y que amplifico en otras especies de moluscos por lo que se puede inferir que se trata de un fragmento conservado que comparte estos grupos sin embargo, este fragmento se debe secuenciar para corroborar este hecho.

Palabras Clave: hsp70, 18S, Arbacia stellata.

Abstract of the thesis of Leonel Pérez Carrasco presented as partial requirement for obtaining a degree in Biology. Ensenada, Baja California, Mexico. June 2014.

#### CHARACTERIZATION OF THE GENES HSP70 AND 18S IN BLACK

SEA URCHIN Arbacia stellata (GMELIN: 1788) (EQUINODERMATA:

EQUINOIDEA)

ABSTRACT APROVED BY:

Dr. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

ABSTRACT: The heat shock proteins family of 70 kda play important role in cellular processes during embryonic development, organogenesis and in response to thermal stress by avoiding the deployment or unfolding of the protein. That is why the hsp70 gene has been characterized in several organisms especially in marine invertebrates (such as echinoderms) for use in investigations of changes in gene expression in response to environmental stress (especially caused by temperature increases). The black sea urchin Arbacia stellata has a wide geographical distribution, covering the Pacific coast from Chile to the coast of Baja California (Mexico) and in this range of distribution is exposed to large temperature differences during the stages of embryonic development and larval (during which are transported by currents before metamorphosis and inhabit the benthos during adult stage). The use of this gene and the ribosomal 18S gene in this species by quantitative real time PCR (q-PCR) can give answer of how temperature affects the species, for that the objective of characterizing these genes. This work is accomplished to characterize the gene ribosomal 18S which compared to other Echinoids 18S sequences especially species of genus Arbacia (A. punctulata and A. lixula) observed that maintain a close relationship. In the case of hsp70 gene was achieved amplifying a fragment using primers designed in conserved regions of the gene in the species Cancer antenarius and amplified in other mollusc species so it can infer that this is a conserved fragment that shares these groups but should be sequenced to corroborate this fact.

Key words: hsp70, 18S, Arbacia stellata.

# Índice de Trabajo

# a) Contenido

| Introducción1  |
|--|
| Antecedentes12   |
| Hipótesis15  |
| Objetivos15  |
| Metodología  |
| Extracción de ARN16  |
| Extracción de ADN genómico16   |
| Digestión del ARN con DNAsas17   |
| Síntesis de cDNA (ADN complementario) por transcriptasa reversa17                    |
| Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda bioinformática)17 |
| Amplificación del fragmento de hsp70 y Ribosomal 18S en ADN19                        |
| Alineamiento, análisis de las secuencias y diseño de cebadores específicos21         |
| Resultados21   |
| Extracción de ARN  |
| Digestión con DNAsas   |
| Sintesis de ADN complementario (cDNA)  |
| Extracción de ADN  |
| Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda bioinformática)26 |
| PCR del gen 18S  |
| PCR del gen <i>hsp70</i>   |
| Alineamiento, análisis de las secuencias   |
| Discusiones  |
| Extracción de ARN41  |
| Extracción de ADN genómico42   |
| Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda bioinformática)43 |
| PCR de los genes 18S y hsp7044   |
| Alineamiento, análisis de las secuencias45   |
| Conclusiones   |

| Recomendaciones   |    |
|---|----|
| Bibliografía  |    |
| ANEXOS  | 57 |
| Protocolo RNA later                                     |    |
| Extracción de ARN ("TRI reagent solution® de Ambion")   |    |
| Electroforesis no desnaturalizante de ARN               | 57 |
| Extracción DNA por Método de Sales.                     | 61 |
| Digestión con DNAsas                                    | 62 |
| Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)                 | 63 |
| Diseño de cebadores u oligonucleótidos                  | 64 |
| Tabla 5 Concentración de las muestras de ARN extraidas: | 65 |
| Secuencias del gen 18S para A. stellata obtenidas       | 66 |
| Alineamiento Secuencias 18S para diseño de cebadores    | 67 |
| Alineamiento Secuencias 18S Equinodermos                | 73 |

# b)Figuras

| Figura 1: Factores causantes de estrés que inducen la expresión de hsp70                     | 2 |
|--|---|
| Figura 2: Autorregulación de la transcripción de HSP's                                       | 4 |
| Figura 3: Regiones climáticas-biogeográficas marinas   | 6 |
| Figura 4: Electroforesis de los extractos de ARN   |   |
| Figura 5: Electroforesis de los extractos de ARN tratados con DNAsas                         |   |
| Figura 6: Electroforesis de los extractos de ADN   |   |
| Figura 7: Árbol filogenético Equinodermos para diseño de cebadores                           |   |
| Figura 8: PCR del gen 18S usando ADN diluido 1:10 (10%)                                      |   |
| Figura 9: PCR del gen 18S usando ADN rediluido 1:1 (5%)                                      |   |
| Figura 10:PCR del gen 18S usando ADN rediluido 1:1 (2.5%)                                    |   |
| Figura 11:PCR del gen 18S en cDNA  |   |
| Figura 12: PCR del gen 18S en cDNA probando DMSO 5%  |   |
| Figura 13: PCR usando los cebadores específicos y degenerados para hsp70                     |   |
| Figura 14: PCR probando los cebadores específicos para hsp70                                 |   |
| Figura 15: PCR con los cebadores específicos para <i>hsp70</i> (3.5mM de Cl <sub>2</sub> Mg) |   |

| Figura 16: PCR para hsp70 usando cebadores específicos y DMSO 5%  | 34  |
|---|-----|
| <b>Figura 17:</b> Productos de PCR de <i>hsp70</i> en invertebrados marinos (cebadores diseñados para <i>C. antenarius</i> )  | .36 |
| <b>Figura 18:</b> PCR de <i>hsp70</i> usando los cebadores de <i>C. antenarius</i> en ADN de <i>A. stellata</i> (T.M. 51°C)   | .37 |
| <b>Figura 19:</b> PCR de <i>hsp70</i> usando los cebadores de C. antenarius en ADN de A. stellata (Gradiente de 52°C. a 60°C) | .38 |
| Figura 20: Árbol filogenético de A. stellata y otros equinodermos (18S)   | 40  |

# c) Tablas

| Tabla I: Secuencias para el diseño de los cebadores para hsp70 A. stellata.                              | . 18 |
|--|------|
| Tabla II: Secuencias para el diseño de los cebadores para 18S A. stellata.                               | . 19 |
| Tabla III: Reacción de PCR para hsp70 y 18S  | 20   |
| Tabla IV: Programa para el PCR de los genes hsp70 y 18S  | 20   |
| Tabla VI: Concentraciones de ARN tratados con DNAsas   | 23   |
| Tabla VII: Concentraciones de cDNA   | 24   |
| Tabla VIII: Concentraciones de los extractos de ADN genómico   | 25   |
| Tabla IX: Características de los cebadores utilizados  |      |
| <b>Tabla X:</b> Características de los cebadores utilizados para amplificar HSP70 en Cancer   antenarius | 36   |
| Tabla V: Concentración de las muestras de ARN extraidas  | 65   |

#### Introducción

El ambiente marino presenta cambios y fluctuaciones ambientales que son causa de estrés para los organismos que lo habitan. Toda alteración de la homeostasis produce en el organismo estrés (Clark et al., 2008) y una respuesta fisiológica al estrés ambiental en animales es el cambio en la expresión de genes (Aursnes et al., 2011). Uno de estos mecanismo es la producción de proteínas del estrés por choque de calor o "Heat Shock Protein" (HSP por sus siglas en inglés) (Lang et al., 2010). Estas proteínas están presentes tanto en eucariontes como en procariontes y su alto nivel de conservación sugiere que juegan un papel importante en los procesos celulares fundamentales (Kregel, 2002) no solo como un medio de respuesta al estrés ambiental sino también en un amplio rango de procesos del desarrollo embrionario en tejidos que se encuentran bajo procesos de diferenciación y organogénesis (Gunter y Degnan, 2007). Las HSP's son esenciales en procesos de mantenimiento celular, diferenciación y morfogénesis además de protección contra un amplio rango de estrés ambiental (Gunter y Degnan, 2008). Las HSP's fueron descubiertas inicialmente en larvas de Drosophila melanogaster expuestas a un choque de calor (Ritossa, 1962) y estudios subsecuentes han identificado numerosos subconjuntos de estas proteínas en el rango de los 70 kDA, como la HSP72 que se encuentra en núcleo y citoplasma e interviene en el plegamiento de las proteínas y la citoprotección, la HSP73 con función de chaperonas moleculares, HSP75 que es una chaperona molecular en mitocondria y la HSP78 con función de chaperona molecular y citoprotección en el retículo endoplásmico. Además de intervenir en estrés por calor, también intervienen en la respuesta de estrés por intoxicación, acidosis e hipoxia (Figura 1) (**Kregel, 2002**).



**Figura 1:** Factores causantes de estrés que pueden inducir la expresión de *hsp70*, como Reperfusión por Isquemia (R.I.), Especies reactivas de oxígeno y (ERO), Especies reactivas de Nitrógeno (ERN). (Imagen tomada de Kregel, 2002).

Los Factores de choque térmico (HSF), presentes en el citosol, están sujetos a las proteínas de choque térmico (HSP) y se mantienen en un estado inactivo. Los estresores causan la activación de las HSF's y la separación de estas de las HSP's. Las HSF's son fosforiladas y forman trímeros en el citosol que entran al núcleo y se unen a la región promotora del gen de *hsp70*, el transcrito sale al citosol para sintetizar HSP70 para cumplir su función como chaperonas moleculares y el replegamiento de las proteínas desnaturalizadas.

Las HSP's son chaperonas ubicuas que usan la hidrolisis de ATP para comandar varias reacciones de procesamiento de proteínas (incluidas el transporte de proteínas y prevenir la formación de agregados proteicos tóxicos) a través del replegamiento y la liberación de las proteínas antes desdobladas. (Young *et al.*, 2004). Esta actividad está mediada por dos dominios comunes en todos los miembros de las HSP's 70: Dominio de unión de nucleótidos o "nucleotide-binding domain" (NBD por sus siglas en ingles) y el dominio de unión de la proteína substrato o "proteín substrate-binding domain" (SBD por sus siglas en inglés) (Sousa y Lafer, 2006). La unión de esta región al ATP produce el cambio en su conformación estructural que causa el acoplamiento a la molécula sustrato. La hidrolisis del ATP a ADP (con la liberación del Pi) revierte este cambio y asegura el SBD a su substrato (Schmid, *et al.*, 1994, Greene, *et al.*, 1995, Bakau y Horwich, 1998).

Estudios han encontrado que la expresión de *hsp70* y otras HSP's (*hsp40* y *hsp90*) está regulado por el factor de estrés térmico uno o "Heat shock Factor-1" (HSF1 por sus siglas en inglés) estas proteínas bajo condiciones no estresantes se encuentran unidas en un complejo multiproteínico, los cambios de su conformación debido a los incrementos de temperatura hace que estas proteínas se separen, las HSP's se dirigirán hacia las proteínas desplegadas mientras que HSF1 se dirigirá hacia el núcleo e inducirá la expresión de los genes de HSP, y se une a la región promotora elemento de choque de calor ("Heat Shock Elemenet" o HSE por sus siglas en ingles). Trímeros HSF1 con destino a la HSE se vuelven hiper-fosforilados (P) antes de que estén transcripcionalmente competentes. Como los niveles de HSP's aumentan, su unión a

HSF1 provoca su disociación de la HSE, que conduce a una disminución en la transcripción de los genes de HSP's (Fig.2) (Voellmy, 1996, Wu, 1995, Farkas, *et al.*, 1998, Goodson y Sarge, 1995, Larson, *et al.*, 1995, Zhong, *et al.*, 1998, Bienz y Pelham, 1987, Fernandes, *et al.*, 1994, Abravaya *et al.*, 1992; Ali *et al.*, 1998; Baler *et al.*, 1992, 1996, Bharadwaj, *et al.*, 1999, Duina, *et al.*, 1998, Marchler y Wu, 2001, Mosser, *et al.*, 1993, Rabindran, *et al.*, 1994, Shi, *et al.*, 1998, Tomanek y Somero, 2002, Zou, *et al.*, 1998).



**Figura 2:** Modelo de la autorregulación de la transcripción de HSP's. Los monómeros de HSF-1 asociados a complejos compuesto por HSP40, HSP70 y HSP90 que en el estrés térmico se disocian del complejo y se dirigen hacia las proteínas desnaturalizadas, la HSF-1 que se encuentra libre se dirige hacia el núcleo e inducirá la expresión de las HSP's (Imagen tomada de Tomanek y Somero, 2002).

Las proteínas HSP70 son las principalmente expresadas como respuesta al estrés térmico y su expresión ha sido asociado a diferencias de temperatura en diferentes hábitats (**Buckley**, *et al.*, **2001**). La distribución de la temperatura en los océanos se reparte en cinco zonas reconocidas por los oceanógrafos: dos polares, dos templadas y una tropical (fig. 3). La temperatura tiene influencia en las tasas de los procesos fisiológicos y en la actividad reproductiva. Los organismos tienen diferentes termopatías que han desarrollado durante largos períodos geológicos. Por ejemplo, muchos invertebrados marinos tropicales no pueden existir bajo de una temperatura menor de 21°C, mientras que las especies árticas viven constantemente bajo de una temperatura menor de 1.5°C. (Okolodkov, 2010). La distribución biogeográfica de los organismos está en gran medida relacionada a los efectos de la temperatura (**Murawski, 1993**).

Se sabe que los erizos (como la mayoría de los organismos marinos) presentan un rango de tolerancia ambiental en relación a su fenología y fisiología (**Lorente**, *et al.*, **2004**), como es el caso de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo morado) que prefiere temperaturas más altas (18.8 ± 0.2°C. durante el día y 17.4 ± 0.3 °C. durante la noche) que *Strongylocentrotus franciscanus* (erizo rojo) (17.5 ± 0.3 °C durante el día y 16.8 ± 0.4 °C durante la noche), esto sugiere el uso de comportamiento termorreguladores de *S. purpuratus* como un mecanismo de segregación del medio ambiente para evitar la competencia por espacio y alimento con *S. franciscanus* (**Salas** *et al.*, **2012**)



**Figura 3:** Las regiones climáticas-biogeográficas y los intervalos de las temperaturas promedio mensuales (Rass, 1986): A – Ártica, BN – Boreal del Norte, BS – Boreal del Sur, T – Tropical, E – Ecuatorial, NN – Notal del Norte, NS – Notal del Sur, ANT – Antártica.

Los equinodermos (del griego *echinos*: espinoso, *derma*: piel) son organismos deuterostomados, con esqueleto de origen mesodérmico conocido como estereoma (compuesto por numerosas placas u **osículos** con estructura en forma de enrejado y es exclusivo del *phylum*) y exclusivamente marinos que presentan generalmente formas adultas bentónicas (con excepción de algunas holoturias de profundidad de los órdenes *Elasipoda, Aspidochirotida y Apoda*) y larvas planctónicas (**McEdward y Janies 1997**). El *phylum* está constituido por seis clases, las cinco clásicas: *Asteroidea* (estrellas de mar), *Echinoidea* (erizos de mar y dólares de arena), *Ophiuroidea* (ofiuras o estrellas quebradizas), *Holothuroidea* (holoturias o pepinos de mar) y *Crinoidea* (Crinoideos o

lirios de mar) que es la clase más primitiva. En 1986 se incorporó la sexta clase, *Concentricycloidea* (margaritas de mar) (**Baker** *et al.*, **1986; Rowe** *et al.*, **1998**) compuesta tan sólo por el género *Xyloplax*, con dos especies: *X. medusiformis* (localizado en Nueva Zelanda) y *X. turneae* (localizado en las Bahamas). Sin embargo, basándose en ciertas características morfológicas de dichas especies junto con *X. janetae n.sp.* (encontrada en el noreste del océano Pacífico), el análisis cladístico de secuencias de nucleótidos de ADN del gen *18S* ribosomal y la morfología de los ejemplares de la mayoría de los órdenes de equinodermos, han posicionado a la clase *Concentricycloidea* como una infraclase de *Asteroidea* (Janies y Mooi, **1998; Mah, 2006**).

Los equinodermos es un grupo representativo en los fondos marinos (Carney, 2001) y los miembros de este *phylum* son componentes importantes e integrales de las comunidades bentónicas de aguas profundas y pueden ser encontrado en todos los océanos del mundo. (Tyler, 1980; Billett, 1991; Ruhl, 2007), Holotúridos y ofiuroideos son particularmente abundantes (Carney, 2001), pero las especies de una o más de las cinco clases de equinodermos de aguas profundas dominan las comunidades bentónicas en términos de abundancia y/o biomasa en el Océano Ártico (Piepenburg, 2000), el Océano Atlántico (Haedrich *et al.*, 1980; Billett *et al.*, 2001; Lavaleye *et al.*, 2002; Hargrave *et al.*, 2004), el Océano Pacífico (Smith y Hamilton, 1983; Lauerman *et al.*, 1996), el Océano Índico (Rodrigues *et al.*, 2001), el mar Arábigo (Turnewitsch *et al.*, 2000; Murty *et al.*, 2009) y en el mar Antártico (Sumida et al., 2008). El predominio numérico de los equinodermos (holoturias) se extiende incluso a las profundidades abisales del océano (Beliaev, 1989; Herring, 2002).

Además de ser componentes importantes de las comunidades bentónicas de aguas profundas, los equinodermos están también presentes en los ecosistemas pelágicos como consecuencia de los ciclos de vida indirectos de muchas especies, donde una o más etapas del ciclo de vida ocupan la columna de agua antes de que el adulto se depositase en el hábitat bentónico (**Pearse y Lockhart, 2004; Dupont** *et al.*, **2010**).

Equinodermos bentónicos adultos tienen importantes funciones en la estructuración de las características químicas y físicas de sus hábitats, tanto en aguas poco profundas como en los fondos marinos, durante la alimentación y locomoción los equinodermos excavan y remueven el sedimento desplazando las partículas, lo que aumenta la heterogeneidad de los sedimentos y la exposición de los sedimentos anóxicos al oxígeno. Como resultado de ello, contribuyen al mantenimiento de la biodiversidad global de sedimentos y a la respiración bentónica (Smith *et al.*, 2000; Turnewitsch *et al.*, 2000; Lohrer *et al.*, 2005; Vopel *et al.*, 2007; Glud, 2008; Vardaro et al., 2009). La actividad de los equinodermos bentónicos también contribuye al ciclo del carbono orgánico e inorgánico, flujo geoquímico de los sedimentos y a la regeneración de nutrientes en los fondos marinos (Piepenburg, 2000; Smith *et al.*, 2009; Lebrato *et al.*, 2010).

Los Equinodermos son organismos muy valiosos para definir comunidades biológicas marinas como lo han demostrado los estudios en las costas escandinavas y danesas (**Petersen, 1913**), y estudios posteriores hechos en las costas del occidente y sureste de Europa y Norte de África (**Le Danois, 1948**).

Los Equinodermos en general (y muy especialmente los erizos de mar) han tenido y tienen actualmente, una gran importancia en las investigaciones biológicas ya que se pueden obtener embriones factibles de ser manipulados experimentalmente (Wray, 1999), en quien mejor se ha observado y estudiado la fecundación es en el erizo de mar. Probablemente esta fue observada por primera vez en 1845 en la especie Echinus esculentus por von Baer (Harvey, 1956) existen observaciones acerca de la fecundación del erizo Paracentrotus lividus (erizo común o erizo de roca) que datan del año 1876 y fue estudiado por Hertwig. Los estudios de fecundación, segmentación, desarrollo y metamorfosis realizados en Arbacia punctulata (erizo de mar de púas cortas), por Jacques Loeb en 1872 son clásicos. Los óvulos del erizo son células esféricas de unas 100 micras de diámetro, están envueltas en una cubierta gelatinosa, ejercen una atracción sobre los espermatozoides, gracias a sustancias especiales que producen la fertilicina como lo demostró Lillie en 1915 (Loeb, 1872; Hertwig, 1876; Lillie, 1915; Harvey, 1956). Debido a esto y a que se sabe que HSP70 intervienen en los procesos de desarrollo embrionario como en la organogénesis y la diferenciación de tejidos (Gunter y Degan 2007, 2008) también se han utilizado embriones de erizo de mar en el estudio de expresión del gen de *hsp70* como respuesta a estrés por aumento de temperatura (Sconzo et al., 1997; Giudice et al., 1999; Bonaventura et al., 2006).

Los óvulos de la especie *Arbacia stellata* (erizo negro) resultan ser ideales para fines experimentales ya que son células esféricas, por lo que si presentan algún cambio, éste se observa fácilmente y los huevos de este equinoideo son en general bastante duros y resisten cambios no bruscos en el agua de mar como añadir sales, anestésicos u otras sustancias químicas, así como también, cambios de temperatura, luz presión u otros factores físicos (**Caso, 1978**).

La especie *Arbacia stellata* que es reconocible por las grandes superficies desnudas en la zona aboral y la cubierta del ano por placas triangulares. Su color puede ser negro particularmente en juveniles, pero en especímenes más maduros es rojizo, con manchas conspicuas que corren en una forma de estrella abajo de la testa (Lessios, 2005), se puede encontrar en fondos rocosos submareales de 0 a 92 metros de profundidad (Alvarado y Cortez, 2009) en la costa del Pacifico desde Baja California (México) hasta Chile (Herrero-Pérezrul *et al.*, 2008), por lo que este organismo se encuentra frecuentemente sometido a cambios en la temperatura.

La caracterización de los genes de *hsp70* y *18S* ribosomal en *A. stellata* será útil en posteriores estudios de expresión de genes con el fin investigar cómo afecta el estrés ambiental especialmente el relacionado con los cambios de temperatura en el ambiente marino a estos organismos, sobre todo en el desarrollo embrionario y larval ya que durante esta etapa se transportan por las corrientes marinas y se encuentran en un amplio rango de distribución (la costa del pacifico desde Chile hasta Baja California) donde se observa un amplio gradiente de temperatura.

Para poder aislar estos genes se utilizará la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o "Polymerase Chain Reaction" (PCR por sus siglas en inglés) que la podemos considerar como una clonación in vitro, en el sentido de que podemos

amplificar en un tubo de ensayo una secuencia de DNA determinada millones de veces y además en un tiempo mínimo.

La amplificación in vitro del ADN se logra en tres pasos básicos: a).-Desnaturalización del ADN a copiar (molde o diana), incrementando la temperatura para separar las dos cadenas que componen la doble hélice. b).-Alineamiento o hibridación de los cebadores u oligos al ADN molde. Para ello se baja la temperatura de reacción, de forma que pequeñas secuencias de ADN de cadena sencilla (típicamente, entre 12 y 25 bases) se unan a sus secuencias complementarias del ADN diana, de forma que sus extremos 3' apuntan el uno hacia el otro, delimitando la secuencia a amplificar. c).-Copia de las cadenas delimitadas por los cebadores. Se consigue elevando la temperatura de la reacción a la óptima de la polimerasa utilizada. Cada uno de los extremos 3´ de los cebadores apareados a las cadenas directa y reversa serán extendidos, generándose las cadenas hijas correspondientes. El resultado son dos hélices completas en la región delimitada por los cebadores. Un cebador degenerado es un oligonucleótido con ciertas locaciones en las bases de su secuencia que tienen más de un tipo de nucleótido asociado a esta (degenerado). Este es el cebador típicamente diseñado cuando las secuencias específicas de ADN son desconocidas para que sea amplificado. Estos tres pasos de desnaturalización, hibridación y polimerización se repiten "n" veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los oligos. Se trata, pues, de una amplificación exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sinterizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones.

#### Antecedentes

Estudios de expresión de *hsp70* como indicador de estrés térmico se han hecho en organismos como en el abulón *Haliotis asinina* en quien se ha analizado la expresión de *hsp70* y *hsp90* así como del factor de regulación de transcripción de HSP durante el proceso de diferenciación celular de la morfogénesis larval observando la expresión de estos genes durante la diferenciación celular y morfogénesis larval (**Gunter y Degnan**, **2008**). También existen estudios en invertebrados marinos que muestran la sobreexpresión de *hsp70* como un indicador de estrés relacionado con el aumento de la temperatura. Un ejemplo de esto es en el blanqueamiento mortal en la esponja de mar *Xestospongia muta* y en moluscos marinos antárticos *Laternula elliptica* (Bivalvo) y *Nacella concinna* (Gasterópodo) (**Clark** *et al.*, **2008**; **Clark & Peck**, **2009**; **López-Legentil** *et al.*, **2008**) y estudios en moluscos del género *Tegula* han mostrado que la aclimatación (a 13°C, 18°C y 23°C) también puede influir en la expresión de *hsp70* (**Tomanek y Somero**, **2002**).

Una de las estrategias más utilizadas para analizar y cuantificar la expresión del gen *hsp70* es la técnica de PCR en tiempo real, que utiliza moléculas indicadoras fluorescentes para monitorear la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR. Esto combina la amplificación de ADN y los pasos de detección en un ensayo homogéneo y evita la necesidad de electroforesis en gel para detectar los productos de amplificación (**Bustin y Benes 2005**), para la cuantificación relativa de la expresión de un gen blanco, utilizando un gen de referencia, el cual normalmente es un gen constitutivo porque su expresión no debe ser regulada o

influenciada por el procedimiento experimental (**Radonić** *et al.*, **2004**), con base a lo anterior se eligió caracterizar el gen *18S*, ya que es un gen ribosomal y por lo tanto es un gen candidato o ideal para este tipo de análisis.

Existen estudios en donde se ha usado la expresión del gen hsp70 como indicador de respuesta al estrés en fluctuaciones de temperaturas agudas en equinodermos, como es el caso de dos especies de erizo Heliocidaris erythrogramma y Heliocidaris *tuberculata* los cuales fueron expuestos a incrementos de temperatura de 18°C a 20°C,  $25^{\circ}$ C y a  $30^{\circ}$ C, siendo en este último ( $30^{\circ}$ C) donde se encontró una mayor expresión de hsp70 (Nguyen et al., 2012) mientras que en estudios sobre el efecto de la temperatura durante el desarrollo embrionario de la especie Heliocidaris erythrogramma (etapas gástrula, larva y juvenil) donde fueron expuestas a un incremento de 18 a 26°C, el desarrollo fue tolerante a un aumento de 1 a 2 ° C, pero los efectos nocivos significativos fueron evidentes en 3 a 4°C (Byrne et al., 2011). En la especie de erizo, Tripneustes *gratilla* se ha observado que el rango de tolerancia es de  $22^{\circ}$ C a  $29^{\circ}$ C, y las temperaturas fuera de estos rangos tiene efectos en el desarrollo y la sobrevivencia de la especie (Rahman et al., 2009), y en larvas de Strongylocentrotus purpuratus (erizo morado) su tolerancia térmica se ubica a los 27°C y temperaturas mayores a está resultan mortales para las mismas así mismo el cambio de temperatura retrasa la metamorfosis o promueven la metamorfosis incompleta (Díaz-Pérez y Carpizo-Ituarte, 2011). Estudios en el desarrollo embrionario revelaron que un incremento de 12° a 18°C causó alteraciones generalizadas en la expresión génica, incluyendo en los genes implicados en el plegamiento de proteínas, el procesamiento del ARN y el desarrollo, encontrándose

una red de 72 genes involucrados en la respuesta, incluidos hsp70 y hsp90 (Runice et al., 2012).

Los estudios en el desarrollo de larvas de erizo de mar *Paracentrotus lividus* sobre el efecto del incremento de la temperatura durante diferentes etapas han sido desarrollados desde finales de los 90's. Organismos expuestos al incremento de la temperatura durante la etapa de fertilización y la formación de la blástula mueren, mientras que organismos de esta misma especie expuestos al mismo cambio pero en un etapa posterior a la blástula, sobreviven y presentan síntesis de HSPs (**Giudice** *et al.*, **1999**).

Dado que la especie de erizo *Arbacia stellata* se encuentra habitando la zona intermareal, y está expuesto a constantes fluctuaciones de temperatura, la expresión de los genes de HSP's puede servir como un indicador de la tolerancia de los erizos a estas fluctuaciones, y pueden darnos información sobre la capacidad que tienen para adaptarse y sobrevivir en sus límites de tolerancia. La caracterización del gen *hsp70* utilizando al gen de *18S* como gen de referencia proporcionará información útil utilizarlo como bioindicador molecular de respuesta a cambios en la temperatura.

#### Hipótesis

Si la expresión del gen *hsp70* está estrechamente relacionada con la respuesta al estrés térmico, entonces la exposición aguda de *A. stellata* a temperaturas elevadas permitirá su aislamiento y caracterización tanto en ADN como en ARNm, caracterizando a la vez el gen constitutivo *18S* ribosomal como gen de referencia.

#### **Objetivos**

#### **Objetivo General**

Caracterizar el gen HSP70 y 18S en la especie Arbacia stellata.

#### **Objetivos Específicos**

- 1. Estandarizar la extracción de ARN.
- 2. Estandarizar la síntesis de cDNA a partir del ARN extraído.
- 3. Estandarizar la extracción de ADN.
- Diseñar cebadores degenerados para la obtención de fragmentos de los genes de hsp70 y 18S.
- 5. Estandarizar PCR punto final.
- 6. Análisis de los fragmentos y secuencias obtenidas.

#### Metodología

#### Extracción de ARN

Muestras de pies ambulacrales (aproximadamente 100 mg y preservadas en RNA later descrito en el Anexo I y de larvas (aproximadamente 3000 larvas y preservadas en "TRI Reagent<sup>®</sup>" (Ambion)) se recolectaron de *Arbacia stellata* sometidos a un incremento de temperatura hasta su umbral de tolerancia. Posteriormente fueron homogenizadas en tubos eppendorf con perlas de sílica y sirconia de 1mm. de diámetro utilizando un homogenizador de tejidos. El ARN se extrajo de las muestras de pies ambulacrales utilizando el protocolo modificado de "TRI reagent solution (Ambion)" (Anexo II). El ARN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro "NanoVue<sup>®</sup> (General Electric)" y la calidad del ARN se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1.5% con TAE teñido con "GelRed<sup>®</sup> Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium)" incluido en el Anexo III.

#### Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de muestras de aproximadamente 100 mg. de pies ambulacrales de *Arbacia stellata* utilizando el método de sales (AnexoIV). El extracto fue cuantificado por espectrofotometría y su calidad fue evaluada por electroforesis en gel 1.5% de agarosa en TAE teñido con GelRed<sup>®</sup>. El ADN se diluyó inicialmente en una relación 1:10 y se procedió a una dilución seriada para estandarizar el PCR.

#### Digestión del ARN con DNAsas

Para eliminar trazas de ADN genómico que puedan contaminar el ARN se realizó una digestión con DNAsas (Anexo V). Las muestras de ARN tratadas con DNAsas fueron cuantificadas por espectrofotometría y se realizó electroforesis en gel 1.5% de Agarosa en TAE para verificar la integridad de las muestras.

#### Síntesis de ADN complementario (cDNA) por transcriptasa reversa

La síntesis de cDNA utilizando "Improm II Transcriptasa Reversa" (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el cebador de oligo dT (desoxitimidina) para asegurar que sólo el ARN mensajero del ARN total sea transcrito (Anexo VI). Una vez sintetizado el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda

#### bioinformática)

Una búsqueda de secuencias homólogas se realizó para los genes *hsp70* y Ribosomal *18S* incluyendo a los invertebrados filogenéticamente más cercanos a *A*. *stellata*. Por medio del programa "BLAST" se realizó esta búsqueda en la base de datos de "GENBANK" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando los programas "MEGA 5.2" (Tamura, et al., 2011), "BioEdit" y "Sequencher 4.1.4". Una vez realizados el alineamiento múltiple, se identificaron las regiones más conservadas entre las secuencias. A partir de estas regiones se diseñaron cebadores degenerados, utilizando los programas "Perl Primer" (Marshall, 2004) y "primer 3" (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) y se seleccionaron aquellos que reunieran las

mejores características (Anexo VII).

**Tabla I:** Lista de las secuencias a partir de los cuales se diseñaron los cebadores para *hsp70* para *Arbacia stellata*.

| Clave de Acceso | Descripción del Gen               | Especie                                      |
|-----------------|-----------------------------------|--|
| FN667017.1      | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Brissopsis lyrifera (Erizo corazón)          |
| FN796462.1      | hsp70 putativa a partir de ARNm   | Psammechinus miliaris (Erizo verde)          |
| JX035966.1      | hsp70 a partir de ARNm (Parcial)  | Sterechinus neumayeri (Erizo del Antartico)  |
| XR_026557.1     | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| XR_025829.2     | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| XM_775058.3     | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| XM_791153.3     | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| XM_003731468.1  | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| XM_003726066.1  | hsp70 hipotética a partir de ARNm | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo morado) |
| EU930813.1      | hsp70 a partir de ARNm            | Apostichopus japonicus (Pepino de mar)       |
| EU668025.1      | hsp70 a partir de ARNm (Parcial)  | Apostichopus japonicus (Pepino de mar)       |

Tabla II: Lista de secuencias a partir de las cuales se obtuvieron los cebadores para 18S Ribosomal para Arbacia stellata. de Descripción del Gen

Clave

| Acceso     |   |  |
|------------|---|--|
| Z37514.1   | 185 Ribosomal a partir de ADN           | Arbacia lixula (Erizo negro)                       |
| DQ073778.1 | 185 Ribosomal a partir de ADN (parcial) | Arbacia punctulata (Erizo de púas cortas)          |
| L28055.1   | 185 Ribosomal a partir de ADN           | Strongylocentrotus purpuratus (Erizo Morado)       |
| Z37124.1   | 185 Ribosomal a partir de ADN           | Echinodiscus bisperforatus (Galleta de mar)        |
| DQ073779.1 | 185 Ribosomal a partir de ADN (parcial) | Archaeopneustes hystrix (Erizo de zona batial)     |
| AY428816.1 | 185 Ribosomal a partir de ADN (parcial) | Paracentrotus lividus (Erizo común, Erizo de Roca) |
| AM981272.1 | 185 Ribosomal a partir de ADN           | Paracentrotus lividus (Erizo común, Erizo de Roca) |
| Z37131.1   | 185 Ribosomal a partir de ADN           | Salmacis sphaeroides (Erizo tropical)              |

Especie

#### Amplificación del fragmento de hsp70 y Ribosomal 18S en ADN

La amplificación del ADN se llevó a cabo utilizando los cebadores degenerados diseñados para los fragmentos de hsp70 y Ribosomal 18S utilizando PCR punto final. Para esto se utilizó la taq polimerasa "Go Taq<sup>®</sup> (Promega)", en un termociclador "ATC 401<sup>®</sup> (Apollo)".

Las condiciones para amplificación se muestran en las tablas III (componentes de la reacción) y IV (Programa del termociclador). Para comprobar la correcta amplificación de los productos de PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con TBE (Anexo III), y teñido con bromuro de etidio. Los fragmentos que tenían el tamaño esperado se seleccionaron con la ayuda de una escalera de DNA de

100bp (PROMEGA). Una vez identificados los fragmentos, se cortaron las bandas de productos de PCR del gel, y extrajeron utilizando el kit "QIAquick Gel Extraction (QIAGEN)", para enviar a secuenciar.

| Reactivo                | Cantidad para una<br>reacción (15µl.) | Concentración final |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Buffer Go taq (5X)      | 3µl.                                  | 1 X                 |
| MgCl2 (25mM)            | 1.8µl.                                | 3 Mm                |
| Nucleótidos (10mM)      | 0.3µl.                                | 0.2 Mm              |
| Cebador F (10µM)        | 0.3µl.                                | 0.2 Mm              |
| Cebador R (10 µM)       | 0.3µl.                                | 0.2 Mm              |
| Taq Polimerasa (5U/µl.) | 0.075 μl.                             | 0.375 U             |
| Agua libre de nucleasas | 8.225 μl.                             | -                   |
| ADN                     | 1µl ADN gen. 4µl cDNA                 |                     |
| Total                   | 15 μl.                                |                     |

**Tabla III:** Reacción utilizada para amplificar los fragmentos de *hsp70* y 18S

Tabla IV: Programa utilizado para el PCR de los genes hsp70 y 18S

| Etapa                        | Temperatura             | Tiempo      | Repeticiones |
|------------------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| Desnaturalización<br>inicial | 95°C.                   | 2 minutos   | 1            |
| Desnaturalización            | 95°C.                   | 30 segundos | 35 veces     |
| Alineamiento                 | Gradiente 50°C. a 60°C. | 1 minuto    |              |
| Extensión                    | 72°C.                   | 1 minuto    |              |
| Extensión final              | 72°C.                   | 5 minutos   | 1            |
| Finalización de<br>reacción  | 4°C.                    | 5 minutos   | 1            |

#### Alineamiento, análisis de las secuencias y diseño de cebadores específicos

Las secuencias obtenidas del *18S* Ribosomal de la especie *Arbacia stellata*, se editaron utilizando el programa "Chromas 2.4". Las secuencias nucleotídicas se alinearon utilizando el programa "MEGA 5.1" (Tamura, et al., 2011), para obtener finalmente una secuencia consenso. Una búsqueda utilizando "BLAST" se llevó a cabo en la base de datos de "GENBANK", para investigar la similaridad de la secuencia nucleotídica con otras secuencias de *18S* en otras especies. Usando la secuencia obtenida del gen *18S* se alineo con otras secuencias del mismo gen de otros equinodermos y se realizó un árbol filogenético. Finalmente se diseñaron los cebadores específicos a partir de estas secuencias utilizando el programa "Perl Primer" (Marshall, 2004).

#### Resultados

#### Extracción de ARN

Las muestras de larvas tuvieron una concentración menor (de 64.6 ng/µl. a 168.3 ng/µl.) que las de pies ambulacrales (631.1 ng/µl. a 1346.7ng/µl.) y un índice 260/280 de entre 1.65 a 1.95 en larvas y de 1.23 a 1.47 en el caso de pies ambulacrales (Tabla V) (Anexo VIII). En electroforesis (Figura 4) se puede observar las dos Subunidades de ARN ribosomal lo cual nos indica no hubo degradación significativa.



**Figura 4:** Electroferogrma de los extractos de ARN de las muestras de Pies ambulacrales y larvas: 1. Control positivo, 2. Muestra del tubo 5 de larvas (primer lote de extracción), 3. Muestra del tubo 9 de larvas (primer lote de extracción), 4. Muestra del tubo 14 de larvas (segundo lote de extracción), 5. Muestra del tubo 18 de larvas (segundo lote de extracción), 6. Muestra del tubo 25 de larvas (tercer lote de extracción), 7. Muestra del tubo 1 de pies ambulacrales (último lote), 8. Muestra del tubo 39 de pies ambulacrales (último lote).

#### **Digestión con DNAsas**

De los extractos anteriores se seleccionaron las muestras de ARN de pies ambulacrales (debido a que se tenía mayor cantidad) y se les realizó una digestión con DNAsas partiendo de una cantidad inicial de 7µg. y se cuantificaron las muestras con Nanovue (Tabla VI) y corridas en gel de electroforesis 1.5% de Agarosa en TAE para verificar su integridad (Figura 5) obteniéndose una cantidad final de ARN de 4.523 µg en promedio (de 3.624µg a 5.631µg) por lo que se tuvo una pérdida alrededor del 40% de la muestra inicial y un índice 260/280 de 1.25 a 1.47. La electroforesis nos muestra las dos bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S lo cual indica que no hubo degradación significativa (aunque en la muestra # 15 se observa una tercera banda más pequeña lo cual puede tratarse de fragmentos de ARN de tamaño más pequeño o degradación del ARN).

| Muestra                  | Concentración (Ng/µl.) | 260/280 | Total (µg) |
|--------------------------|------------------------|---------|------------|
| #1 de pies Ambulacrales  | 469.3                  | 1.25    | 5.631      |
| #8 de Pies Ambulacrales  | 443.2                  | 1.33    | 5.318      |
| #15 de Pies Ambulacrales | 302.0                  | 1.26    | 3.624      |
| #25 de pies ambulacrales | 337.4                  | 1.30    | 4.048      |
| #21 de pies ambulacrales | 337.3                  | 1.34    | 4.047      |
| #32 de pies ambulacrales | 335.8                  | 1.34    | 4.029      |
| #37 de pies ambulacrales | 378.7                  | 1.47    | 4.544      |
| #38 de pies ambulacrales | 425.5                  | 1.26    | 5.106      |
| #39 de pies ambulacrales | 363.4                  | 1.35    | 4.360      |

Tabla VI: Concentraciones de los extractos de ARN tratados con DNAsas



**Figura 5:** Electroferograma de las muestras de ARN tratadas con DNAsas: 1. Muestra 1 de ARN de pies ambulacrales, 8. Muestra 8 de ARN de pies ambulacrales, 15. Muestra 15 de ARN de pies ambulacrales, 25. Muestra 25 de ARN de pies ambulacrales.

#### Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Se realizó la síntesis de cDNA a partir las muestras de ARN tratadas con DNAsas, partiendo de una cantidad inicial de  $1.5\mu g$ . Estas fueron cuantificadas por Nanodrop (Tabla VII). Se obtuvo en promedio un total de  $12.74\mu g$ , con una concentración de 340.7 ng/µl. a 837.3 ng/µl. y un índice 260/280 de entre 1.61 a 1.81.

| Muestra                  | Concentración (Ng/µl.) | 260/280 | Total (µg.) |
|--------------------------|------------------------|---------|-------------|
|                          |                        |         |             |
| #1 de pies Ambulacrales  | 825.7                  | 1.81    | 14.862      |
| #8 de Pies Ambulacrales  | 837.3                  | 1.84    | 15.017      |
| #15 de Pies Ambulacrales | 681.2                  | 1.66    | 12.261      |
| #21 de pies ambulacrales | 791.8                  | 1.80    | 14.252      |
| #25 de pies ambulacrales | 745.6                  | 1.78    | 13.420      |
| #32 de pies ambulacrales | 707.3                  | 1.78    | 12.731      |
| #37 de pies ambulacrales | 340.7                  | 1.61    | 6.132       |
| #38 de pies ambulacrales | 720.6                  | 1.76    | 12.970      |
| #39 de pies ambulacrales | 723.9                  | 1.77    | 13.030      |

#### Tabla VII: Concentraciones de cDNA

#### Extracción de ADN

El ADN fue extraído probando dos técnicas diferentes, el método de fenolcloroformo, y método de sales. Las muestras de extracto de ADN fueron cuantificadas con Nanovue (Tabla VIII) y corridas en electroforesis con 1.5% de Agarosa en TAE (Figura 6). Por medio del método de fenol cloroformo se obtuvo una concentración de 574.9 ng/µl. y un índice 260/280 de 1.24, en el caso del método de sales se probaron dos tratamientos, en uno se utilizó proteinasa K para homogenizar el tejido y en otro no, en el caso del extracto con proteinasa K se obtuvo una concentración de 811 ng/µl. y un índice 260/280 de 1.61 y en el extracto en donde no se utilizó proteinasa K se obtuvo una concentración de 414.7 ng/µl. y un índice 260/280 de 1.82. Al observar las tres muestras en electroforesis no se observan diferencias significativas entre los métodos de extracción.

Tabla VIII: Concentraciones de los extractos de ADN genómicoMétodo de extracciónConcentración (ng/µl.)Índice 260/280

| Fenol-Cloroformo       | 574.9 | 1.24 |
|------------------------|-------|------|
| Sales con Proteinasa K | 811.0 | 1.61 |
| Sales sin Proteinasa K | 414.7 | 1.82 |



**Figura 6:** Electroforesis de las extracciones de ADN: 1: Extracto con el método Fenol-Cloroformo, 2: Extracto con el método de sales (con proteinasa K), 3: Extracto con el método de sales (sin proteinasa K)

# Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda bioinformática)

Los cebadores usados para amplificar el gen *18S* (a partir de las secuencias de la tabla 1) fueron los siguientes:

Para el diseño de cebadores de *hsp70* primero se determinó cual era la especie filogenéticamente más cercana a *Arbacia stellata* de las especies con las cuales se contaban con secuencias de *hsp70* (Tabla 2). Para esto las secuencias del gen *18S* ribosomal de *Arbacia lixula*, *Arbacia punctulata*, *Psammechinus miliaris*, *Brissopsis lyrifera*, *Strongylocentrotus intermedius* y *Strongylocentrotus purpuratus* (no se encontró secuencias del gen *18S* de *Sterechinus neumayeri*) fueron alineadas en Mega 5.2 (Anexo X) y a partir de este alineamiento se generó un árbol filogenético por el método del "vecino más cercano" ("Neighbor-joining" o NB por sus siglas en inglés) con una prueba "Bootstrap" de 1500 repeticiones. Este árbol indica que *Brissopsis lyrifera* es filogenéticamente más cercana al género *Arbacia (Arbacia lixula y Arbacia punctulata*), mientras que *Psammechinus miliaris* y *Strongylocentrotus purpuratus* son más cercanos entre sí y ubicados en otra rama aparte al del género *Arbacia* (Figura 7).

|    | 100 | gi 665597 emb Z37514.1[_Arbacia lixula                | 1 |
|----|-----|---|---|
| 92 |     | gi 71388439 gb DQ073778.1LArbacia punctulata          |   |
|    |     | gi 665606 emb Z37119.1 _Brissopsis lyrifera           |   |
|    |     | gi 666085 emb Z37149.1 _Psammechinus miliaris         | ٦ |
| L  |     | gi 473551 dbj D14365.1_Strongylocentrotus intermedius |   |
|    | 99  | gi 508546 gb L28055.1 _Strongylocentrotus purpuratus  |   |

**Figura 7:** Árbol filogenético generado por el método "Neighbor-joining" (NB) o "vecino más próximo" con una prueba Bootstrap de 1500 repeticiones, comparando el gen 18S del género Arbacia (Z37514.1: Arbacia lixula, DQ073778.1: Arbacia punctulata) con Brissopsis lyrifera (Z37119.1), Psammechinus miliaris (Z37149.1) y el género Strongylocentrotus (S. purpuratus (L28055.1) y S. intermedius (D14365.1)

Por lo que se diseñaron cebadores específicos diseñados en la secuencia de hsp70

de la especie Brissopsis lyrifera:

#### B.lyr.HSP70\_F 5'GTATTCCAGCATGGCAAGGT3'

#### B.lyr.HSP70\_R 5'TGACAAGCCTGTTGTCGAAG3'

y se diseñaron cebadores degenerados a partir de las mismas regiones en una secuencia consenso:

#### B.lyrHSP70\_FD 5'GTMTTYCAGMATGGVAAGGT3'

#### B.lyrHSP70\_RD 5'KGACNAGVCTNTYRTCRAAG3'

las características de los cebadores utilizados se pueden ver en la tabla IX

| Tabla IX: Características de los cebadores utilizadosNombreSecuencia (5´-3´) |                        | Longitud        | Porcentaje entre Guaninas y | T.M. teórica    | Tamaño de amplicón |
|--|------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|
|  |                        | ( <b>p.b.</b> ) | Citosinas                   | (°C)            | ( <b>P.B.</b> )    |
| Astellata_18S-F  | CAGCAGAGCATGGAATAATGGA | 22 p.b.         | 45%                         | 61°C            | 781 p.b. aprox.    |
| Astellata_18S-R1   | GTACAAAGGGCAGGGACGTA   | 20 p.b.         | 55%                         | 62°C            |                    |
| B.lyr.HSP70_F  | GTATTCCAGCATGGCAAGGT   | 20 p.b.         | 50%                         | 59.96°C         | 661 p.b. aprox.    |
| B.lyrHSP70_R   | TGACAAGCCTGTTGTCGAAG   | 20 p.b.         | 50%                         | 60.02°C         |                    |
| B.lyrHSP70_FD  | GTMTTYCAGMATGGVAAGGT   | 20 p.b.         | 35 % a 55%                  | 47.5°C a 58.0°C | 661 p.b. aprox     |
| B.lyrHSP70_RD  | KGACNAGVCTNTYRTCRAAG   | 20 p.b.         | 30% a 65%                   | 43.4°C a 60.2°C |                    |

•1•
### PCR del gen 18S

De las muestras de ADN, se realizó una dilución seriada y se usó un microlitro de esta en la reacción de PCR en un gradiente de 50°C. a 60°C con un control negativo corrido a 55°C. Las muestras fueron evaluadas por electroforesis. Como resultado las diluciónes 1:10, 1:20 no se obtuvieron amplicones (Figuras 8 y 9) y con la dilución 1:40 se obtuvo un amplicón de aproximadamente 900 p.b. (Figura 10).



**Figura 8:** Electroferograma del PCR usando un microlitro de ADN dilución 1:10 (41.47 ng/µl), gradiente de temperatura: 1. Control negativo (55.5°C), 2. Muestra 1 del gradiente (51.4°C.), 3. Muestra 2 del Gradiente (54.5°C), 4. Muestra 3 del gradiente (56.4°C), 5. Muestra 4 del gradiente (58.6°C), 6. Muestra 5 del gradiente (59.7°C).



**Figura 9:** Electrofotograma de la repetición del PCR usando como templado un microlitro de ADN dilución 1:20 (20.73 ng/µl): 1. Control positivo (600 p.b.), 2. Muestra 1 del gradiente (51.4°C.), 3. Muestra 2 del Gradiente (54.5°C), 4. Muestra 3 del gradiente (56.4°C), 5. Muestra 4 del gradiente (58.6°C), 6. Muestra 5 del gradiente (59.7°C), 7. Control negativo (55.5°C).



**Figura 10:** Electroferograma del PCR usando como templado un microlitro de ADN dilución 1:40 (10.36 ng/μl): **1.** Muestra usando alineamiento de 50°C. **2.** Muestra usando alineamiento de 55°C. **3.** Muestra usando alineamiento de 60°C. **4.** Control negativo usando alineamiento de 55°C. **5.** Escalera de ADN (50 P.B.). El tamaño aproximado del fragmento que se observa es de 800 a 900 p.b.

Al verificar que los cebadores y la reacción de PCR funcionaban correctamente y estableciendo la fase de alineamiento a los 55°C se procedió a probar con el ADN complementario (cDNA) obtenido del ARN extraído usando desde 2 microlitros hasta 5 microlitros de templado, usando como control positivo una reacción usando el ADN genómico donde se ha obtenido el fragmento del gen *18S*. Los productos de PCR fueron evaluados nuevamente en un gel de electroforesis de 1.5% de agarosa en TBE teñido con bromuro de etidio (Figura 11) y no se observó amplificación en ninguna de las muestras experimentales



**Figura 11:** Electroforesis del PCR para el gen 18S probado el pull de cDNA: **1.** Control positivo (amplificación con ADN genómico), **2.** Reacción con cDNA (2µl.), **3.** Reacción con cDNA (3µl.), **4.** Reacción con cDNA (4µl.), **5.** Reacción con cDNA (5µl.), **6.** Control negativo.

Dado que la reacción de PCR con el cDNA no género amplicones se realizó otro ensayo con DMSO al 5% (usando el mismo volumen que se usa de Buffer de PCR y restándolo al agua libre de nucleasas) y se utilizó el programa que se estandarizó para amplificar el gen *18S* en ADN genómico. Este ensayo tampoco generó un producto reconocible ya que solo se observaron dímeros de los cebadores (Figura 12).



**Figura 12**: Electroforesis del PCR del gen *18S* en cDNA probando DMSO 5%: **1**. Control positivo PCR con ADN genómico (1μl.) sin DMSO, **2**. PCR con ADN genómico (1 μl.) con DMSO, **3**. PCR con cDNA (5 μl.) sin DMSO, **4**. PCR con cDNA (5 μl.) con DMSO, **5**. PCR con cDNA nuevo (5 μl.) sin DMSO, **6**. PCR con cDNA nuevo (5 μl.) con DMSO, **7**. Control negativo 1 μl. de Agua sin DMSO, **8**. Control negativo 1 μl. de agua con DMSO.

### PCR del gen hsp70

Dado que ya se había estandarizado el PCR para el gen 18S, se utilizaron las mismas condiciones (concentraciones de reacción, concentración final de ADN y programa de termociclador) utilizando los cebadores específicos y degenerados para *HSP70* en un gradiente de 50°C a 60°C, utilizando como control positivo una reacción amplificando el fragmento del gen *18S* ya obtenido observando que la reacción no amplifico fragmento alguno en ninguna temperatura del gradiente (Figura 13).



**Figura 13:** Electroferograma PCR usando los cebadores para *hsp70*, la hilera superior muestran los resultados con los cebadores degenerados mientras que la inferior muestra los resultados de los cebadores específicos: Hilera superior: **1.** Control negativo, **2.** PCR del gen *185* cDNA., **3.** Control positivo (gen *185* en ADN genómico), **4.** Escalera, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a56.4°C, **6.** PCR *hsp70* alineamiento a 58.6°C, **7.** PCR *hsp70* alineamiento a 60.5°C, **8.** PCR *hsp70* alineamiento a 62.6°C, **9.** PCR *hsp70* alineamiento a 64.3°C. Hilera inferior: **1.** Escalera, **2.** PCR *hsp70* alineamiento a 56.4°C, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a 60.5°C, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a 62.6°C, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a 64.3°C.

Debido a que no se obtuvieron resultados con ninguno de los cebadores con las condiciones ya probadas para el PCR del gen *18S*, se procedió a estandarizar el PCR con los cebadores específicos, repitiendo la reacción con las mismas condiciones solo en tres temperaturas de las cinco del gradiente (50°C, 54.5°C y 59.7°C) confirmándose que los cebadores no amplificaron (Figura 14).



**Figura 14:** electroforesis del PCR probando los cebadores específicos para *hsp70* utilizando las condiciones ya probadas para amplificar el gen *18S* ribosomal: **1.** Fragmento de 18S como control positivo, **2.** Control negativo para *hsp70*, **3.** PCR con alineamiento a 50°C., **4.** PCR con alineamiento a 54.5°C., **5.** PCR con alineamiento a 59.7°C

Debido a que no se obtuvo resultados con este primer ensayo no generó producto alguno, se procedió a repetir el PCR, en esta ocasión aumentando la concentración de  $MgCl_2$  DE 3mM. a 3.5mM. éste el único parámetro que se cambió. En este ensayo tampoco se obtuvo amplificación (Figura 15).



**Figura 15:** PCR del gen HSP70 con 3.5 mM de MgCl2: **1.** Control positivo (producto de PCR del gen *18S*), **2.** PCR *hsp70* alineamiento a 50.3°C, **3.** PCR *hsp70* alineamiento a 52.4°C, **4.** PCR *hsp70* alineamiento a 54.5°C, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a 56.4°C, **6.** PCR *hsp70* alineamiento a 59.7°C, **7.** Control negativo.

El PCR para *hsp70* se volvió a repetir, probando con DMSO al 5% (de la misma manera como se usó en el PCR para el gen *18S*) pero tampoco generó resultados (Figura 16).



**Figura 16:** electroferograma de la prueba de PCR para *hsp70* usando los cebadores específicos y adicionando DMSO 5%: **1 y 2** Controles positivos (producto de PCR del gen *18S*), **3.** PCR *hsp70* alineamiento a 50.3°C, **4.** PCR *hsp70* alineamiento a 52.4°C, **5.** PCR *hsp70* alineamiento a 54.5°C, **6.** PCR *hsp70* alineamiento a 56.4°C, **7.** PCR *hsp70* alineamiento a 59.7°C, **8.** Control negativo.

Dado que ninguna de las estandarizaciones que se realizaron lograron una amplificación positiva para el gen *HSP70* en el erizo *A. stellata*, se decidió utilizar cebadores para *HSP70* diseñados en las regiones conservadas del gen para la especie *Cancer antenarius* (Crustacea: Decapoda) (com. pers. Diego Ibarra, et al.). Estos cebadores se probaron eficientemente en otras especies de invertebrados, donde se observó la amplificación de fragmentos de diferente tamaño (Figura 17). Las características de estos cebadores se muestran en la Tabla X.

| Nombre | Secuencia 5'-3'        | Longitud | Porcentaje G:C | T.M. teórica (°C) | Longitud del Fragmento |
|--------|------------------------|----------|----------------|-------------------|------------------------|
| Fsp2   | TTCAAGCGAAAGTACAAGAAGG | 22 p.b.  | 40%            | 59.36             | 867 p.b.               |
| Rsp2   | GAAACAGTAAGACTCCAGGGC  | 21 p.b.  | 52%            | 60.83             |                        |

1.0

\*Cebadores diseñados por Diego Ibarra



**Figura 17:** electroforesis del PCR probando los cebadores diseñados para *Cancer antenarius* en otras especies de invertebrados marinos: AR – Abulón Rojo, AN – Abulón Negro, Aam – Abulón Amarillo, AAz – Abulón Azul, AV – Abulón verde japonés, RV – Abulón híbrido, VR – Abulón híbrido, Pep – Pepino de mar, Nud – Nudibranquio, Car – Caracol, Alm – Almeja, Pul – Pulpo, Cam – Camarón blanco, Lap – Lapa (Dra Fabiola Lafarga, Laboratoria de acuacultura, CICESE)

La temperatura estandarizada para estos cebadores fue de 51°C, por lo que se realizó un PCR usando esta temperatura (el resto de las condiciones fueron las ya establecidas), y se obtuvieron tres fragmentos principales de aproximadamente 450 p.b., 1000 p.b. y 2000 p.b. respectivamente (Fig.18). Observando este resultado se decidió evaluar estos cebadores en *A. stellata* en un gradiente (dejando las condiciones estándar para el PCR del gen *18S*) notando que generaba un producto único a los 56°C, mientras que temperaturas de alineamiento menores generaba amplificación inespecífica (Figura 19) El fragmento obtenido se enviará a secuenciar, de la secuencia obtenida se obtendrá una secuencia de aminoácido inferida (por medio del programa Mega) para ser comparada con otras secuencias de aminoácidos de HSP70 de la base de datos del "GenBank" ((http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).



**Figura 18:** Electroforesis de la amplificación de ADN *de A. stellata* utilizando los cebadores diseñados para *C. antenarius*, observándose amplificación inespecífica y tres fragmentos de aproximadamente 450, 1000 y de casi 2000 pares de bases.



**Figura 19:** Electroforesis del PCR de *hsp70* usando los cebadores para *C. antenarius* en el ADN de *A. stellata*: **1.** Control positivo de 18S de *A. stellata* (55.6°C.)**2.** Control negativo de 18S de *A. stellata* (55.6°C.), **3.** PCR de HSP70 de *A. stellata* (52.2°C.), **4.** PCR de HSP70 de *A. stellata* (53.9°C.), **5.** PCR de HSP70 de *A. stellata* (56.4°C.) **6.** PCR de HSP70 de *A. stellata* (58.1°C.) **7.** PCR de HSP70 de *A. stellata* (59.8°C.), **8.** Control negativo de HSP70 de *A. stellata* (55.6°C.)

#### Alineamiento, análisis de las secuencias

El fragmento del gen 18S ribosomal obtenido se envió a secuenciar (ambas cadenas) (Anexo IX) las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de los programas Chromas y Sequencher 4.1.4 y editadas para obtener secuencia consenso (Anexo X). Esta secuencia analizó "Blast" la de datos del GenBank se con con base (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) encontrando que la secuencia obtenida coincidió para los gen 18S ribosomal de equinodermos, entre estas secuencias de especies del género Arbacia con 99% de similitud (A. punctulata y A. lixula), otros equinoideos (como Paracentrotus lividus y Strongylocentrotus purpuratus) y se incluyen asteroideos (Astropecten polyacanthus, Odontaster validus y Odontaster meridionalis).

Un árbol filogenético se construyó por el método de máximo verosimilitud ("Bootstrap" de 1500 repeticiones) a partir de un alineamiento de la secuencia obtenida de A. stellata comparándolo con otras especies del género Arbacia (A. lixula y A. punctulata), otras especies de erizos (Psammechinus miliaris, Brissopsis lyrifera y Strongylocentrotus purpuratus) y especies del orden Clypeasteroida conocidos comúnmente como dólares de arena o galletas de mar (Echinocyamus pusillus, Echinodiscus bisperforatus, Encope aberrans, Fellaster zelandiae y Rumphia orbicularis) y se utilizó como grupo externo al pepino de mar Apostichopus japonicus (Anexo XI), encontrando que la especie A. stellata se encuentra emparentada en la mismo taxón donde se ubica los miembros del género Arbacia, observándose que es más cercana a A. punctulata y excluyendo a A. lixula en otra subtaxa. Muy relacionado al género Arbacia se encuentran los erizos de mar Strongylocentrotus purpuratus y Psammechinus miliaris emparentados con la galleta de mar Fellaster zelandiae mientras que el resto de las galletas de mar se ubicaron en otro taxón emparentados con el erizo de mar Brissopsis lyrifera (Figura 20)



**Figura 20:** Árbol filogenético comparando el gen *18S* obtenida de *A. stellata* con del género Arbacia (Z37514.1: *Arbacia lixula*, DQ073778.1: *Arbacia punctulata*) con los erizos *Brissopsis lyrifera* (Z37119.1), *Psmmechinus miliaris* (Z37149.1) y *Strongylocentrotus purpuratus* (L28055.1), los dólares de arena *Echinocyamus pusillus* (DQ073787), *Echinodiscus bisperforatus* (Z37124.1), *Encope aberrans* (Z37126.1), *Fellaster zelandiae* (Z37128.1) y *Rumphia orbicularis* (DQ073793) que pertenecen a la clase *Clypeasteroida* y están señalados con un asterisco y usando como grupo externo al pepino de mar *Apostichopus japonicus* (AB595141). Árbol generado por el programa Mega por el método de Máxima verosimilitud (Bootstrap de 1500 repeticiones).

#### Discusiones

#### Extracción de ARN

El uso de los equinoideos en estudios científicos sobre la expresión génica plantea la pregunta de qué tipo de tejido utilizar según el tipo de investigación que se realiza, si son utilizados como modelos del desarrollo embrionario y larval o de la respuesta fisiológica en los adultos a diferentes factores ambientales. Una de las opciones de tejido en los adultos es la gónada, pero si el organismo no se encuentra en una etapa de desarrollo sexualmente maduro, esta es inexistente. Además de que la gónada es un tejido que limita los estudios de expresión génica, el tipo de tejido que se debe utilizar debe estar directamente relacionado con los genes y la respuesta fisiológica que se quiere evaluar. La gónada es un órgano no solo con funciones reproductivas si no también con funciones de reserva energéticas por lo que no solo se ve afectado por el desarrollo reproductivo sino también por la alimentación **(Lozano et al., 1995)**.

La estructura de los pies ambulacrales tiene como funciones la locomoción, el intercambio gaseoso, la fijación al sustrato y la percepción sensorial, al estar compuesta por capas de tejido conectivo y musculo liso con inervación nerviosa, es debido a su composición por lo que este tejido ha sido utilizado como modelo de estudio en la expresión del gen de actina (proteína encontrada en el músculo liso) en especies del género *Arbacia y Strongylocentrotus* (Florey y Cahill, 1977, Kabat-Zinn y Singer, 1981).

Mientras que el tejido larval muestra un mayor reto para la obtención de suficiente cantidad de ARN, debido a que éstas por lo regular son de tamaño pequeño (por ejemplo en la especie *Lytechinus variegatus* va de 140 a 425 micras, dependiendo de su estadio). No

obstante lo anterior, han sido exitosamente utilizadas para realizar estudios de expresión de los genes de *HSPs*, debido principalmente a dos factores: 1) la importancia de éstas proteínas como chaperonas durante el desarrollo larval y 2) la sensibilidad de las larvas ante cambios ambientales abruptos, como lo son altas temperaturas (**Sconzo** *et al.*, **1997**; **Giudice** *et al.*, **1999**; **Gómez y Gómez, 2005**; **Bonaventura** *et al.*, **2006**; **Gunter y Degan 2007**, **2008**; **Rahman** *et al.*, **2009**; **Hammond y Hofmann**; **2010**; **Byrne** *et al.*, **2011**; **Díaz-Pérez y Carpizo-Ituarte, 2011**; **Runice** *et al.*, **2012**)

Al comparar extracciones de diferentes tejidos, observamos que de las muestras de pies ambulacrales se obtuvo mayor cantidad de ARN que de las muestras de larvas. Sin embargo al realizar el análisis cualitativo en nanodrop, los valores de la relación entre las absorbancias 260 (ARN) y 280 (Proteína) obtenidos , indicaron que las extracciones de ARN realizadas en larvas son relativamente libre de proteína, así como los valores entre 1.8 a 2.1 en el índice de la relación 260 y 230 (sales y solventes) indica muestras libres de compuestos fenólicos, sales de guanidina/amonio, alcohol y otros solventes, por lo que en las muestras de larvas a pesar de obtener una menor cantidad, se obtiene ARN más *limpio*, libres de sales, solventes y/o proteínas que puedan disminuir las solubilidad de los ácidos nucleicos e interferir o inhibir con las reacciones enzimáticas de la Retrotranscriptasa o la Taq Polimerasa (**Padmalatha y Prasad, 2006; Rio et al., 2010**). El ARN obtenido de los pies ambulacrales se encuentra menos "limpio", debido probablemente a la presencia de pigmentos, los cuales son co-precipitados con el ARN.

#### Extracción de ADN genómico

Los métodos probados para la extracción de ADN en pies ambulacrales fueron el método de Fenol-Cloroformo y el método de sales el cual posee la ventaja de que no se

utilizan reactivos tóxicos como el Fenol y el Cloroformo, compuestos que además son inhibidores de la reacción de PCR (**Edwards** *et al.*, **1991**). El extracto por el método Fenol-Cloroformo presentó una menor concentración (574.9 ng/µl.) y un bajo índice 260/280 (1.24) lo cual indica baja pureza. Los extractos de ADN obtenidos por el método de sales presentaron concentraciones de 414.7 ng/µl. (sin proteinasa K) a 811.0 ng/µl. (con proteinasa K) y valores del índice de relación 260/280 de 1.61 (proteinasa K) y 1.82 (sin proteinasa K) por lo que las muestras de ADN obtenidas por el método de sales muestran mayor concentración y pureza sin la proteinaza K. En cuanto a la integridad del ADN, el gel de electroforesis no mostró diferencias entre los métodos. La dilución seriada baja la concentración de las trazas de contaminantes que pudieran alterar los resultados además de ajustar la concentración de ADN a una concentración adecuada para el PCR que resultó ser a los 10.36 ng/µl. Por lo que el método de sales es una buena opción de extracción de ADN para utilizarlo en amplificación por PCR.

## Búsqueda de secuencias y diseño de cebadores degenerados (búsqueda

#### bioinformática)

Para el diseño de los cebadores que se utilizan para aislar un gen cuya secuencia es desconocida, se emplean dos estrategias: La primera consiste en diseñar un par de cebadores degenerados que contengan todas las secuencias nucleotidicas posibles de un alineamiento múltiple (**Jabado** *et al.*, **2006**) (es el caso de los cebadores para *HSP70*: B.lyrHSP70\_FD y B.lyrHSP70\_RD), el problema con esta técnica es que a medida que la degeneración aumenta, la concentración de cualquier cebador único disminuye (**Rose** *et al.*, **1998**) y como resultado, el número de moléculas de cebador en una reacción de PCR que puede cebar la síntesis durante los ciclos de amplificación baja y estos son gastados

muy pronto en la reacción, aunado a esto, la amplificación de artefactos se produce debido a la dominación de los cebadores que no participan en la amplificación del gen objetivo, pero están disponibles para la síntesis inespecífica. Esto produce que la banda de nuestro gen de interés sea débil o indetectable en un gel donde él fondo puede ser predominante (Rose et al., 1998). La segunda estrategia es diseñar un único cebador consenso en toda la región altamente conservada (como es el caso de los cebadores para 18S: Astellata 18S-F y Astellata\_18S-R1, y los de HSP70: B.lyrHSP70\_F y B.lyrHSP70\_R). El cebador consenso se deriva generalmente por elegir el nucleótido más común en cada posición de las secuencias de nucleótidos del alineamiento múltiple, aunque esta técnica ha tenido más éxito en el aislamiento de genes homólogos altamente conservados, posibles desajustes entre el cebador y el templete excluyen su aplicación a secuencias relacionadas lejanamente (Rose et al., 1998, 2003; Boyce et al., 2009). Con base en lo anterior estas estrategias son viables cuando se tienen secuencias altamente conservadas (como el 18S ribosomal), se conocen las regiones homologas del gen que se estudia (como NBD y SBD de HSP70) o cuando se cuentan con secuencias del gen en especies filogenéticamente muy cercanas (del mismo género de ser posible) a la especie que se está estudiando.

#### PCR de los genes 18S y hsp70

En el PCR del gen *18S* ribosomal se utilizaron la pareja de cebadores Astellata\_18S-F y Astellata\_18S-R1, los cuales tienen un temperatura de alineamiento teórica de 61.5°C, pero el gradiente del termociclador no mostro diferencias entre las temperaturas de alineamientos de 50°C., 55°C. y 60°C., por lo que el protocolo del PCR fue estandarizado con 55°C de temperatura de alineamiento. La concentración en la dilución de ADN que se usó quedó a 10.36 ng/µl. utilizando un microlitro para una reacción total de

15μl. por lo que la concentración final de templete en la cual el producto fue amplificado fue de 0.69 ng/μl. Se amplificó un único producto de aproximadamente 800 pares de bases.

En el caso del gen para *hsp70*, los cebadores que produjeron los productos están diseñados en secuencias de crustáceos para amplificar un fragmento de aproximadamente 867 p.b. por lo que de los tres productos obtenidos, el segundo se acerca al tamaño esperado, sin embargo se deben secuenciar los productos obtenidos y analizar las secuencias.

#### Alineamiento, análisis de las secuencias

Es importante determinar la especie con la cual se realizó el aislamiento de los genes, particularmente porque algunas veces puede haber confusión debido a la similitud fenotípica entre algunas especies. Los genes ribosomales (como 185 y 285) y mitocondriales (como el Citocromo oxidasa I o COI) son utilizados para estudios de parentesco entre especies, en el caso de equinodermos y especialmente del género Arbacia, se han hecho estudios con el gen COI (De Giorgi et al., 1991; Metz et al., 1998; Lessios et al., 2012; López et al., 2012). Mientras que con genes ribosomales (entre los cuales se incluye 185) se ha utilizado en estudios de filogenia en artrópodos (Aleshin y Petrov, 1999; Giribet y Rivera, 2000) y en el caso de equinodermos como holotúridos y asteroideos (Janice y Mooi, 1998; Janice, 2001; Lacey et al., 2005), se han hecho comparaciones del género Arbacia con otros equinodermos usando ensambles de genes ribosomales y mitocondriales (Bromham y Degnan, 1999) generando arboles mediante los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud.

De la secuencia del gen *18S* obtenida y del árbol filogenético que se generó de las secuencias comparadas, se puede observar que la especie de estudio *A. stellata* guarda parentesco con las otras especies del género *Arbacia* de las cuales se encontró secuencias en la base de datos (*A. punctulata* y *A. lixula*). A pesar de tener pocas secuencias disponibles del gen *18S* en otras especies del género *Arbacia* y que no se realizó una comparación entre todas las clases de equinodermos si es posible notar las relaciones entre la especies del género estudiado.

#### Conclusiones

Con los protocolos comparados el ARN extraído de pies ambulacrales es más abundante pero contiene pigmentos de la especie (que le dan su color característico).

La extracción de ADN por medio del método de sales fue más efectiva que con el método de Fenol-Cloroformo, además de ser más segura por no usar sustancias químicas tóxicas.

La secuencias del gen *18S* ribosomal se encuentra altamente conservada y debido a esto es sencillo su aislamiento y amplificación en especies donde aún no se conoce.

La secuencia del gen *18S* ribosomal obtenida de *A. stellata* comparada con las secuencias del mismo gen en dos especies del género *Arbacia* (*A. lixula* y *A. punctulata*) y otros equinodermos muestra que existe parentesco entre la especie de estudio y las otras dos especies del mismo género, confirmando que se trata de la especie *A. stellata*.

El gen *hsp70* posee una región conservada que es compartida tanto por el equinoideo *A. stellata* como por otros invertebrados (moluscos y crustáceos) que es amplificada por los cebadores que se utilizaron.

#### Recomendaciones

Los fragmentos obtenidos se deben secuenciar los fragmentos obtenidos con los cebadores de *hsp70* y hacer su respectivo análisis.

Sobre la filogenia de la especie *A. stellata* se deben de hacer estudios utilizando otras secuencias del gen *18S* ribosomal cuando estén disponibles.

En próximas extracciones de ARN de esta especie, utilizar mayor cantidad de larvas o en el caso de pies ambulacrales usar kits de purificación de ARN.

Se deben diseñar cebadores específicos con el fin de analizar estos genes con PCR tiempo real (fragmentos pequeños de alrededor de 200 p.b.).

#### Bibliografía

- Abravaya, K., Myers, M. P., Murphy, S. P. y Morimoto, R. I. (1992). The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* 6, 1153–1164.
- Aleshin V.V.y Petrov N.B. (1999). Implicaciones del gen 18S ARNr en la evolución y filogenia de losArthropoda: Evolución y Filogenia de Arthropoda. *Boletín dela Sociedad Entomológica Ar* agonesa, núm. 26. Eds Melic A., de Haro J.J., Méndez M., Ribera I. Zaragoza: SEA, p. 177– 196.
- Ali, A., Bharadwaj, S., O'Caroll, R. y Ovsenek, N. (1998). Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in Xenopus oocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4949–4960.
- Alvarado, J.J. y Cortés j. (2009). Echinoderms. pp. 421-434. In I.S. Wehrtmann, J. Cortés (eds.) Marine biodiversity of Costa Rica, Central America. Springer 538 p.
- Aursnes, I. a, Rishovd, A. L., Karlsen, H. E., y Gjøen, T. (2011). Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (Gadus morhua l.) during temperature stress. *BMC research notes*, 4(1), 104.
- Bakau, B., y Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
- Baker, N.F., Rowe, F. W. E. y Clark, H. E. S. (1986). A new class of Echinodermata from New Zeland. *Nature* 321: 862-864
- Baler, R., Welch, W. J. y Voellmy, R. (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: HSP70 as a potential autoregulatory factor. J. *Cell Biol.* 117, 1151–1159.
- Baler, R., Zou, J. y Voellmy, R. (1996). Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 1, 33–39.
- Beliaev, G.M., (1989). Deep Sea Ocean Trenches and their Fauna. Translated by Mira Beerbaum 2004. originally published: Nauka Publishing House, Moscow, accessed from Scripps Institution of Oceanography Library, San Diego, 177.
- Bharadwaj, S., Ali, A. y Ovsenek, N. (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. Mol. *Cell. Biol.* 19, 8033–8041.
- Bienz, M. y Pelham, H. R. B. (1987). Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet.* 24, 31–72.
- Billett, D.S.M., (1991). Deep-sea holothurians. *Oceanography and marine biology*: an annual review 29, 259-317.

- Billett, D.S.M., Bett, B.J., Rice, A.L., Thurston, M.H., Galeron, J., Sibuet, M. y Wolff, G.A., (2001). Longterm change in the megabenthos of the Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic). *Progress in Oceanography* 50, 325-348.
- Bonaventura, R., Poma, V., Russo, R., Zito, F., y Matranga, V. (2006). Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology*, 149(1), 79-86.
- Boyce, R., Chilana, P., y Rose, T. M. (2009). iCODEHOP: a new interactive program for designing COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic acids research*, *37*(suppl 2), 222-228.
- Bromham, L. D., y Degnan, B. M. (1999). Hemichordates and deuterostome evolution: robust molecular phylogenetic support for a hemichordate+ echinoderm clade. *Evolution & development*, 1(3), 166-171.
- Buckley, B. A., Owen, M-E. y Hofmann, G. E. (2001). Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat shock response in intertidal mussels (genus Mystilus) changes as a function of thermal history. *The Journal of Experimental Biology* 204, pages 3571-3579
- Bustin SA y Benes V.( 2005). Quantitative real-time PCR—a perspective. J Mol Endocrinol 34: 597–601.
- Byrne, M., Selvakumaraswamy, P., Ho, M. A., Woolsey, E., y Nguyen, H. D. (2011). Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules. Deep Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography*, 58(5), 712-719.
- Carney, R.S., (2001). Management applicability of contemporary deep-sea ecology and reevaluation of Gulf of Mexico studies. Final Report. OCS Study MMS2001-095. U.S. Department of the Interior Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region Office, New Orleans, LA. 174 pp.
- Caso, M. E. 1978. Ciencia y técnica de los Equinodermos en relación con el hombre. Primera parte, aspecto científico. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol*. Univ. Nal. Autón. México, 5 (1): 255-286.
- Clark, M. S., Fraser, K. P. P., y Peck, L. S. (2008). Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell stress & chaperones*, *13*(1), 39–49.
- Clark, M. S., y Peck, L. S. (2009). HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Marine genomics*, 2(1), 11–8.
- De Giorgi, C., Lanave, C., Musci, M. D., y Saccone, C. (1991). Mitochondrial DNA in the sea urchin Arbacia lixula: evolutionary inferences from nucleotide sequence analysis. *Molecular biology and evolution*, 8(4), 515-529.
- Díaz-Pérez, L., y Carpizo-Ituarte, E. (2011). Efecto del estrés térmico en la supervivencia y el retraso de la metamorfosis en larvas del erizo morado Stonglyocentrotus purpuratus. *Ciencias Marinas*, *37*, 403–414.

- Duina, A. A., Kalton, H. M. y Gaber, R. F. (1998). Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *J. Biol. Chem.* 273, 18974–18978.
- Dupont, S., Ortega-Martínez, O. y Thorndyke, M., (2010). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19 (3), 449-462.
- Edwards, K., Johnstone, C., y Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, *19*(6), 1349.
- Farkas, T., Kutskova, Y. A. y Zimarino, V. (1998). Intramolecular repression of mouse heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 906–918.
- Fernandes, M., O'Brien, T. y Lis, J. T. (1994). Structure and regulation of heat shock gene promoters. In The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones (ed. R. I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos), pp. 375–393. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Florey, E., y Cahill, M. A. (1977). Ultrastructure of sea urchin tube feet. *Cell and tissue research*, 177(2), 195-214.
- Giribet, G., y Ribera, C. (2000). A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics*, *16*(2), 204-231.
- Giudice, G., Sconzo, G., y Roccheri, M. C. (1999). Studies on heat shock proteins in sea urchin development. *Development, growth & differentiation*, 41(4), 375-80.
- Glud, R.N. (2008). Oxygen dynamics of marine sediments. *Marine Biology Research* 4 (4), 243-289.
- Gómez, O. y Gómez, A. (2005). Desarrollo embrionario y larval de Lytechinus variegatus (Echinoidea: Toxopneustidae) en condiciones de laboratorio en la Isla de Margarita-Venezuela. *Rev. Biol. Trop*, 53(3), 313-318.
- Goodson, M. L. y Sarge, K. D. (1995). Heat-inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1. J. Biol. Chem. 270, 2447–2450.
- Greene, L. E., Zinner, R., Naficy, S., y Eisenberg, E. (1995). Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 2967-2973.
- Gunter, H. M., y Degnan, B. M. (2007). Developmental expression of Hsp90, Hsp70 and HSF during morphogenesis in the vetigastropod Haliotis asinina. *Development genes and evolution*, 217(8), 603–12.
- Gunter, H. M., y Degnan, B. M. (2008). Impact of ecologically relevant heat shocks on Hsp developmental function in the vetigastropod Haliotis asinina. *Journal of experimental zoology*. *Part B, Molecular and developmental evolution*, 310(5), 450–64.

- Haedrich, R.L., Rowe, G.T. y Polloni, P.T. (1980). The megabenthic fauna in the deep sea south of New England, USA. *Marine Biology* 57 (3), 165-179.
- Hammond, L. M. y Hofmann, G. E. (2010). Thermal tolerance of Strongylocentrotus purpuratus early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine biology*, *157*(12), 2677-2687.
- Hargrave, B.T., Kostylev, V.E. y Hawkins, C.M., (2004). Benthic epifauna assemblages, biomass and respiration in The Gully region on the Scotian Shelf, NW Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 270, 55-70.
- Harvey, E. B. (1956). The American Arbacia and other sea urchins (Vol. 298). Princeton, NJ: Princeton University Press. pps. 17, 92,93 y 101.
- Herrero Perezrul M. D., Reyes Bonilla H., Gonzalez Azcarraga A., Cintra Buenrostro C.E. y Rojas Sierra A. (2008).Equinodermos. Bahía de los Ángeles: Recursos Naturales y Comunidad. Línea base 2007. SEMARNAT-INE-PRONATURA NOROESTE, SAN DIEGO NATURAL HISTORY MUSEUM. 12. 339-361.
- Herring, P., (2002). The biology of the deep ocean. Oxford University Press, Oxford p. 290.
- Hertwig, O. (1876). Beiträge zur Kentniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. Morph. Jahrb. i : 347-434.
- Jabado, O. J., Palacios, G., Kapoor, V., Hui, J., Renwick, N., Zhai, J. y Lipkin, W. I. (2006). Greene SCPrimer: a rapid comprehensive tool for designing degenerate primers from multiple sequence alignments. *Nucleic acids research*,34(22), 6605-6611.
- Janies, D. y Mooi, R. (1998). Xyloplax is an asteroid. Echinoderm research, 311-316.
- Janies, D. (2001). Phylogenetic relationships of extant echinoderm classes. *Canadian Journal of Zoology*, 79(7), 1232-1250.
- Johnson, C. R. (2013). Echinoderms in a Changing World. In 13th International Echinoderm conference p. 318.
- Kabat-Zinn, J., y Singer, R. H. (1981). Sea urchin tube feet: unique structures that allow a cytological and molecular approach to the study of actin and its gene expression. *The Journal of cell biology*, 89(1), 109-114.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 92(5), 2177– 86.
- Lacey, K. M., McCormack, G. P., Keegan, B. F., y Powell, R. (2005). Phylogenetic relationships within the class Holothuroidea, inferred from 18S rRNA gene data. *Marine Biology*, 147(5), 1149-1154.

- Lang, R. P., Bayne, C. J., Camara, M. D., Cunningham, C., Jenny, M. J., y Langdon, C. J. (2010). Transcriptome profiling of selectively bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.), 11(5), 650–68.
- Larson, J. S., Schuetz, T. J. y Kingston, R. E. (1995). In vitro activation of purified human heat shock factor by heat. *Biochemistry* 34, 1902–1911.
- Lauerman, L.M.L., Kaufmann, R.S. y Smith, K.L., (1996). Distribution and abundance of epibenthic megafauna at a long time-series station in the abyssal northeast Pacific. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 43 (7), 1075-1103.
- Lavaleye, M.S.S., Duineveld, G.C.A., Berghuis, E.M., Kok, A. y Witbaard, R., (2002). A comparison between the megafauna communities on the N.W. Iberian and Celtic continental margins effects of coastal upwelling? *Progress in Oceanography* 52 (2-4), 459-476.
- Le Danois, Ed., (1948). Les Profondeurs de la Mer. Trente Ans de Recherches sur la Faune Sousmarine au Large des Côtes de France. Bibliotheque Scientiphique, Ed. Payot, Paris, 303p.
- Lebrato, M., Iglesias-Rodriguez, D., Feely, R., Greeley, D., Jones, D., Suarez-Bosche, N., Lampitt, R., Cartes, J., Green, D. y Alker, B., (2010). Global contribution of echinoderms to the marine carbon cycle: a re-assessment of the oceanic CaCO3 budget and the benthic compartments. *Ecological Monographs* 80 (3), 441-467.
- Lessios, H. A. (2005). Echinoids of the Pacific waters of Panama: status of knowledge and new records. *Revista de biología tropical*, 53, 147.
- Lessios, H. A., Lockhart, S., Collin, R., Sotil, G., SANCHEZ-JEREZ, P., Zigler, K. S. y Kessing, B. D. (2012). Phylogeography and bindin evolution in Arbacia, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Molecular ecology*,21(1), 130-144.
- Lillie, F. R. (1915). The fertilizing power of sperm dilutions of Arbacia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1(3), 156.
- Loeb, J. (1892). Investigations in physiological morphology. III. Experiments on cleavage J. Alorph. 7: 253-262.
- Lohrer, A.M., Thrush, S.F., Hunt, L., Hancock, N. y Lundquist, C., (2005). Rapid reworking of subtidal sediments by burrowing spatangoid urchins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321 (2), 155-169.
- López, C., Regales-Pérez, N., Martín-Carrillo, N., Solé-Sabaterb, M., Hernándeza, J.C. y Hernández, M. (2012). Estatus taxonómico de dos especies de equinoideos presentes en Canarias: Arbacia lixula y Arbaciella elegans, ¿Quién es quién?. *Revista de Investigación Marina*, 19(6) 431-432
- López-Legentil, S., Song, B., McMurray, S. E., y Pawlik, J. R. (2008). Bleaching and stress in coral reef ecosystems: HSP70 expression by the giant barrel sponge Xestospongia muta. *Molecular ecology*, 17(7), 1840–9.

- Lorente, I. D., Gamo, J.L., Gómez, R., Santos, L., Flores, A., Camacho, L., Galindo, J. y Navarro (2004). Los efectos biológicos del cambio climático (2004). *Ecosistemas* 13 (1): 103-110. Enero.
- Lozano, J., Galera, J., López, S., Turon, X., Palacín, C., y Morera, G. (1995). Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar. Ecol.* Prog. Ser, 122, 179-191.
- Mah, C.L. (2006). A new species of *Xyloplax* (*Echinodermata: Asteroidea: Concentricycloidea*) from the northeast Pacific: comparative morphology and a reassessment of phylogeny. *Inv. Biol.* 125: 136-146.
- Marchler, G. y Wu, C. (2001). Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone *DROJ1*. *EMBO J*. 20, 499–509.
- Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* (Oxford, England), 20(15), 2471–2.
- McEward, L.R. y Janies, D.A. (1997). Relationships among development, ecology and morphology in the evolution on echinoderm larvae and life cycles. *Biol. J. Linnean Soc.* 60: 381-400.
- Metz, E. C., Gómez-Gutiérrez, G., y Vacquier, V. D. (1998). Mitochondrial DNA and bindin gene sequence evolution among allopatric species of the sea urchin genus Arbacia. *Molecular Biology and Evolution*, 15(2), 185-195.
- Mosser, D. D., Duchaine, J. y Massie, B. (1993). The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated in vivo by HSP70. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5427–5438.
- Murawski S. A. (1993). Climate-Change and marine fish distributions forecasting from historical analogy. *Transactions of the american fisheries society*, 122 (5), 647-658.
- Murty, S.J., Bett, B. y Gooday, A., (2009). Megafaunal responses to strong oxygen gradients on the Pakistan margin of the Arabian Sea. Deep-Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography* 56, 472-487.
- Nguyen, H. D., Byrne, M., y Thomson, M. Chapter 23. HSP70 expression in the south-eastern Australian sea urchins Heliocidaris erythrogramma and H. tuberculata. Pag: 213-217. In: Criag Johnson 2012 Echinoderms in a Changing World, Proceedings of the 13th International Echinoderm Conference, January 5-9 2009, University of Tasmania, Hobart Tasmania, Australia. CRC Press.
- Okolodkov, Y.B. (2010). Biogeografía Marina. Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, 53pp.
- Padmalatha, K., y Prasad, M. N. V. (2006). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (3), pp. 230-234

- Pearse, J. y Lockhart, S. (2004). Reproduction in cold water: paradigm changes in the 20th century and a role for cidaroid sea urchins. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 51, 1533-1549.
- Petersen, C.G.J. (1913). Valuation of the sea. 2. The animal communities of the sea bottom and their importance for marine zoogeography.--*Rep. Dan. Biol. Ann. Rev.* 16: 229-311.
- Piepenburg, D., (2000). Arctic brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). Oceanography and marine biology: *an annual review* 38, 189-256.
- Rabindran, S. K., Wisniewski, J. A. N., Li, L., Li, G. C. y Wu, C. (1994). Interaction between heat shock factor and HSP70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6552–6560.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. y Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856–862.
- Rahman, S., Tsuchiya, M., y Uehara, T. (2009). Effects of temperature on hatching rate, embryonic development and early larval survival of the edible sea urchin, Tripneustes gratilla. *Biologia*, 64(4), 768–775.
- Rass, T. S. (1986). Vicariance ichthyogeography of the Atlantic Ocean pelagial. p. 237-241. In: A. C. Pierrot-Bults, S. Van der Spoel, B. J. Zahuranec, y R. K. Johnson (eds.), Pelagic biogeography. Proceedings of an international conference. The Netherlands, 29 May 5 June 1985. unesco Technical Papers in Marine Science 49, Paris.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., y Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010(6), pdb-prot5439.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, *18*, 571–573.
- Rodrigues, N., Sharma, R. y Nagender Nath, B., (2001). Impact of benthic disturbance on megafauna in Central Indian Basin. Deep-Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography* 48 (16), 3411-3426.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M., y Henikoff, S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic acids research*, 26(7), 1628-1635.
- Rose, T. M., Henikoff, J. G., y Henikoff, S. (2003). CODEHOP (COnsensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3763-3766.
- Rowe, F.W.E., Baker, A.N. y Clark, H.E.S. 1988. The Morphology, Development and Taxonomic Status of Xyloplax Baker, Rowe and Clark (1986) (Echinodermata: Concentricycloidea), with the Description of a New Species. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, Vol. 233, No. 1273, pp. 431-459

- Ruhl, H.A., (2007). Abundance and size distribution dynamics of abyssal epibenthic megafauna in the northeast Pacific. *Ecology* 88 (5), 1250-1262.
- Runcie, D. E., Garfield, D. A., Babbitt, C. C., Wygoda, J. A., Mukherjee, S., & Wray, G. A. (2012). Genetics of gene expression responses to temperature stress in a sea urchin gene network. *Molecular Ecology*, 21(18), 4547-4562.
- Salas, A., Diaz, F., Re, A. D., Gonzalez, M., y Galindo, C. (2012). Thermoregulatory Behavior of Red Sea Urchin Strongylocentrotus Franciscanus (Agassiz, 1863) and Purple Sea Urchin Strongylocentrotus Purpuratus (Stimpson, 1857) (Echinodermata: Echinoidea). Open Zoology Journal, 5, 42-46.
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., y Christen, P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, 263(5149), 971-973.
- Sconzo, G., Amore, G., Capra, G., Giudice, G., Cascino, D., y Ghersi, G. (1997). Identification and characterization of a constitutive HSP75 in sea urchin embryos. *Biochemical and biophysical research communications*, 234(1), 24-29.
- Shi, Y., Mosser, D. D. y Morimoto, R. I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12, 654–666.
- Smith, C.R. y Hamilton, S.C., (1983). Epibenthic megafauna of a bathyal basin off southern California: patterns of abundance, biomass, and dispersion. *Deep-Sea Research* 30, 907–928.
- Smith, C.R., Levin, L.A., Hoover, D.J., McMurtry, G. y Gage, J.D., (2000). Variations in bioturbation across the oxygen minimum zone in the northwest Arabian Sea. Deep-Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography* 47 (1-2), 227-257.
- Smith, K.L., Jr., Ruhl, H., Bett, B., Billett, D., Lampitt, R. y Kaufmann, R., (2009). Climate, carbon cycling, and deep-ocean ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (46), 19211-19218.
- Sousa, R., & Lafer, E. M. (2006). Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor. *Traffic*, 7(12), 1596-1603.
- Sumida, P.Y.G., Bernardino, A.F., Stedall, V.P., Glover, A.G. y Smith, C.R., (2008). Temporal changes in benthic megafaunal abundance and composition across the West Antarctic Peninsula shelf: results from video surveys. Deep-Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography* 55 (22-23), 2465-2477.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731–9.
- Tomanek, L., y Somero, G. N. (2002). Interspecific-and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus Tegula): implications for regulation of hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology*, 205(5), 677-685.

- Turnewitsch, R., Witte, U. y Graf, G., (2000). Bioturbation in the abyssal Arabian Sea: influence of fauna and food supply. Deep-Sea Research Part II: *Topical Studies in Oceanography* 47, 2877-2911.
- Tyler, P.A., (1980). Deep-sea ophiuroids. Oceanography and marine biology: *an annual review* 18, 125-153.
- Vardaro, M.F., Ruhl, H.A. y Smith, K.L., (2009). Climate variation, carbon flux, and bioturbation in the abyssal North Pacific. *Limnology and Oceanography* 54 (6), 2081-2088.
- Voellmy, R. (1996). Sensing stress and responding to stress. In Stress-Inducible Cellular Responses (ed. U. Feige, R. I. Morimoto, I. Yahara and B. Polla), pp. 121–137. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Vopel, K., Vopel, A., Thistle, D., y Hancock, N., (2007). Effects of spatangoid heart urchins on O<sub>2</sub> supply into coastal sediment. *Marine Ecology-Progress Series* 333, 161-171.
- Wray, G.A. 1999. Echinodermata. World Wide Web: http://tolweb.org/Echinodermata
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: Structure and regulation. Annu. Rev. *Cell Dev. Biol.* 8, 441–469.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., y Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 781-791.
- Zhong, M. I. N., Orosz, A. y Wu, C. (1998). Direct sensing of heat and oxidation by Drosophila heat shock transcription factor. *Mol. Cell* 2, 101–108.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F. y Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480.

## ANEXOS

## ANEXO I

#### Solución RNA later

El ARN es una molécula lábil y son dos las fuentes principales de degradación de este. En primer lugar las RNAsas las cuales son enzimas muy activas y estables y que aún al presentarse en cantidades traza son suficientes para romper el RNA. Segundo, la molécula de RNA por sí misma es muy frágil y es termodinámicamente menos estable que el DNA debido a que el grupo hidroxilo 2' del anillo de la ribosa promueve un ataque hidrofílico sobre el enlace fosfo-di-ester de los carbonos 5'-3' permitiendo que se genere un fosfato cíclico 2'-3' rompiendo así la molécula del RNA. Es por esta razón que el almacenamiento del RNA debe realizarse en soluciones amortiguadoras para evitar que una vez que se ha aislado sufra degradación.

RNA later es una solución no tóxica que estabiliza y protege el RNA en estado intacto de tejidos no congelados. Esta solución elimina la necesidad de procesar las muestras de tejido inmediatamente o criopreservarlas en N<sub>2</sub> líquido permitiendo que la muestra pueda ser procesada en etapas posteriores al muestreo. La solución actúa permeando a través de las células estabilizando el RNA permitiendo almacenar tejidos entre los -80°C y -20°C de manera indefinida, a 4°C hasta por un mes e inclusive a 25°C hasta por una semana. Estas cualidades lo hace sumamente favorable durante muestreos en campo o cuando el número de muestras es sumamente grande.

Reactivo

Cantidad (Volumen Final 1.5 lt.)

| $\triangleright$ | Citrato de Sodio 1M         | 25 ml.  |
|------------------|-----------------------------|---------|
| $\triangleright$ | EDTA 3M pH 8                | 40 ml.  |
| $\triangleright$ | Sulfato de Amonio           | 700 gr. |
| $\triangleright$ | Agua destilada des ionizada | 935 ml. |

- 1. Preparar 25 ml. de Citrato de sodio 1 M.
- 2. Adicionar EDTA 3M. pH 8 (40 ml.)
- 3. Diluir el Sulfato de Amonio de poco a poco hasta Saturar (Adicionar el Agua necesaria también de poco a poco)
- 4. Agregar el resto de Agua des ionizada hasta aforar al volumen final
- 5. Ajustar pH a  $5.2 \text{ con } \text{H}_2\text{SO}_4$
- \*Los reactivos que componen el RNA later cambian las propiedades del agua, pues hacen que aumente su volumen, por lo que es recomendable adicionar el agua de poco a poco para evitar tener un volumen mayor de solución (y por lo tanto una concentración menor de sales de la que se necesita).

# ANEXO II

# Modificaciones al protocolo de extracción de ARN ("TRI reagent solution® de Ambion")

- Homogenizar cada muestra (Apróximadamente 100 mg.de tejido) con 800 μl. de Tri reagent solution® y 100mg. perlas de silica/zirconia de 1mm de diámetro en homogenizador por 30 segundos a 2500 r.p.m. (en hielo)
- 2. Las muestras se deben incubar por cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugaran a 12000g por diez minutos a temperatura de 4°C.
- 3. Adicionar a la muestras 200µl. de cloroformo por cada ml. de Tri reagent solution® utilizado, agitando vigorosamente por 15 segundos e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4. Centrifugar a 12000g de 10 a 15 minutos a 4°C.
- 5. Transferir la fase acuosa (ARN) a un tubo ependorf limpio libre de ARNasas.
- 6. Adicionar 500µl. de Isopropanol por cada ml. de Tri reagent solution®, agitar por vortex de cinco a diez segundos.
- 7. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8. Incubar por 20 minutos a -80°C.
- 9. Centrifugar a 12000 g por 8 minutos a 4°C.
- 10. Descartar líquido sobrenadante y recuperar precipitado (ARN).
- 11. Lavar dos veces el precipitado con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Tri reagent solution® utilizado, agitar vigorosamente y centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C.
- 12. Secar el pellet (quitar todo el etanol remanente completamente).
- 13. Resuspender el precipitado en agua libre de ARNasa.
- 14. Cuantificar (Ng/μl) en espectrofotómetro nano vue-measuring nucleic acids & proteins en el rango de 260 nm y medir pureza por medio de las relaciones 260/280 y 260/230.

# ANEXO III

## Electroforesis no desnaturalizante de ARN

# Electroforesis en gel de Agarosa 1.5% en TAE (o TBE) con GelRed® para analizar las muestras.

- 1. Adicionar 0.6 gramos de agarosa en 30 ml. de TAE y calentar en microondas por 15 segundos hasta disolver completamente.
- 2. Agregar 10 ml. más de TAE para ayudar a enfriar la solución.
- 3. Adicionar 4µl. de GelRed® y disolver completamente.
- 4. Montar el gel y esperar a que solidifique.

## Preparación de las muestras de ARN para electroforesis

- 1. Determinar la concentración de ARN disponible para calcular el volumen de solución que contenga 1µg de ARN de muestra.
- 2. Adicionar 2µl. de Buffer de carga (EDTA+ Azul de Bromofenol + Glicerol).
- 3. En caso necesario, agregar agua libre de ARNasas para igualar volumen de muestra hasta 15µl.
- Las muestras se cargarán el en gel (15µl por cada muestra) y correr durante una hora a 60 volts para determinar calidad de ARN y confirmar que no hubo degradación.

## Buffer TAE 50X (pH 8.3)

- ➢ 242gr. de Tris Base
- ➢ 57.1 ml. de ácido acético glacial
- > 100 ml. de EDTA 0.5M pH 8.0 (Stock)

Agregar el Tris Base y el EDTA a 500 ml. de agua destilada desionizada, adicionar el ácido acético glacial y aforar a 1Lt. con agua destilada desionizada.

# **CONTINUACIÓN ANEXO III**

## **Buffer TBE (10X)**

|              |    | 1 lt.   | 500ml.   |
|--------------|----|---------|----------|
| Tris Base    |    | 108 gr. | 54 gr.   |
| Ácido Bórico | 0  | 55 gr.  | 22.5 gr. |
| ► EDTA 0.5M  | pH | 40ml.   | 20ml.    |

Disolver el Tris Base y el ácido bórico en agua destilada desionizada en un volumen no mayor de 200 ml. Adicionar el EDTA y ajustar al volumen final con agua destilada desionizada.

## Buffer de carga para electroforesis

Para poder cargar las muestras que se quieren observar (extracto de ADN, ARN o Producto de PCR) es necesario añadirle a la muestra un buffer de carga, la cual tiene como función evitar que la muestra se disuelva en el buffer de electroforesis (TAE o TBE) y que esta se pierda. Los buffers de carga están compuestos de un colorante (azul de bromofenol, Cylene Cyanol, naranja de acridina, etc) que nos permitirá visualizar el corrido de la muestra y darle seguimiento, y un agente que le dará mayor densidad (Glicerol, Ficoll, Sucralosa etc.) a la muestra permitiendo que esta se deposite correctamente en el pozo de siembra

| Volumen final |  | 10 ml.   |  |  |
|---------------|--|--|--|--|
| > H<br>> A    | EDTA 0.5M pH 8.1<br>Azul de Bromofenol | 2 ml.<br>(0.025 gr /3ml de Agua destilada desionizada) |  |  |
| > (           | Glicerol                               | 5ml.   |  |  |

Adicionar 3µl. de GelRed® por cada mililitro de buffer de carga (no es necesario teñir los geles de Agarosa).

Utilizar 2µl de buffer por cada 5µl. de muestra.

# ANEXO IV

### Extracción DNA por Método de Sales.

1.- El tejido se debe secar (100 mg por tubo) por 2 horas en un tubo abierto.

Nota: El tejido se puede dejar a -20°C por la noche.

- 2.- Agregar 200µl de solución SNET y comenzar a homogenizar el tejido con un pistilo para tubos de 1.5ml (alrededor de 15 min. De homogenización mecánica por tubo).
- 3.-Agergar otros 200µl de solución STEN a cada tubo, agregar 4µl RNasa (10mg/ml) y 8µl de proteinasa K (20mg/ml).
- 4.- Incubar a 60°C de 1-2 hrs agitando cada 10 min.
- 5.- Agregar 300µl de NaCl 6M, usar vortex e incubar a temperatura ambiente 5min.
- 6.- Centrifugar a temperatura ambiente 10,000g por 30 min. (10,200 rmp).
- 7.- Transferir fase acuosa a un tubo nuevo (alrededor de 600µl).
- 8.- Agregar 600µl de isopropanol e incubar a -80°C por 10 min.
- 9.- Cetrifugar a 12000g (11,200 rpm) a temperatura ambiente por 15 min.
- 10.- Descartar sobrenadante y agregar 1ml de Etanol 70%.
- 11.- Centrifugar 5min. A la misma velocidad.
- 12.- Retirar sobrenadante, secar y Resuspender en 30µl de TE.

#### Solución amortiguadora de Sales (SNET)

- ➤ Tris-HCl 10 mM pH 8.0
- ➢ NaCl 400 mM.
- ► EDTA 1 mM

#### Solución amortiguadora de almacenamiento (TE)

- Tris-HCl 5 mM pH 7.9
- ► EDTA 0.1 mM pH 8.0

## ANEXO V

#### Digestión con DNAsas (Para 7µg. de ARN)

1. Preparar la reacción en frio con el ARN, la enzima RQ1® DNAsas (7µl. una unidad de enzima por cada microgramo de ARN), el Buffer 10X y ajustar el volumen con agua libre de nucleasas (para diluir el buffer 10X a volumen final de 1X).

2. Incubar la reacción por 30 minutos a 37°C.

3. Centrifugar rápidamente (para bajar el condensado formado en las paredes del tubo y enfriar rápidamente en hielo, adicionar  $7\mu$ l. de solución STOP (una unidad de stop por cada unidad de DNAsa).

4. Incubar la reacción por 10 minutos a 65°C.

5. Agregar un décimo del volumen de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol 100%.

6. Incubar por una hora a  $-20^{\circ}$ C (o toda la noche a  $-80^{\circ}$ C).

- 7. Centrifugar a 12000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.
- 8. Lavar con 200µl. de etanol al 75%.

9. Incubar por 10 minutos en hielo.

10. Centrifugar a 9000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C y descartar el líquido supernadante.

11. Secar el pellet totalmente y resuspender en  $14\mu$ l. de agua libre de nucleasas. Almacenar a -20°C si se va a utilizar inmediatamente o a -80°C si no se va usar por el momento.

# ANEXO VI

## Síntesis de ADN complementario (RT-PCR)

1. Preparar el siguiente master mix en frio\*:

| Reactivo                | Una reacción (20µl.) | Master mix (16 más 10%) |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Buffer 10X              | 2.0μl. (1X)          | 35.2 μl.                |
| Mezcla de nucleótidos   | 2.0µl. (0.5mM)       | 35.2 μl.                |
| (5mM)                   |                      |                         |
| Oligo dT (10µM.)        | 2.0μl. (1.0 μM)      | 35.2 μl.                |
| RNAsa OUT (40U/µl.)     | 0.25µl (10U/20µl.)   | 4.4 μl.                 |
| Transcriptasa reversa   | 1 μl. (0.2U/μl.)     | 17.6 μl.                |
| (4U/μl.)                |                      |                         |
| Agua libre de nucleasas | 0.75 μl.             | 13.2 μl.                |
| RNA                     | 12.0 μl.             | -                       |

\*Antes de mesclar los reactivos, si estos están recién descongelados, se recomienda agitarlos mediante vortex y centrifugarlos rápidamente en microcentrifuga para resuspender los reactivos que pudieran estar precipitados.

2. Repartir el master mix en cada uno de los tubos que se vayan a utilizar (8  $\mu$ l. por tubo) y adicionar individualmente el ARN en cada tubo.

- 3. Incubar las muestras por una hora a 37°C.
- 4. Almacenar a 4°C si se va a utilizar el ADN o a -20°C si no se va a usar próximamente.

# **ANEXO VII**

### Diseño de cebadores u oligonucleótidos

El diseño cuidadoso de cebadores es uno de los aspectos más importantes de la PCR, ya que cebadores mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica). En el diseño de los mismos algunas características que se buscan son:

- 1. Cada cebador debe contar con una longitud de entre 12 a 25 bases.
- 2. Se debe mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 45 y 55 %.
- 3. Los cebadores deben de tener temperatura de fusión "Tm" de entre 50°C. a 60°C. y con una diferencia entre ambos de 5 °C como máximo.
- 4. La secuencia de los cebadores individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- 5. Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.
- 6. Evitar poli X.
- 7. Evitar nucleótidos degenerados en los extremos 5'.

Código IUPAC/IUB:

| A: adenina           | R: A o G           |
|----------------------|--------------------|
| C: citosina          | W: A o T           |
| G: guanina           | S: C o G           |
| T: timina en el ADN  | Y: C o T           |
| U: uracilo en el ARN | K: G o T           |
| N: A o C o G o T     | H: A o C o T; no G |
| M: A o C             | B: C o G o T; no A |
| V: A o C o G; no T   | D: A o G o T; no C |
# ANEXO VIII

## Tabla V Concentración de las muestras de ARN extraidas:

| Muestra                  | Concentración (Ng/µl.) | 260/280 |
|--------------------------|------------------------|---------|
| #1 de larvas             | 76.6                   | 1.87    |
| #2 de larvas             | 90.7                   | 1.76    |
| #3 de larvas             | 104.4                  | 1.82    |
| #4 de larvas             | 132.2                  | 1.79    |
| #5 de larvas             | 144.6                  | 1.83    |
| #6 de larvas             | -                      | -       |
| #7 de larvas             | 64.6                   | 1.87    |
| #8 de larvas             | 105.6                  | 1.80    |
| #9 de larvas             | 168.3                  | 1.88    |
| #10 de larvas            | 88.9                   | 1.85    |
| #11 de larvas            | 98.2                   | 1.79    |
| #12 de larvas            | 98.8                   | 1.65    |
| #13 de larvas            | 123.3                  | 1.66    |
| #14 de larvas            | 158.8                  | 1.87    |
| #15 de larvas            | 137.2                  | 1.73    |
| #16 de larvas            | 70.4                   | 1.82    |
| #17 de larvas            | 79.0                   | 1.95    |
| #18 de larvas            | 173.1                  | 1.85    |
| #19 de larvas            | 90.0                   | 1.84    |
| # 20 de larvas           | 134.7                  | 1.83    |
| #21 de larvas            | 156.1                  | 1.85    |
| #22 de larvas            | 67.4                   | 1.73    |
| #23 de larvas            | 98.5                   | 1.83    |
| #24 de larvas            | 126.8                  | 1.80    |
| #25 de larvas            | 156.9                  | 1.78    |
| #26 de larvas            | 105.1                  | 1.81    |
| #27 de larvas            | 116.0                  | 1.78    |
| # 1 de pies ambulacrales | 1021.0                 | 1.23    |
| #8 de pies ambulacrales  | 1161.0                 | 1.28    |
| #15 de pies ambulacrales | 1107.5                 | 1.24    |
| #21 de pies ambulacrales | 847.8                  | 1.31    |
| #25 de pies ambulacrales | 1346.7                 | 1.28    |
| #32 de pies ambulacrales | 631.1                  | 1.28    |
| #37 de pies ambulacrales | 978.4                  | 1.47    |
| #38 de pies ambulacrales | 699.2                  | 1.26    |
| #39 de pies ambulacrales | 977.7                  | 1.33    |

## ANEXO IX

### Secuencias 18S obtenida

### As 18S F

#### As 18S R

Secuencia concenso Arbacia stellata 18S

### ANEXO X

```
CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments
Sequence type explicitly set to DNA
Sequence format is Pearson
Sequence 1:
gi|665597|emb|Z37514.1| A.lixula gene for 18S ribosomal RNA
                                                                  1692 bp
Sequence 2:
gi|71388439|gb|DQ073778.1| Arbacia punctulata 185 small subunit ribosomal
RNA gene partial sequence
                                                                  1692 bp
Sequence 3:
gi|665606|emb|Z37119.1| B.lyrifera gene for 18S ribosomal RNA
                                                                  1692 bp
Sequence 4:
gi|666085|emb|Z37149.1| P.miliaris gene for 18S ribosomal RNA
                                                                  1692 bp
Sequence 5:
gi|473551|dbj|D14365.1|SUS18SI Strongylocentrotus intermedius gene for 18
S rRNA partial sequence
                                                                  1692 bp
Sequence 6:
gi|508546|gb|L28055.1|SUS18SR Strongylocentrotus purpuratus 18S ribosomal
DNA 18S rDNA
                                                                  1692 bp
Start of Pairwise alignments
Aligning...
Sequences (1:2) Aligned. Score: 99
Sequences (1:3) Aligned. Score: 97
Sequences (1:4) Aligned. Score: 98
Sequences (1:5) Aligned. Score: 97
Sequences (1:6) Aligned. Score: 97
Sequences (2:3) Aligned. Score: 97
Sequences (2:4) Aligned. Score: 98
Sequences (2:5) Aligned. Score: 98
Sequences (2:6) Aligned. Score: 97
Sequences (3:4) Aligned. Score: 97
Sequences (3:5) Aligned. Score: 97
Sequences (3:6) Aligned. Score: 96
Sequences (4:5) Aligned. Score: 97
                                97
Sequences (4:6) Aligned. Score:
Sequences (5:6) Aligned. Score:
                                98
Guide tree file created: [clustalw.dnd]
There are 5 groups
Start of Multiple Alignment
Aligning...
Group 1: Sequences: 2
                            Score: 31578
                          Score:31136
Score:30900
Score:31084
Group 2: Sequences: 3
Group 3: Sequences: 4
Group 4: Sequences: 2
Group 5: Sequences: 6
                             Score: 30629
Alignment Score 171885
```

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln]

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
gi|665597|emb|Z37514
                     CGAGCGAAACTGCGG-ATGGCTCATTAAATCAGTTAT-GGTTCATTGGAT
gi|71388439|gb|DQ073
                     CGAGCGAAACTGCGG-ATGGCTCATTAAATCAGTTAT-GGTTCATTGGAT
qi|665606|emb|Z37119
                     CGAGCGAAACTGCGG-ATGGCTCATTAAATCAGTTATTGGTTCATTGGAT
qi|666085|emb|Z37149
                     CGAGCGAAACTGCGG-ATGGCTCATTAAATCAGTTAT-GGTTCATTGGAT
gi|473551|dbj|D14365
                     CGA-CGAAACTGCGGGATGGCTCATTAAATCAGTTAT-GGTTCATTGGAT
gi|508546|gb|L28055.
                     CGA-CGAAACTGCGG-ATGGCTCATTAAATCAGTTAT-GGTTCATTGGAT
                     gi|665597|emb|Z37514
                     CGAGTCCCCC-GACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
gi|71388439|gb|DQ073
                     CGAGTCCCCC-GACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
gi|665606|emb|Z37119
                     CGAGTCCCCC-GACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
gi|666085|emb|Z37149
                     CGAGTCCCCCGACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
gi|473551|dbj|D14365
                     CGAGTCCCCCGACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
gi|508546|gb|L28055.
                     CGAGTCCCCCGACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGC
                     gi|665597|emb|Z37514
                     GTCCAAGCGCCGACTCCCCAGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
gi|71388439|gb|DQ073
                     GTCCAAGCGCCGACTCCCCAGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
gi|665606|emb|Z37119
                     GTCCAAGCGCCGACTTCC-AGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
gi|666085|emb|Z37149
                     GCCCAAGCGCCGACTTTCCAGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
gi|473551|dbj|D14365
                     GTCCAAGCGCCGACTTTCCAGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
gi|508546|gb|L28055.
                     GTCCAAGCGCCGACTTTCCAGAAGGCGTGCTTTTATTAGGAACAAGACCA
                     gi|665597|emb|Z37514
                     GCCCGGTTTCGGCCGGCACCACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
                     GCCCGGTTTCGGCCGGCACCACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
gi|71388439|gb|DQ073
gi|665606|emb|Z37119
                     GSSC---CCCGGCCGGCAACACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
gi|666085|emb|Z37149
                     GCCCGGTCTCGGCCGGCCACACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
gi|473551|dbj|D14365
                     GCC-GGTCTCGGCCGGCCACACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
gi|508546|gb|L28055.
                     GCCCGGTCTCGGCCGGCCACACTGGTGAACTCTGGATAACACAGCCGATC
                             ******
qi|665597|emb|Z37514
                     GCACGGTCTTCGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCAA-TCAA
gi|71388439|gb|DQ073
                     GCACGGTCYTCGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCTA-TCAA
gi|665606|emb|Z37119
                     GCACGGTCCTCGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCTA-TCAA
gi|666085|emb|Z37149
                     GCACGGTCTTTGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCTA-TCAA
gi|473551|dbj|D14365
                     GCACGGTCTTTGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCTA-TCAA
gi|508546|gb|L28055.
                     GCACGGTCTTTGCACCGGCGACGGATCCTTCGAATGTCTGCCCTAATCAA
                     gi|665597|emb|Z37514
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACGGAGA
gi|71388439|gb|DQ073
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACGGAGA
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACG-AGA
gi|665606|emb|Z37119
gi|666085|emb|Z37149
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACGGAGA
gi|473551|dbj|D14365
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACGGAGA
gi|508546|gb|L28055.
                     CTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACCATGGTCGTCACGGGTAACGGAGA
```

qi|665597|emb|Z37514 -TCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA-CGGCTACCACATCCA ATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGGGGGGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 ATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGGGGGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA ATCAGGGTTCGATTCCGGASAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA gi|666085|emb|Z37149 ATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGGGGGGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA gi|473551|dbj|D14365 gi|508546|gb|L28055. ATCAGGGTTCGATTCCGTAGAGGGAGCTTGAGAAACGGCTACCACATCCA \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* AGGAAGGC-AGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG gi|665597|emb|Z37514 qi|71388439|qb|DQ073 AGGAAGGC-AGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG qi|665606|emb|Z37119 AGGAAGGCTAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG AGGAAGGC-AGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG gi|666085|emb|Z37149 gi|473551|dbj|D14365 AGGAAGGC-AGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG qi|508546|qb|L28055. AGGAAGGC-AGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACACGGGGAGGTAG gi|665597|emb|Z37514 TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|71388439|gb|DQ073 TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|665606|emb|Z37119 TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|666085|emb|Z37149 TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|473551|dbj|D14365 TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|508546|gb|L28055. TGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATG gi|665597|emb|Z37514 AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG gi|71388439|gb|DQ073 AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG gi|665606|emb|Z37119 AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG gi|666085|emb|Z37149 AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG gi|473551|dbj|D14365 AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG gi|508546|gb|L28055. AGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCACTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAG-CAGCCGCG-TAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG gi|665597|emb|Z37514 gi|71388439|gb|DQ073 CCAG-CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG gi|665606|emb|Z37119 CCAGTCAGCCGCG-TAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG gi|666085|emb|Z37149 CCAG-CAGCCGCG-TAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG gi|473551|dbj|D14365 CCAG-CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG CCAG-CAGCCGCG-TAATTCCAGCTCCAGTAGCGTATATTAAAGCTGTTG qi|508546|qb|L28055. gi|665597|emb|Z37514 CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGCCCAGGC-TGCGGT-CCGCC gi|71388439|gb|DQ073 CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGCCCAGGCCTGCGGT-CCGCC gi|665606|emb|Z37119 CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGCCCAGGCCTGCGGTTCCGCC gi|666085|emb|Z37149 CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGTCCAGGCCTGCGGT-CCGCC gi|473551|dbj|D14365 CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGCCCAGGC-TGCGGT-CCGCC gi|508546|gb|L28055. CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGCCCAGGCCTGCGGT-CCGCC gi|665597|emb|Z37514 GTGNNNNG-GTACTGCAGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC GTGAGGCGAGTACTGCAGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 GTGACAGG--TACTGCAGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC gi|666085|emb|Z37149 GTGACGTG--TACTGCTGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC gi|473551|dbj|D14365 GTGTA-CGTGTACTGCAGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC GTGAGGCGTGTACTGCAGTCCTGGCCTTCCTCTCGGTTTTCGCCCGGTGC gi|508546|gb|L28055. \* \* \* 

qi|665597|emb|Z37514 TCTTAACTGA-GTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG TCTTAACTGA-GTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 TCTTAATTGA-GTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG TCTTAATTGA-GTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG gi|666085|emb|Z37149 CCTTAATTGA-GTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG gi|473551|dbj|D14365 gi|508546|gb|L28055. CCTTAATTGATGTGCCAGGAGAGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTG gi|665597|emb|Z37514 GAGTGTTCAAAGCAGGCC-TCGCGCCTGAACAGCAGAGCATGGAATAATG qi|71388439|qb|DQ073 GAGTGTTCAAAGCAGGCC-TCGCGCCTGAACAGCAGAGCATGGAATAATG qi|665606|emb|Z37119 GAGTGTTCAAAGCAGGCC-TCGCGCCTGAACATCAGAGCATGGAATAATG gi|666085|emb|Z37149 GAGTGTCCAAAGCAGGCCATCGCGCCTGAACAGCAGAGCATGGAATAATG gi|473551|dbj|D14365 GAGTGTTCAAAGCAGGCC-TCGCGCCTGAACAGCAGAGCATGGAATAATG qi|508546|qb|L28055. GAGTGTTCAAAGCAG-CC-TCGCGCCTGAACAGCAGAGCATGGAATAATG gi|665597|emb|Z37514 GAATAGGACCTCGGTTCATATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAA-T gi|71388439|gb|DQ073 GAATAGGACCTCGGTTC-TATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAA-T gi|665606|emb|Z37119 GAATAGGACCTCGGTTC-TATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAA-T gi|666085|emb|Z37149 GAATAGGACCTCGGTTC-TATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAA-T gi|473551|dbj|D14365 GAATAGGACCTCGGTTC-TATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAA-T gi|508546|gb|L28055. GAATAGGACCTCGGTTC-TATTGCGTTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAAGT \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* gi|665597|emb|Z37514 GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTG-TGAGAGGTGAA gi|71388439|gb|DQ073 GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTG-TGAGAGGTGAA gi|665606|emb|Z37119 GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTG-TGAGAGGTGAA gi|666085|emb|Z37149 GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTG-TGAGAGGTGAA gi|473551|dbj|D14365 GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTG-TGAGAGGTGAA gi|508546|gb|L28055. GATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGTGGTGAGAGGTGAA gi|665597|emb|Z37514 ATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAS-A-TTTGCCAAGAA gi|71388439|gb|DQ073 ATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAGCA-TTTGCCAAGAA gi|665606|emb|Z37119 ATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASSA-TTTGCCAAGAA gi|666085|emb|Z37149 ATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAS-A-TTTGCCAAGAA gi|473551|dbj|D14365 ATTCTTGGATCGCCGCAAGACGAACGACTGCGAAAGCA-TTTGCCAAGAA ATTCTTGG-TCGCCGCAG--CGACCGAC-GCGAAAGCAATTTGCCAAGAA qi|508546|qb|L28055. \*\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*\*\*\*\* gi|665597|emb|Z37514 TGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|71388439|gb|DQ073 TGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|665606|emb|Z37119 TGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|666085|emb|Z37149 TGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|473551|dbj|D14365 TGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|508546|gb|L28055. TGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCGAAGGCGATCAGAT gi|665597|emb|Z37514 ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT gi|666085|emb|Z37149 ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT gi|473551|dbj|D14365 ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT ACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACTGACGATCCGCCGGCGT gi|508546|gb|L28055. 

gi|665597|emb|Z37514 TACTCCCATGACGCGGCGG-CAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT TACTCCCATGACGCGGCGGGCAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 TACTCCCATGACGCGGCGGCGGCAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT TACTCCCATGACGCGGCGGGCAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT gi|666085|emb|Z37149 TACTCCCATGACGCGGCGGGCAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT gi|473551|dbj|D14365 gi|508546|gb|L28055. TACTCCCATGACGCGGCGG-CAGTCTAAGGGAAACCAAAGTCTTTGGGTT gi|665597|emb|Z37514 CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG qi|71388439|qb|DQ073 CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG qi|665606|emb|Z37119 CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG gi|666085|emb|Z37149 CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG gi|473551|dbj|D14365 CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG qi|508546|qb|L28055. CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG gi|665597|emb|Z37514 GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA gi|71388439|gb|DQ073 GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA gi|665606|emb|Z37119 GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA gi|666085|emb|Z37149 GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA gi|473551|dbj|D14365 GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA gi|508546|gb|L28055. GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* gi|665597|emb|Z37514 CTCACCCGGCCCGG-CACAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTT gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 gi|666085|emb|Z37149 gi|473551|dbj|D14365 gi|508546|gb|L28055. GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG gi|665597|emb|Z37514 gi|71388439|gb|DQ073 GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG gi|665606|emb|Z37119 GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG gi|666085|emb|Z37149 GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG gi|473551|dbj|D14365 GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG GATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTG qi|508546|qb|L28055. gi|665597|emb|Z37514 TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCG gi|71388439|gb|DQ073 TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCG gi|665606|emb|Z37119 TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGTG gi|666085|emb|Z37149 TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCG gi|473551|dbj|D14365 TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCG gi|508546|gb|L28055. TCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCG gi|665597|emb|Z37514 CCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATA CCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATA gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 CCACCCGCCGCGGTGCGCACTCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATA gi|666085|emb|Z37149 CCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATgi|473551|dbj|D14365 CCACCCGCCGC-GTGCGGG-TCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTTTA CCACCCCGCG--GTGCGCG-TCAACTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTTTA gi|508546|gb|L28055. \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

qi|665597|emb|Z37514 GCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG GCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 GCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG ---ASACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG gi|666085|emb|Z37149 gi|473551|dbj|D14365 GCCAGGCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG gi|508546|gb|L28055. G-----AGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGG gi|665597|emb|Z37514 GGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGAATC-AGCGGGTACGCTGCCCTTGG qi|71388439|qb|DQ073 GGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGAATC-AGCGGGTACGCTGCCCTTGG qi|665606|emb|Z37119 GGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGAATC-AGCGGGT-CTTGTTCCTTGG gi|666085|emb|Z37149 GGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGAATC-AGCGGGTACACTGCCCTTGG gi|473551|dbj|D14365 GGC-GCACGCGCGCTACACTGGCGGAATC-AGCGGGTACACTGCCCTTGG GGCCGCACGCGCCGTACACTGGCGGAATCCAGCGGGTACACTGCCCTTGG qi|508546|qb|L28055. \*\*\* \*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\* gi|665597|emb|Z37514 CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGG gi|71388439|gb|DQ073 CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGG gi|665606|emb|Z37119 CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGACTAGGG gi|666085|emb|Z37149 CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGG gi|473551|dbj|D14365 CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGG gi|508546|gb|L28055. CCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAACCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGG gi|665597|emb|Z37514 AATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAGGAATTCCCCAGTAAGCGCGAGTCAT gi|71388439|gb|DQ073 AATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCAT gi|665606|emb|Z37119 AATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCAT gi|666085|emb|Z37149 ----AATTATTTCCCTTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCAT gi|473551|dbj|D14365 AGTTGCAATTATCTCCCTTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCAT gi|508546|gb|L28055. AGTTGCAATTATCTCCCTTGAACGAGGAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCAT CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA gi|665597|emb|Z37514 gi|71388439|gb|DQ073 CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA gi|665606|emb|Z37119 CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA gi|666085|emb|Z37149 CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA gi|473551|dbj|D14365 CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA CAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA qi|508546|qb|L28055. gi|665597|emb|Z37514 CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGGACG gi|71388439|gb|DQ073 CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGGACG CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGGACG gi|665606|emb|Z37119 gi|666085|emb|Z37149 CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGGACG gi|473551|dbj|D14365 CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGACGG gi|508546|gb|L28055. CTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGATCCTCGGATCGTCGGCGTCGGGC--gi|665597|emb|Z37514 G-CTCCGCCGTCACGATCGCATTGTACGAGAAGACGATCAAA G-CTCCGCCGTCTCGATCGCAT-GYACGAGAAGACGATCAAA gi|71388439|gb|DQ073 gi|665606|emb|Z37119 G-CTCTGGCCTCGTT-CTGCAT--GACGAGAAGACGATCAAA gi|666085|emb|Z37149 G-CTTCG-CCGTGCCGCTCCCATGTACGAGAAGACGATCAAA gi|473551|dbj|D14365 CTTTGCCGCCTCGCT--CGCAT-GTACGAGAAGACGATCAAA --TTGC-GCCTCGCT--CGCAT-GTACGAGAAGACGATCAAA gi|508546|gb|L28055. \*\*\*\*\* \* \* \* clustalw.dnd

#### ANEXO XI

CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments Sequence type explicitly set to DNA Sequence format is Pearson Sequence 1: Arbacia stellata 18S 783 bp Sequence 2: gi|71388439|gb|DQ073778.1| Arbacia punctulata 18S small subunit ribosomal RNA gene partial sequence 783 bp Sequence 3: gi|665597|emb|Z37514.1| A.lixula gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 4: gi|508546|gb|L28055.1|SUS18SR Strongylocentrotus purpuratus 18S ribosomal DNA 18S rDNA 783 bp Sequence 5: gi|665606|emb|Z37119.1| B.lyrifera gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 6: gi|666085|emb|Z37149.1| P.miliaris gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 7: gi|71388448|gb|DQ073787.1| Echinocyamus pusillus 18S small subunit riboso mal RNA gene partial sequence 783 bp Sequence 8: gi|665639|emb|Z37128.1| F.zelandiae gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 9: gi|71388454|gb|DQ073793.1| Rumphia orbicularis 18S small subunit ribosoma 1 RNA gene partial sequence 783 bp Sequence 10: gi|665630|emb|Z37124.1| E.bisperforatus gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 11: gi|665628|emb|Z37126.1| E.aberrans gene for 18S ribosomal RNA 783 bp Sequence 12: gi|329790856|dbj|AB595141.1| Apostichopus japonicus genes for 18S rRNA IT S1 5.8S rRNA ITS2 28S rRNA partial and complete sequence 783 bp Start of Pairwise alignments Aligning... Sequences (1:2) Aligned. Score: 100 Sequences (1:3) Aligned. Score: 99

```
Sequences (1:4) Aligned. Score:
                                98
Sequences (1:5) Aligned. Score: 98
Sequences (1:6) Aligned. Score: 99
Sequences (1:7) Aligned. Score:
                                99
Sequences (1:8) Aligned. Score:
                               99
Sequences (1:9) Aligned. Score: 99
Sequences (1:10) Aligned. Score: 98
Sequences (1:11) Aligned. Score: 99
Sequences (1:12) Aligned. Score: 3
Sequences (2:3) Aligned. Score: 99
Sequences (2:4) Aligned. Score:
                                98
Sequences (2:5) Aligned. Score: 98
Sequences (2:6) Aligned. Score: 99
Sequences (2:7) Aligned. Score: 99
```

Sequences (2:8) Aligned. Score: 99 Sequences (2:9) Aligned. Score: 99 Sequences (2:10) Aligned. Score: 99 Sequences (2:11) Aligned. Score: 99 Sequences (2:12) Aligned. Score: 3 Sequences (3:4) Aligned. Score: 98 Sequences (3:5) Aligned. Score: 98 Sequences (3:6) Aligned. Score: 99 Sequences (3:7) Aligned. Score: 99 Sequences (3:8) Aligned. Score: 99 Sequences (3:9) Aligned. Score: 99 Sequences (3:10) Aligned. Score: 99 Sequences (3:11) Aligned. Score: 99 Sequences (3:12) Aligned. Score: 3 Sequences (4:5) Aligned. Score: 97 Sequences (4:6) Aligned. Score: 97 Sequences (4:7) Aligned. Score: 97 Sequences (4:8) Aligned. Score: 97 Sequences (4:9) Aligned. Score: 97 Sequences (4:10) Aligned. Score: 97 Sequences (4:11) Aligned. Score: 97 Sequences (4:12) Aligned. Score: 3 Sequences (5:6) Aligned. Score: 98 Sequences (5:7) Aligned. Score: 98 Sequences (5:8) Aligned. Score: 98 Sequences (5:9) Aligned. Score: 98 Sequences (5:10) Aligned. Score: 98 Sequences (5:11) Aligned. Score: 99 Sequences (5:12) Aligned. Score: 3 Sequences (6:7) Aligned. Score: 98 Sequences (6:8) Aligned. Score: 99 Sequences (6:9) Aligned. Score: 98 Sequences (6:10) Aligned. Score: 98 Sequences (6:11) Aligned. Score: 99 Sequences (6:12) Aligned. Score: 3 Sequences (7:8) Aligned. Score: 98 Sequences (7:9) Aligned. Score: 100 Sequences (7:10) Aligned. Score: 99 Sequences (7:11) Aligned. Score: 99 Sequences (7:12) Aligned. Score: 3 Sequences (8:9) Aligned. Score: 98 Sequences (8:10) Aligned. Score: 98 Sequences (8:11) Aligned. Score: 99 Sequences (8:12) Aligned. Score: 3 Sequences (9:10) Aligned. Score: 99 Sequences (9:11) Aligned. Score: 99 Sequences (9:12) Aligned. Score: 3 Sequences (10:11) Aligned. Score: 99 Sequences (10:12) Aligned. Score: 3 Sequences (11:12) Aligned. Score: 3 Guide tree file created: [clustalw.dnd]

There are 11 groups Start of Multiple Alignment Aligning... Group 1: Sequences: 2 Score:14516 Group 2: Sequences: 3 Score:14444 Group 3: Sequences: 2 Score:14250 Group 4: Sequences: 5 Score:14332 Score:14332 Score:14535 Score:14487 Score:14446 Score:14410 Score:14305 Group 5: Sequences: 2 Group 6: Sequences: 3 Group 7: Sequences: 4 5 Group 8: Sequences: Group 9: Sequences: 10 Group 10: Sequences: 11 Score:14073 Group 11: Delayed Alignment Score 309386 CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.aln] clustalw.aln CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment Arbacia stellata 18S ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGT gi|71388439|gb|DQ073 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGT ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGT gi|665597|emb|Z37514 qi|666085|emb|Z37149 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGT ACTCGAGGTAA-TGATTACGAGGGGACTGACGGGGGGCATTCGTATTGCGGT qi|665639|emb|Z37128 gi|71388448|gb|DQ073 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT qi|71388454|qb|DQ073 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT qi|665628|emb|Z37126 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT gi|665630|emb|Z37124 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT gi|665606|emb|Z37119 ACTCGAGGTAA-TGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT qi|508546|qb|L28055. ACTCGAGGTAAGTGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTCGTATTGCGGT qi|329790856|dbj|AB5 ATTTCTTTCCAGTCACAAGCAAAGAAGGCACAGAGTCCCCGTGTCCTTTC \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*\*\* \* Arbacia stellata 18S G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAGC gi|71388439|gb|DQ073 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAGC qi|665597|emb|Z37514 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASqi|666085|emb|Z37149 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASgi|665639|emb|Z37128 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAS-G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAGC gi|71388448|gb|DQ073 qi|71388454|qb|DQ073 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAAGC G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASqi|665628|emb|Z37126 qi|665630|emb|Z37124 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASgi|665606|emb|Z37119 G-TGAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGCAAGACGACCGACTGCGAAASS qi|508546|qb|L28055. GGTGAGAGGTGAAATTCTTGG-TCGCCGCA--GCGACCGAC-GCGAAAGC gi|329790856|dbj|AB5 TCCTTCCGTTCCACTTCTTCCCTCGGCTCT-GAGGAGAGTTTGCGAACGC \*\*\* \* \* \*\* \* \*\*\*\*\*

\* \* \* \*\*\*\*\*

----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT Arbacia stellata 18S gi|71388439|gb|DQ073 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT gi|665597|emb|Z37514 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT qi|666085|emb|Z37149 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT gi|665639|emb|Z37128 gi|71388448|gb|DQ073 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT qi|71388454|qb|D0073 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT gi|665628|emb|Z37126 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT gi|665630|emb|Z37124 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGGACGAAAGTTAGAGGT qi|665606|emb|Z37119 ----ATTTGCCAAGAATGTTTT-CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT qi|508546|qb|L28055. A---ATTTGCCAAGAATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGT gi|329790856|dbj|AB5 GGGAGTCTTCCAGTGGCAAATGACAATTCTTGGTGGTGGATCACTCGGCT \* \*\* \* \* \* \* \*\*\* \* \* Arbacia stellata 18S TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|71388439|gb|DQ073 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|665597|emb|Z37514 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|666085|emb|Z37149 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|665639|emb|Z37128 TCGAAGGCGATCAGGTACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|71388448|gb|DQ073 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|71388454|gb|DQ073 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|665628|emb|Z37126 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|665630|emb|Z37124 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|665606|emb|Z37119 TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|508546|gb|L28055. TCGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCGACT gi|329790856|dbj|AB5 CGTGCGTCGATGAAGAACGCAGTTAGAT---GCGAGAATTCATGTGAATT \* \*\*\*\* \* \*\* \*\*\* \* \* \* \*\* \*\*\* Arbacia stellata 18S G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGGCAGTCTAAGG gi|71388439|gb|DQ073 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGGCAGTCTAAGG qi|665597|emb|Z37514 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGG-CAGTCTAAGG gi|666085|emb|Z37149 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGCAGTCTAAGG G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGCAGTCTAAGG gi|665639|emb|Z37128 gi|71388448|gb|DQ073 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGCAGTCTAAGG gi|71388454|gb|DQ073 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGGCAGTCTAAGG gi|665628|emb|Z37126 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGGCAGTCTAAGG gi|665630|emb|Z37124 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGCAGTCTAAGG G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGGCAGTCTAAGG qi|665606|emb|Z37119 G-ACGATCCGCCGGCGTTACTCCCAT---GACGCGGCGG-CAGTCTAAGG qi|508546|qb|L28055. GCAGAACTCACTGATCATCGACTTATTCGAACGCAAATGGCGG-CTCGGG gi|329790856|dbj|AB5 \* \* \* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\* \* Arbacia stellata 18S GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|71388439|gb|DQ073 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|665597|emb|Z37514 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|666085|emb|Z37149 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|665639|emb|Z37128 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|71388448|gb|DQ073 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|71388454|gb|DQ073 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|665628|emb|Z37126 gi|665630|emb|Z37124 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|665606|emb|Z37119 GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|508546|gb|L28055. GAAACCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAAC gi|329790856|dbj|AB5 GATGCTCTGCTCCTCGAGCCACGTCCGTCTGAGCGTCTGAAGACAATCAC \* \* \*\* \* \* \* \*\* \* \*\* \*\* \*

76

Arbacia stellata 18S gi|71388439|gb|DQ073 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAA gi|665597|emb|Z37514 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA gi|666085|emb|Z37149 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA qi|665639|emb|Z37128 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAA gi|71388448|gb|DQ073 gi|71388454|gb|DQ073 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAA qi|665628|emb|Z37126 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA gi|665630|emb|Z37124 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA gi|665606|emb|Z37119 TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA qi|508546|qb|L28055. TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCG-CTTAA gi|329790856|dbj|AB5 TCACAG-AGTCGGCGTGTTCGCGC-GCCGGA---GGAGCGCCCGGCCGCA \* \* \*\* \* \* \* \*\* \*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* Arbacia stellata 18S TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|71388439|gb|DQ073 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|665597|emb|Z37514 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGG-CACAGTGAGGATTGA gi|666085|emb|Z37149 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|665639|emb|Z37128 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|71388448|gb|DQ073 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|71388454|gb|DQ073 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA qi|665628|emb|Z37126 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|665630|emb|Z37124 TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|665606|emb|Z37119 qi|508546|qb|L28055. TTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACAGTGAGGATTGA gi|329790856|dbj|AB5 GCCGTCCCTTCGACGGCCGGCTGCGTCGGGTCAGTGTCAGATGGAGTTCT \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG Arbacia stellata 18S gi|71388439|gb|DQ073 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG gi|665597|emb|Z37514 gi|666085|emb|Z37149 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG qi|665639|emb|Z37128 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG gi|71388448|gb|DQ073 gi|71388454|gb|DQ073 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG gi|665628|emb|Z37126 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG gi|665630|emb|Z37124 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG gi|665606|emb|Z37119 CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG CAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGGGTGG---TGGTGCATGGCCG qi|508546|qb|L28055. gi|329790856|dbj|AB5 GTGAT-GTCGGCGCCGGTGAAACTCGGCGAGCAGGCTCGATCGGTAACCG \*\*\* \* \*\* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* Arbacia stellata 18S gi|71388439|gb|DQ073 gi|665597|emb|Z37514 gi|666085|emb|Z37149 gi|665639|emb|Z37128 gi|71388448|gb|DQ073 qi|71388454|qb|DQ073 gi|665628|emb|Z37126 gi|665630|emb|Z37124 gi|665606|emb|Z37119 gi|508546|gb|L28055. gi|329790856|dbj|AB5 GGGGTTCGTCGGTCGTGCGACGTGCCA---TCGGGGTGTAGACGTATGCG

TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAA

77

\*\* \*\* \*\*\* \* \*\*\*\* \*\* \*

\*

\*

\*\*\* \* \* \*

Arbacia stellata 18S ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT gi|71388439|gb|DQ073 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT gi|665597|emb|Z37514 gi|666085|emb|Z37149 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT qi|665639|emb|Z37128 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT gi|71388448|gb|DQ073 gi|71388454|gb|DQ073 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT gi|665628|emb|Z37126 gi|665630|emb|Z37124 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCCGCCGCGGTGCGCG-TCAACT gi|665606|emb|Z37119 ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGTGCCACCCGCCGCGGTGCGCACTCAACT qi|508546|qb|L28055. ACTCTGGCTTGCTAAATAGTTGCGCCACCC--CGCGGTGCGCG-TCAACT gi|329790856|dbj|AB5 CCCGTGGTGCGGTCCAGCGTCCGACCCCCGGAACGGTCGAGG---AGCC \* \* \* \* \* \* \*\* \*\* \*\*\* \*\*\*\* Arbacia stellata 18S TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|71388439|gb|DQ073 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|665597|emb|Z37514 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|666085|emb|Z37149 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAS---ACGAGATTGAGCAATAACAGG gi|665639|emb|Z37128 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|71388448|gb|DQ073 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|71388454|gb|DQ073 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG qi|665628|emb|Z37126 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|665630|emb|Z37124 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCA-GCGAGATTGAGCAATAACAGG gi|665606|emb|Z37119 TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTATAGCCACGCGAGATTGAGCAATAACAGG qi|508546|qb|L28055. TCTTAGAGGGACAAGTGGCGTTTAG-----AGATTGAGCAATAACAGG gi|329790856|dbj|AB5 TCTGCCGGGCAGAGCCGGTCGACCCAATCGCGGGGTCTCTCGTCCTCCCG \*\* \* \* \* \* \* \* Arbacia stellata 18S TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|71388439|gb|DQ073 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|665597|emb|Z37514 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|666085|emb|Z37149 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA qi|665639|emb|Z37128 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|71388448|gb|DQ073 gi|71388454|gb|DQ073 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|665628|emb|Z37126 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|665630|emb|Z37124 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA gi|665606|emb|Z37119 TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGCCGCACGCGCGCTACACTGGCGGA TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCGGGGGCCGCACGCGCCGTACACTGGCGGA qi|508546|qb|L28055. gi|329790856|dbj|AB5 TCTTGCGTTCTCGCAGGCGCATGGTAGGCCACCCTTTCC-CGCCGGCG--\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*\*\* \* \* \* \*\*\*\* Arbacia stellata 18S ATC-AGCGGGTACGCTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|71388439|gb|DQ073 ATC-AGCGGGTACGCTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|665597|emb|Z37514 ATC-AGCGGGTACGCTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|666085|emb|Z37149 ATC-AGCGGGTACACTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA ATC-AGCGGGTAAACTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|665639|emb|Z37128 ATC-AGCGGGTATTTCTCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|71388448|gb|DQ073 qi|71388454|qb|DQ073 ATC-AGCGGGTATTTCTCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|665628|emb|Z37126 ATC-AGCGGGTATCTCTCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA ATC-AGCGGGTATTTTTCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|665630|emb|Z37124 gi|665606|emb|Z37119 ATC-AGCGGGT-CTTGTTCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|508546|gb|L28055. ATCCAGCGGGTACACTGCCCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCCGCTGAA gi|329790856|dbj|AB5 ACC---CGATTCTTCGGGGAGCGCCGGGGAAG---GAGAGACC--CCGGG

78

\* \* \*\* \* \*

\* \* \* \* \* \*

\*\* \*

| Arbacia_stellata_18S<br>gi 71388439 gb DQ073<br>gi 665597 emb Z37514<br>gi 666085 emb Z37149<br>gi 665639 emb Z37128<br>gi 71388448 gb DQ073<br>gi 71388454 gb DQ073<br>gi 665628 emb Z37126<br>gi 665630 emb Z37124<br>gi 665606 emb Z37119<br>gi 508546 gb L28055.<br>gi 329790856 dbj AB5 | CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAATTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGGGA-TAGGGAGTTGCAATTATTCCCTTGAACGAG<br>CCTCCTCCGTGATGGCGA-TAGGGAGTTGCCAATTATTCCCTTGAACGAG |
|--|--|
|  |  |
| Arbacia stellata 18S   | GAAT-CCCAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCG  |
| ai 1713884391ab10007377  | 3 1 Arb GAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCG  |

gi|71388439|gb|DQ073778.1|\_Arb gi|665597|emb|Z37514.1|\_A.lixu gi|666085|emb|Z37149.1|\_P.mili gi|665639|emb|Z37128.1|\_F.zela gi|71388448|gb|DQ073787.1|\_Ech gi|71388454|gb|DQ073793.1|\_Rum gi|665628|emb|Z37126.1|\_E.aber gi|665630|emb|Z37124.1|\_E.bisp gi|665606|emb|Z37119.1|\_B.lyri gi|508546|gb|L28055.1|SUS18SR\_ gi|329790856|dbj|AB595141.1|\_A

clustalw.dnd

GAAT-CCCAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCG GAATTCCCAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCG GACTCCCAGTAGGCGAGTCATCAGCTCGCG GACCTCAGATCGGATGAGA-TTACCCGCTGG--\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*