



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(BIOLOGÍA MARINA)

SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA DE LA ESPONJA *APLYSINA GERARDOGREENI* (VERONGIIDA: APLYSINIDAE) PARA EL DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBT. MANUEL RICARDO SALAS CASTAÑEDA

TUTOR:

DR. JOSÉ ANTONIO CRUZ BARRAZA

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. AXAYÁCATL ROCHA OLIVARES

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, CICESE

DR. ENRIQUE ÁVILA TORRES

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, U.A. CD. DEL CARMEN, UNAM

DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, U.A. MAZATLÁN, UNAM

DR. JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, U.A. MAZATLÁN, UNAM

CD. MX, NOVIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*Posgrado en
Ciencias del Mar
y Limnología*



**SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA DE LA ESPONJA
APLYSINA GERARDOGREENI (VERONGIIDA: APLYSINIDAE)
PARA EL DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias

(Biología Marina)

Presenta:

IBT. Manuel Ricardo Salas Castañeda

Director de tesis: Dr. José Antonio Cruz Barraza (ICMyL -Mazatlán)

Comité tutor: Dr. Axayácatl Rocha Olivares (CICESE)

Dr. Enrique Ávila Torres (ICMyL- Cd. Del Carmen)

Dr. Federico Alberto Abreu Grobois (ICMyL -
Mazatlán)

Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo (ICMyL -
Mazatlán)

MÉXICO, CD. MX, NOVIEMBRE 2017

**SECUENCIACIÓN GENÓMICA MASIVA DE LA ESPONJA
APLYSINA GERARDOGREENI (VERONGIIDA: APLYSINIDAE)
PARA EL DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES**

IBT. MANUEL RICARDO SALAS CASTAÑEDA

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular de la Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La investigación contó con el financiamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Programa de Apoyo para la Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-: IA201614, a cargo del Dr. José Antonio Cruz Barraza.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Esto puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección:

manuel.ricardo.salas@hotmail.com y/o joseantonio@ola.icmyl.unam.mx

Si el permiso se otorga deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo de la siguiente manera:

Salas-Castañeda, M. R. (2017). Secuenciación genómica masiva de la esponja *Aplysina gerardogreeni* para el desarrollo de marcadores moleculares. Tesis de maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, ICMYL-UNAM, pp113.

Agradecimientos

Al Instituto y al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, por permitirme formar parte de esta institución reconocida a nivel mundial y por hacer uso de sus instalaciones, particularmente del Laboratorio de Sistemática y Ecología Molecular a cargo del Dr. José Antonio Cruz Barraza.

A CONACYT por proporcionarme los recursos necesarios para la realización del posgrado, por medio de una beca de estudios.

A mi director de tesis el Dr. José Antonio Cruz Barraza, por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por compartirme de su conocimiento y experiencia, por el apoyo, recomendaciones, atenciones y todo el tiempo dedicado durante la realización de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutorial, integrado por el Dr. Enrique Ávila Torres, el Dr. Federico Alberto Abreu Grobois, Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo y al Dr. Axayácatl Rocha Olivares, por el tiempo aportado a la revisión de este trabajo, por sus asesorías, comentarios y sugerencias realizadas para la mejora de este trabajo, les agradezco mucho.

A los investigadores y profesores, al Dr. Carlos Green por sus entretenidas cátedras de geología (¿Cuál falla fue primero?). Al Dr. Federico Páez Osuna por sus cátedras de oceanografía química y la novela del “príncipe azul (oxígeno) y la princesa (materia orgánica)”. Al Dr. Alberto Abreu Grobois por sus clases de genética antigua, moderna y futura, muchas gracias por impartirnos sus conocimientos. Al Dr. José Antonio Cruz, al Dr. Enrique Ávila Torres y al Dr. Juan José Luis Carballo por sus clases para enamorarse de las esponjas (macho, me he quedado encantado de las esponjas). Al M. en C. Mariano por sus clases interesantes de oceanografía física. A la Dra. Gloria Vilaclara, al Dr. Javier Alcocer, al M. en C. Mario Chávez y al Dr. Alfonso Lugo por sus clases de limnología. A todos ellos gracias porque continúan transmitiendo esa pasión por la ciencia, a nosotros los estudiantes.

Al técnico María de los Ángeles del laboratorio de genética de tortugas marinas por su apoyo en tiempo de trabajo.

A Margarita Cordero, Natalia Medina, Gabriela Almaraz, Guadalupe Godoy, Diana Juárez y Chantal Ruiz por su tiempo, ayuda y disponibilidad en cuanto a los trámites que en ocasiones son muy tardados o estresantes y ustedes los vuelven más ágiles.

A la súper M. en C. Celia Bisval Pardo por sus conocimientos en la parte bioinformática y molecular, de verdad estoy muy agradecido con ella. También a Anita, que en cada momento de duda nos acercábamos a ella y nos resolvía la

duda. A todo el equipo de laboratorio de Ecología Molecular a cargo del Dr. Axayácatl, en Ensenada Baja California, muchísimas gracias, son a todo dar.

A la Dra. Nancy Saavedra Sotelo por ayudarme al momento de la organización, identificación de los fragmentos en la electroforesis y los tamaños de alelos en la genotipificación, muchas gracias doctora. También agradezco a su equipo de lab de FACIMAR (UAS), Paul Mendevil (ay mateo) y Daniela Félix (Dani), por su solidaridad e interés en lo que hacía.

A Daniel Oviedo y Herlinda Rojas por su disposición y apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

Al Lic. Carlos Suarez y Germán Ramírez por su ayuda con la preparación de videoconferencias, lo relacionado al centro de cómputo y por su disponibilidad en todo momento para limpieza de software.

A toda mi familia, pero quisiera hacer especial mención de mis abuelos Ricardo Salas Serrano, Rosalinda Maldonado Domínguez y a mi madre Martha Alicia Castañeda Gutierrez, son realmente mi inspiración y motivación, muchas gracias por su amor y cariño, no me imagino la vida sin alguno de ellos. A mis hermanos, Ariana Esmeralda Castañeda (La realista de la familia), Marco Antonio Castañeda (El corazón de la familia) y Carmen Castañeda (La alegría de la familia), los amo con todo mi corazón. A toda mi familia Castañeda y Salas, gracias por estar ahí en todo momento.

A la Dra. Cristina Vega, por mostrarme las técnicas moleculares PCR y extracción de ADN. Al biólogo pesquero Manuel Ley, que me dio seguimiento para perfeccionar las técnicas y enseñarme la técnica de electroforesis}, al igual que motivarme a trabajar con las esponjas del género *Aplysina*. A mis compañeras de laboratorio de Ecología Molecular, Liliana Hernández (Miss Tunicata), ingeniera y futura maestra en ciencias, a Luz Botero (Miss Suberites y ahora Hexantinellidae) (Bióloga y también futura Maestra en ciencias), yo sé que les irá muy bien porque son muy trabajadoras y honestas consigo mismas, muchas gracias por ser atentas y estar dispuestas siempre a ayudar. A Ramón Hernández, mi hermano en el lab, se te extraña, gracias por esos momentos machos que pasamos (jajaja). A la Bióloga Kenia Melissa Bracamontes (¡puro Culiacán!), por su amabilidad y sinceridad como persona, a Janette, A Ivonne, Brenda, Jorge (equipo ITMAZ), Jesús Manuel (Yisus fugaz), a Eduardo Baños (Houston) que me ayudó muchísimo, a Gabriela Green (por sus dibujos en el pizarrón XD), Juan José (Juanjo), Perla, Karen y Celeste (equipo UPSIN). Al recién llegado Adrián (Morrik), (que aún no decide qué hacer con su vida). A todos y a los que me faltaron, muchas gracias por su participación directa e indirecta en este trabajo.

A mis compañeros de maestría, por los momentos de estudio y compañerismo que pasamos, agradecido estoy con cada uno de ustedes, Salvador del Angel, Any Noriega, Julietta Zihua, Cinthya Santoyo, Clara Montero, Alejandra Díaz, Raquel Gutierrez y Nuria Alonso.

A compañeros y amigos de la Unidad, Dr. Benjamín Yáñez, Jessica Orrante, Mateo Amillanos, Brianda Ramos, Cristian Pacheco, Julio, Daniela Valladolid, Elena Jaffer, Roberto Velázquez, Imelda, a todos los miembros y trabajadores de la unidad, muchas gracias por brindarme su amistad y apoyarme en todo momento.

A mis compañeros de maestría por compartir momentos estudiando, por brindarme su ayuda y amistad. A la princesa Trixie Zavala, por apoyarme con mi trabajo (bastante) y compartirme de sus experiencias, por interesarse en lo que hago y principalmente por estar conmigo en todo momento, muchas gracias.

A Dios por Su Amor, Fidelidad y Misericordia.

A cada persona que estuvo presente el tiempo que duró este proyecto y que compartió junto a mí los tantos altibajos de esta etapa.

Dedicatoria

A mis padres, Ricardo Salas Serrano, Rosalinda Maldonado y Martha Alicia Castañeda Gutierrez y a mis hermanos, Ariana Castañeda, Marco Antonio Castañeda y Carmen Castañeda...

El provee de sana sabiduría a los rectos;
Es escudo a los que caminan rectamente.

Proverbios 2:7

Índice General

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	ii
Resumen	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 .Sistemática de las esponjas córneas: Las Verongiida.....	5
2.2 . El género <i>Aplysina</i> en el Pacífico Oriental: <i>A. gerardogreeni</i> , Gómez y Bakus 1992.	7
2.3 . Marcadores moleculares y su evolución.....	10
2.4 . Marcadores moleculares en Porifera.....	13
2.5 . Marcadores mitocondriales (ADNmt) y nuclear- ribosomales (ADNr) para estudios en sistemática.	15
2.6 . Mitogenomas de esponjas: el género <i>Aplysina</i>	15
2.7 . Microsatélites (SSR o STR) y el estudio ecológico de los Poríferos.	16
2.8 . El sentido de la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación en Poríferos.	18
3. Justificación e importancia	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	22
General	22
Objetivos específicos.....	22
6. Área de estudio.....	23
7. Materiales y métodos	26
7.1 Muestras.....	26
7.2 Tratamiento de los ejemplares en el laboratorio.....	26
7.3 Identificación y descripción morfológica de los individuos de <i>Aplysina gerardogreeni</i> tomados en la Isla Pájaros de Mazatlán, Sinaloa.....	26
7.4 Separación de las fibras de esponjina.....	26
7.5 Tratamiento previo a la extracción de ADN.	27
7.6 Extracción y análisis del material genómico.	28
7.7 Secuenciación masiva.	29
7.8 Análisis de secuencias.....	29
7.9 Anotación mitocondrial.....	30
7.9.1 Identificación y selección de loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.....	30
Pruebas experimentales.....	30
7.9.2 Optimización de las condiciones de amplificación de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.	30
7.9.3 Caracterización.....	31
8. Resultados.....	33
8.1 Taxonomía y descripción de los individuos de <i>Aplysina gerardogreeni</i>	33
8.2 Análisis del material genómico previo a la secuenciación masiva.....	42
Bioinformática.....	42
8.3 Análisis de las secuencias.....	42

8.4 Anotación mitocondrial	44
8.5 Identificación y selección de loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.	45
8.6 Optimización de las condiciones de amplificación de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.	47
8.7 Caracterización.....	48
9. Discusiones	50
9.1 Morfología de <i>A. gerardogreeni</i>	50
9.2 Secuenciación masiva	50
9.3 Análisis de las secuencias.	53
9.4 Genoma mitocondrial.....	53
9.5 Selección de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares	55
9.6 Optimización de las condiciones de PCR de los loci microsatelitales candidatos y la evaluación de su nivel de polimorfismo.	56
9.7 Niveles de polimorfismo.....	59
10. Resultados significativos y Conclusiones	62
11. Referencias bibliográficas	64
Anexos.....	83
Anexo 5.....	94

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del área de estudio, Isla Pájaros Mazatlán, Sinaloa, México (google US Dept of state geographer 2016; INEGI Data SIO, NOAA, US Navy, NGA, GEBCO, 2016).	23
Figura 2. Morfología externa de individuos de <i>A. gerardogreeni</i> analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 1; Individuo 2 e Individuo 1.1.36	
Figura 2. Morfología externa de individuos de <i>A. gerardogreeni</i> analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 2.1; Individuo 3 e Individuo 4. Continuación.	37
Figura 4. Genoma mitocondrial en su forma lineal de <i>A. gerardogreeni</i> (consensus) alineado respecto al de <i>A. cauliformis</i> . En este alineamiento se muestran secuencias de <i>A. gerardogreeni</i> (consensus) posicionadas en determinadas regiones del genoma mitocondrial de <i>A. cauliformis</i>	45
Figura 5. Genoma mitocondrial en su forma lineal de <i>A. gerardogreeni</i> (consensus) alineado respecto al de <i>A. fulva</i> . En este alineamiento se muestran secuencias de <i>A. gerardogreeni</i> (consensus) posicionadas en determinadas regiones del genoma mitocondrial de <i>A. fulva</i> , esto se debe a que durante el mapeo, los reads encontrados solo cubren estos sitios de la secuencia base (<i>A. fulva</i>).	45
Figura 6. Número de loci microsatelitales identificados por Msatcommander y seleccionados para la fase experimental.....	46

Índice de tablas

Tabla 1. Especies del género <i>Aplysina</i> claramente reconocidas y su distribución, hasta el momento (Laubenfels 1930; Carballo 1994; Bergquist & Cook 2002; Díaz, <i>et al.</i> 2005 y Cruz-Barraza, <i>et al.</i> 2012).....	9
Tabla 2. Recopilación del número de microsatélites desarrollados para las diferentes especies de esponjas.	17
Tabla 9. Perfil de termociclado de PCR usado para la amplificación de los loci ensayados.	31
Tabla 3. Características de los individuos de la especie <i>A. gerardogreeni</i> . (L=Largo; A=Ancho; H= Alto; lineales = sentido recto; Discontinuos = aleatorios).	40
Tabla 4. Características de las fibras de espongina de cada uno de los individuos recolectados en la Isla Pájaros Mazatlán, Sinaloa (datos en μm).	41
Tabla 5. Secuencias y nucleótidos totales obtenidos de la secuenciación masiva de <i>A. gerardogreeni</i> (4451-AG-Maz-02).	42
Tabla 6. Secuencias modificadas, no modificadas y descartadas después del trimming.	43
Tabla 7. Ensamblaje. Contigs totales generados a partir de reads con sus respectivos tamaños.	43
Tabla 8. Total de secuencias ensambladas pareadas y no pareadas.	43
Tabla 10. Características de los 20 loci microsatelitales desarrollados para <i>A. gerardogreeni</i> (n=10).	49
Tabla 11. Sustituciones encontradas en el mitogenoma de <i>Aplysina gerardogreeni</i> con respecto a <i>A. fulva</i> . (Posición (número), Base encontrada (<i>A. gerardogreeni</i>)-Base del consenso (<i>A. fulva</i>)).	83
Tabla 12. Sustituciones encontradas en los reads de <i>Aplysina gerardogreeni</i> con respecto a <i>A. cauliformis</i> . (Posición (número)-Base encontrada (<i>A. gerardogreeni</i>)-Base del consenso (<i>A. cauliformis</i>)).	85
Tabla 13. Porcentaje mapeado de secuencias de <i>A. gerardogreeni</i> en <i>A. fulva</i>	87
Tabla 14. Porcentaje mapeado de secuencias de <i>A. gerardogreeni</i> en <i>A. cauliformis</i> . Además se incluyen codones de inicio/final.	88

Resumen

Esponjas del género *Aplysina* constituyen un recurso potencial de gran interés en la industria farmacológica por la síntesis de compuestos bioactivos, y en biomedicina, por la estructura tridimensional de quitina en sus fibras que es usada en la bioingeniería de tejidos. Pese a su importancia, su estudio taxonómico y ecológico se vuelve un reto, debido a la dificultad que representa la interpretación de sus características morfológicas. En este proyecto se desarrollaron marcadores moleculares microsatelitales polimórficos para la especie *A. gerardogreeni* y se secuenció parcialmente su genoma mitocondrial, empleando secuenciación de siguiente generación (Illumina) y análisis bioinformáticos. Esto con la finalidad de desarrollar marcadores que brinden información con mayor robustez sobre el conocimiento de este importante grupo zoológico. En total se recolectaron 11 individuos de *A. gerardogreeni* en la Bahía de Mazatlán, de los cuales se tomó uno para llevar a cabo la secuenciación genómica y el resto para las pruebas experimentales. Adicionalmente se incorporaron dos individuos más, uno de la Isla Isabel y otro de la Isla Espíritu Santo (Golfo de California), con la finalidad de probar la variabilidad de los loci microsatelitales. Como resultado se lograron obtener secuencias de buena calidad con las que se ensamblaron 272,707 contigs. Se identificaron 41 loci microsatelitales (18 di-, 3 tri- y 20 tetranucleótidos) candidatos a marcadores moleculares, de los cuales experimentalmente se aislaron 13 loci polimórficos (3 di-, 1 tri- y 9 tetranucleótidos). El número de alelos por locus varió de 2 a 5, y los valores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) van de 0 a 0.556, respectivamente. Además, se obtuvo aproximadamente el 70% del genoma mitocondrial de la especie de estudio, el cual podría completarse con el diseño de cebadores para la amplificación de regiones faltantes y su secuenciación Sanger, usando la información de los dos genomas mitocondriales publicados (*A. fulva* y *A. cauliformis*) y nuestros datos. En general, estos marcadores moleculares polimórficos pueden ser utilizados para estudiar los patrones de conectividad entre poblaciones, calcular el tamaño poblacional efectivo, entre otros estudios relacionados con la ecología molecular, con el fin de explotar este recurso.

Palabras clave:

Esponjas, NGS, *Aplysina*, microsatelites, marcadores moleculares.

Summary

Sponges of the genus *Aplysina* are a potential resource of interest in the pharmacological industry, by the synthesis of bioactive compounds, and in biomedicine, for the three-dimensional structure of chitin in their fibers, which are used in tissue bioengineering. In spite their importance, their taxonomic and ecological study are challenging, due to the difficult interpretation of their morphological characteristics. In this work, polymorphic microsatellites are developed for *A. gerardogreeni* and its mitochondrial genome is partially sequenced using NGS (Illumina platform) and bioinformatic analyses. Molecular marker development is required to provide powerful genetic tools to address relevant evolutionary questions in this important zoological group. In total, 11 individuals of *A. gerardogreeni* were collected in Mazatlán Bay, from which, one was taken to carry out the genome sequencing, and the rest for the experimental tests. Additionally, two individuals, one from Isabel Island and one from Espiritu Santo Island (Gulf of California), were added in order to test the variability of microsatellite loci. As a result, good quality sequences were obtained with which 272,707 contigs were assembled. Forty one microsatellite loci (18 di-, 3 tri- y 20 tetranucleotides) were identified for molecular markers, of which 13 polymorphic loci (3 di-, 1 tri- y 9 tetranucleotides) were experimentally isolated. The number of alleles per locus varied from 2 to 5, and the observed heterozygosity (H_o) and expected (H_e) values ranged from 0 to 0.556, respectively. In addition, approximately 70% of the mitochondrial genome was obtained, which could be completed with the design of primers to amplify and Sanger sequencing missing regions, using information from two published mitochondrial genomes (*A. fulva* and *A. cauliformis*) and our data. In general, these polymorphic molecular markers could be used to study connectivity patterns among populations, to calculate effective population size, among other studies related to molecular ecology, in order to exploit of this resource.

Key words:

Sponges, NGS, *Aplysina*, microsatellites, molecular markers.

1. Introducción

Las esponjas (Phylum Porifera) son uno de los grupos de invertebrados acuáticos más biodiversos y abundantes del planeta (Soest *et al.* 2012). Debido a su abundancia y forma de vida, las esponjas juegan un papel ecológico importante en los ecosistemas acuáticos bentónicos (Díaz & Rützler 2001; Wulff 2001; Yahel *et al.* 2003 y Bell 2008). Son efectivos filtradores de la columna de agua, por lo que su papel es clave en el acoplamiento bento-pelágico de estos ecosistemas. Proveen de refugio e incluso son alimento de muchas especies, además, tienen la capacidad de realizar asociaciones simbióticas con macro y microorganismos, (Brusca 2003).

Históricamente las esponjas han sido utilizadas en beneficio del hombre, principalmente con fines domésticos, como esponjas de baño, en la fabricación y reparación de cojines de sillas, e inclusive para la fabricación de cascos de batalla en civilizaciones antiguas (Gómez 2002). En la actualidad son comercializadas por la industria cosmética principalmente como esponjas de baño. Aunque su principal interés radica en la capacidad que tienen para sintetizar compuestos bioactivos los cuales son de interés en el área de la farmacología (Rinehart 2000; Carballo 2002; Puyana *et al.* 2003 y Narsinh & Müller 2004).

Particularmente, las esponjas del Orden Verongiida, Clase Demospongiae, son consideradas un recurso potencial de interés biológico, debido a que muchas de las especies son capaces de sintetizar metabolitos secundarios derivados de la bromotirosina (Ciminiello *et al.* 1997 y Encarnación-Dimayuga *et al.* 2003), con actividad citotóxica, antiinflamatoria, antidepredatoria y antimicrobiana (Pile *et al.* 1997; Munro *et al.* 1999; Rinehart 2000; Carballo 2002; Brusca 2003, Puyana *et al.* 2003 y Narsinh & Müller 2004). Aunque probablemente el potencial biotecnológico más importante de algunos de sus grupos radica en la composición de sus fibras de espongina, las cuales están compuestas de quitina en una microestructura tridimensional multicapa. Dicha estructura se ha vuelto apropiada para el asentamiento de células condrocitos que se encargan de la generación de tejido,

lo que ha resultado de gran interés en el área de biomedicina y en bioingeniería, específicamente de la regeneración de tejidos (Ehrlich *et al.* 2010).

Sin embargo, el principal reto que representa trabajar con este grupo, es la identificación y clasificación taxonómica de sus especies. Esto debido principalmente a la gran dificultad en la interpretación de sus características morfológicas, las cuales por lo general son muy inestables y difícilmente pueden ser empleadas como diagnósticas en un análisis sistemático (Cruz-Barraza *et al.* 2012). Las Verongiida carecen de un esqueleto mineral, el cual es una de las características más utilizadas en la clasificación de los Porifera. En su lugar, posee un esqueleto de fibras de espongina, el cual se muestra muy homogéneo al interior de algunos de los géneros. Hasta ahora, algunas variaciones en el diámetro de la fibra y la médula, así como, la luz de malla han sido algunas de las características más empleadas en la taxonomía tradicional. Sin embargo, éstas han mostrado una importante plasticidad incluso dentro de un mismo individuo (Erwin & Tacker 2007, Cruz-Barraza *et al.* 2012).

En las últimas décadas, la implementación de marcadores moleculares en los Porifera ha contribuido significativamente en la difícil labor de identificar a las especies y estimar sus relaciones filogenéticas (Ferri *et al.* 2009, Pires & Marinoni 2010, Cruz-Barraza *et al.* 2012). Pese a los avances, estos marcadores no han sido bien desarrollados en el grupo, por lo que a la fecha se continúa con la evaluación de varios tipos de marcadores con el fin de probar su variabilidad y eficiencia tanto en la sistemática como en la ecología poblacional de esponjas (Borchiellini *et al.* 2004, Nichols 2005, Dennis *et al.* 2008, Morrow *et al.* 2012, Cruz-Barraza *et al.* 2014, entre otros).

Los marcadores moleculares que típicamente se utilizan para discriminar entre especies de metazoarios (por ej.: COI), han mostrado muy poca variación en los Porifera y en otros invertebrados diblásticos, se ha sugerido que esto se debe a la lenta evolución que presenta el genoma mitocondrial de dichos organismos (Erpenbeck *et al.* 2006). Por esta razón, en algunos casos se ha optado por el desarrollo de marcadores hipervariables (microsatélites), que muestran un mejor

panorama de la dinámica poblacional de las especies. Este tipo de marcadores moleculares se han vuelto importantes en taxonomía de esponjas, ya que se utilizan como datos que brindan una gran oportunidad para reevaluar la validez de las especies (Cárdenas *et al.* 2012). En los primeros estudios autores se encontraron con la dificultad en la generación de grandes librerías genómicas, así como el análisis y manejo de la información. Consecuentemente, son pocas las especies de esponjas en las que se han desarrollado estos microsatélites (Ejem. *Paraleucilla magna*, *Crambe crambe*, *Scopalina lophyrodopa*, *Spongia officinalis* *Spongia lamella*, etc. (Tabla 1). Sin embargo, esta tendencia está cambiando con el uso reciente de las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS – Next Generation Sequencing, por sus siglas en inglés), lo que ha facilitado la obtención de microsatélites de una manera relativamente más sencilla (Giles *et al.* 2013, Riesgo *et al.* 2014).

La NGS es la tecnología más avanzada e ideal para ser utilizada en estudios poblacionales (dinámica poblacional de las especies) o de diferenciación genética (ecología poblacional, sistemática, por ejemplo, la comparación entre mito-genomas o entre loci de genomas), además de ser rápida y relativamente económica (en comparación a otras). Ésta permite obtener datos de calidad para el entendimiento de sistemas biológicos a nivel genoma, en forma rápida y confiable (Quail, *et al.* 2012).

Las herramientas de la NGS, permiten acrecentar la velocidad con la cual se obtienen los datos, su almacenamiento, así como su análisis y procesamiento. La NGS de genomas se encuentra relacionada con equipos automatizados, en donde los avances experimentales en química, ingeniería, biología molecular, nanotecnología se entrelazan con la computación (programas) de alto rendimiento. Recientemente, se han desarrollado programas computacionales (FastQC v 0.10.1, CLC Genomic, Workbench 7.0.3, Msatcommander, entre otros), que son más amigables, facilitando el manejo y el procesamiento de datos (Knudsen & Flensburg 2008 y Faircloth 2008).

Dado lo anteriormente expuesto, el presente trabajo es una aportación al conocimiento biológico, ecológico y evolutivo de esponjas del género *Aplysina*, específicamente de la especie *A. gerardogreeni*. Se busca desarrollar marcadores moleculares microsatelitales de la esponja *Aplysina gerardogreeni* a partir datos obtenidos de su secuenciación genómica mediante NGS.

2. Antecedentes

2.1. Sistemática de las esponjas córneas: Las Verongiida.

Las esponjas córneas se caracterizan por la ausencia de una estructura inorgánica (carbonato de calcio o silíceo) en su esqueleto. A diferencia de otras esponjas, sus cuerpos se encuentran sostenidos por estructuras de esponjina en forma de fibras, las cuales se presentan comúnmente como una estructura reticular (Verongiida y Dictyoceratida) o bien, de forma dendrítica (Dendroceratida) (Berquist & Cook, 2002).

Inicialmente, las esponjas con estructuras exclusivamente de fibras de esponjina conformaban la Clase Keratosa, cuyo criterio de clasificación se basaba precisamente en la composición de su esqueleto, el cual también podía incluir espículas u otro material procedente del exterior (Grant, 1861). Posteriormente Keratosa fue incluida en la subclase Ceratellida dentro de la Clase Demospongiae (Topsent, 1928), pero en poco tiempo recibió la categoría de Orden dentro de la misma clase (Laubenfels 1936). Más adelante, Berquist y Hartman (1969) dividieron a Keratosa en dos órdenes mediante un análisis de aminoácidos: Dictyoceratida y Dendroceratida. Morfológicamente, las Dictyoceratida se caracterizaban por poseer una estructura esquelética reticulada, en cambio, las Dendroceratida poseían una estructura esquelética dendrítica. A partir de éste último Orden (Dendroceratida), fueron establecidos dos órdenes más: Verongiida 1978 y Halisarcida 1996 en base a marcadores moleculares (véase abajo) (Borchiellini, *et al.* 2004 y Erpenbeck, *et al.* 2012).

A inicios de los años 80's, con el desarrollo y popularización de nuevas tecnologías moleculares (p.ej. PCR y secuenciación Sanger de ADN), se generó información molecular (ADN), lo cual resultó de gran ayuda para el sustento a los resultados obtenidos mediante análisis morfométricos. Entre los primeros análisis filogenéticos robustos derivados de marcadores moleculares (28S 'C1, D1 y D2' y 18S) del ADN ribosomal, se mostró que Dictyoceratida y Dendroceratida formaron un clado monofilético, separado de Verongiida y Halisarcida, (Borchiellini *et al.* 2004). Además, se sugirió la restitución del nombre "Myxospongiae" para el clado que conformaron las Verongiida, Halisarcida y Chondrosida, cuyos miembros

comparten como sinapomorfía su estructura ultracelular y su similitud en el proceso de fertilización y desarrollo embrionario (Maldonado, 2009).

Posteriormente Erpenbeck, *et al.* (2012), presentaron una reconstrucción filogenética de las esponjas “Corneas”, basada en marcadores nucleares y mitocondriales, la cual mostró las relaciones evolutivas que guardan estos grupos de especies. Los autores sugieren reestablecer Keratosa con una categoría de subclase para incluir los órdenes Dendroceratida y Dictioceratida, mientras que la agrupación formada por Chondrosida, Halisarcida y Verongiida previamente llamado “Myxospongiae” por Borchiellini, *et al.* 2004, fue atribuida a la subclase denominada por los autores como Verongimorpha, esto para corregir el uso incorrecto de Myxospongiae para definir al grupo (Erpenbeck, *et al.* 2012).

Recientemente, Morrow y Cárdenas (2015), mantuvieron a la Subclase Verongimorpha, considerando también la información que se tiene sobre caracteres larvarios citológicos. Dentro de la subclase Verongimorpha se encuentran los órdenes Chondrillida Redmond, *et al.* (2013), Chondrosiida Boury-Esnault & Lopés, 1985 y Verongiida Bergquist, 1978.

Las esponjas del Orden Verongiida se caracterizan principalmente por poseer fibras rellenas, con una corteza y un centro muy bien definidos. En general, el esqueleto puede ser una reticulación anastomosada o bien de tipo dendrítico, pero sin diferenciación entre categorías de tamaño en las fibras (Bergquist & Cook, 2002). La consistencia de la mayoría de los individuos es carnosa y flexible. En cuanto a su reproducción, son ovíparas, es decir, el desarrollo embrionario de crías se lleva a cabo en el exterior del cuerpo. Tienen una característica oxidativa, debido a que, al ser extraídas de su medio, presentan un cambio de color claro (Ej.: amarillo, verde, etc.) a uno más oscuro, como morado o negro (Bergquist & Cook, 2002). Desde el punto de vista bioquímico, carecen de terpenos, lo cual hace que sean consideradas como el único grupo de esponjas que produce compuestos brominados (Bergquist & Cook 2002). A nivel morfológico, han sido clasificadas en cuatro familias, diferenciadas principalmente por el tipo de estructuras esqueléticas (anastomosada-dendrítica) y en la forma de las cámaras

de coanocitos (Bergquist & Cook, 2002). Las familias reconocidas en este Orden son: Aplysinellidae Bergquist 1980, Ianthellidae Hyatt 1875, Pseudoceratinidae Carter 1885 y la correspondiente a la especie del presente estudio, Aplysinidae Carter 1875 (World Porifera Database, 2017).

2.2. El género Aplysina en el Pacífico Oriental: A. gerardogreeni, Gómez y Bakus 1992.

Entre las verongidas, destacan las especies correspondientes al género *Aplysina*, el cual es caracterizado por poseer un solo tipo de fibras, con una médula ancha y sin material foráneo. Las fibras forman una reticulación regular con mallas largas poligonales y una disposición superficial sin especialización (Bergquist & Cook, 2002).

Actualmente, el género *Aplysina* cuenta con 88 especies, de las cuales 44 poseen una descripción clara y completa (World Porifera Database, 2017). Sin embargo, para la mayoría de las especies sus descripciones son muy antiguas y obsoletas, incluso en algunos casos existe la pérdida de material tipo, por lo que, de este número, se ha sugerido que sólo 22 especies (tabla 1) son claramente reconocidas (World Porifera Database, 2017; Cruz-Barraza, *et al.* 2012). Estas especies se encuentran distribuidas en aguas tropicales y subtropicales del Mar Mediterráneo, del Océano Pacífico y del Océano Atlántico (World Porifera Database, 2017).

Específicamente en el Pacífico oriental han sido registradas 4 especies del género *Aplysina* (tabla 2): *A. clathrata* y *A. revillagigedi* en el área del Pacífico mexicano (Cruz-Barraza, *et al.* 2012); *A. gerardogreeni* con registros tanto en el Pacífico mexicano (Gómez & Bakus, 1992; Cruz Barraza, *et al.* 2012), como el de Panamá (Caballero-George, *et al.* 2010) y *A. chiriquensis* en Panamá (Díaz, *et al.* 2005). Adicionalmente, se han registrado dos especies más del orden Verongiida, *Suberea azteca* del Pacífico mexicano (Gómez & Bakus, 1992) y *Verongia thiona* en California, EU (Laubenfels, 1932).

Recientemente, Cruz-Barraza, *et al.* (2012), realizaron una de las primeras aproximaciones a la taxonomía integrativa, filogenia y biogeografía del género *Aplysina* del Pacífico Oriental. Esto mediante el uso de características morfológicas, bioquímicas (composición de quitina) y moleculares (COI mitocondrial y ADN ribosómico nuclear: ITS1-5.8-ITS2). En el estudio tres especies fueron definidas, *A. clathrata*, *A. revillagigedi*, y *A. gerardogreeni*. De acuerdo a sus resultados, *COI* mostró cierto límite en la resolución para discriminar entre especies (Cruz-Barraza, *et al.* 2012); situación que pone de manifiesto la necesidad de explorar otros marcadores moleculares que nos puedan ayudar a obtener una mejor distinción entre las especies de este grupo.

Tabla 1. Especies del género *Aplysina* claramente reconocidas y su distribución, hasta el momento (Laubenfels 1930; Carballo 1994; Bergquist & Cook 2002; Díaz, *et al.* 2005 y Cruz-Barraza, *et al.* 2012).

Especies del Pacífico Oriental	Distribución
<i>A. gerardogreeni</i> , Gómez & Bakus, 1992.	De México a Panamá
<i>A. revillagigedi</i> , Cruz-Barraza, <i>et al.</i> , 2012.	Revillagigedo archipiélago, México
<i>A. clathrata</i> , Cruz-Barraza, <i>et al.</i> , 2012.	México
<i>A. chiriquensis</i> , Díaz, <i>et al.</i> , 2005.	De Panamá a Islas Galápagos
<i>Verongia thiona</i> de Laubenfels, 1930.	California EU.
Especies del Océano Atlántico	
<i>A. alcicornis</i> Pinheiro <i>et al.</i> , 2007.	Brasil
<i>A. caissara</i> Pinheiro & Hajdu, 2001.	Sureste de Brasil
<i>A. cauliformis</i> (Carter, 1882)	De Florida a Brasil
<i>A. cristagallus</i> , Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007.	Brasil
<i>A. fistularis</i> (Pallas, 1766)	Atlántico tropical Oeste
<i>A. fulva</i> (Pallas, 1776)	Atlántico tropical Oeste
<i>A. insularis</i> (Duchassaing y Michelotti 1863)	Atlántico tropical Oeste
<i>A. latuca</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Noreste de Brasil
<i>A. lacunosa</i> (Lamarck, 1814)	Atlántico tropical Oeste
<i>A. lingua</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Brasil
<i>A. muricyana</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Brasil
<i>A. orthoreticulata</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Brasil
<i>A. pergamentacea</i> Hechtel, 1983	Brasil
<i>A. pseudolacunosa</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Brasil
<i>A. solangeae</i> Pinheiro, <i>et al.</i> , 2007	Noreste de Brasil
Especies del Mediterráneo	
<i>A. aerophoba</i> Nardo, 1843	Mar Mediterráneo
<i>A. cavernícola</i> Vacelet, 1959	Mar Mediterráneo

De acuerdo con Gómez y Bakus (1992), *A. gerardogreeni* (especie objeto de estudio en este trabajo) se caracteriza por ser una esponja masiva y lobular, presentando lóbulos, cada uno con un ósculo en la parte superior. El color en vida de la esponja es ocre-amarillo en la base, y rojizo en la parte superior. Al mantenerla en contacto con alcohol, adquiere una coloración púrpura oscuro (se oxida). Además, la especie cuenta con pequeños tubos en la parte superior, de coloración ocre-amarillo, con fibras de espongina que no muestran diferencias entre primarias y secundarias, con una médula que varía entre el 33-80% respecto al diámetro de la fibra, presentando mallas con cámaras anchas de entre 200-2000 μm y los coanocitos que van desde las 12 y las 17 μm .

En el área del Pacífico mexicano, *A. gerardogreeni* ha sido encontrada en rocas de entre los 4 y 21 metros de profundidad, en las costas de los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit y Oaxaca (Gómez & Bakus, 1992; Cruz-Barraza, *et al.* 2012).

2.3. Marcadores moleculares y su evolución

La taxonomía tradicionalmente se ha basado en el análisis de características fenotípicas, las cuales se evalúan mediante diagnósticos morfológicos. Dichos diagnósticos, presentan ciertas desventajas, tales como la limitación cuantitativa, la validez única en alguna etapa de crecimiento de la especie y su influencia por el ambiente (Carroll *et al.* 2007). Por esta razón, en los últimos años, biólogos evolutivos han buscado la manera de contar con datos morfológicos, pero también moleculares, con el objetivo de contrastarlos y generar hipótesis taxonómicas y filogenéticas más robustas, y con ello estimar la variación dentro de las poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas (Hillis & Wiens, 2000).

Los marcadores del tipo molecular se encargan de localizar y caracterizar una región del genoma de interés, con la finalidad de encontrar polimorfismos útiles para la sistemática molecular o para estudiar procesos microevolutivos (Liu & Cordes, 2004). Actualmente, existe una gran variedad de técnicas moleculares que permiten conocer cómo se encuentran distribuidos los genes y en qué proporciones, en las diferentes poblaciones naturales de manera indirecta,

mediante el uso de proteínas, o de manera directa, con el estudio del ADN (Simpson, 1997).

Anteriormente, se consideraba que la secuenciación de ADN o ARN sería más difícil que secuenciar proteínas, de hecho, se estima que fue poco el progreso de la secuenciación en los años 60's. Esto se debió, en gran parte, a la falta de substratos puros de un tamaño adecuado para el desarrollo de métodos y a la composición de los ácidos nucleicos. Además, se creía que la interpretación de los resultados de la secuenciación de los ácidos nucleicos sería más difícil que el de proteínas, y con ello, tendrían que aislar productos de degradación aún más grandes para traslaparlos y deducir sus secuencias (De Necochea *et al.* 2004).

A principios de los años 70's, se inició con la investigación sobre la secuenciación del ADN y fueron publicados diversos artículos en Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, entre ellos, hubo uno especial, titulado "A new method for sequencing ADN", donde fue afirmado que el ADN puede ser secuenciado mediante un procedimiento químico (Maxam & Gilbert, 1977). En general, en este método un fragmento de ADN de cadena doble o sencilla se marcaba en los extremos 5' o 3' de una o ambas hebras con ^{32}P , después, la muestra de ADN se dividía en cuatro alícuotas y se fragmentaba en cuatro reacciones químicas distintas, una que contenía dimetil sulfato (DMS) para metilar las purinas adenina y guanina (corte de purinas), otra para obtener específicamente adeninas (corte de adeninas) mediante un ácido diluido, otra para obtener pirimidinas (corte de pirimidinas) con el uso hidracina y la última para obtener citosinas (corte de citosinas), con NaCl 2M y el uso de piperidina. El producto de esta síntesis química (fragmentos de ADN) lograba ser separado por electroforesis en cuatro carriles distintos con base en su tamaño (Maxam & Gilbert, 1977). Este método, a pesar de que cumplía con el objetivo de secuenciación, se encontraba limitado debido a la baja resolución de los geles de acrilamida, además de la compleja tarea de separar fragmentos más grandes y el ensanchamiento de bandas cuyas secuencias favorecían la formación de estructuras secundarias.

Posteriormente, fue desarrollado un método de secuenciación de pequeños fragmentos de ADN cuyo enfoque diferencial, frente a la propuesta de Maxam y Gilbert que era predominantemente química y tomaba al menos un día, este método se desarrollaba mediante la síntesis enzimática de la cadena complementaria del fragmento de ADN a secuenciar. En general, mediante este método se realizaban cuatro reacciones distintas de síntesis de ADN empleando un dideoxinucleótido (ddNTP) diferente en cada tubo y nucleótidos normales, permitiendo así la síntesis de diversos fragmentos que culminan con un ddNTP específico, los cuales son separados mediante una electroforesis, de acuerdo a su tamaño. Esta metodología logró secuenciar el ADN en horas. Utilizando esta estrategia, lograron secuenciar totalmente el bacteriófago Φ -X174 y desde entonces es el método más utilizado para determinar secuencias de ADN (Sanger, *et al.* 1978).

Aunque a principios de los años 80's, la secuenciación era todavía un proceso manual, a mediados del mismo, fue desarrollado el primer método automatizado para secuenciar ADN, logrando secuenciar fragmentos de 5 a 75 pb (Catuthers y Hood 1982). Posteriormente, se diseñó el primer secuenciador automático que utilizaba rayos láser que reconocía los marcadores de fluorescencia en el ADN (Hood & Smith, 1986).

A mediados de los 80's, la secuenciación dio un gran salto técnico gracias al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual es una técnica que permite amplificar millones de veces fragmentos específicos de ADN (Mullis, 1990).

Cabe señalar que, con el desarrollo del proyecto del genoma humano en 1990, tres grupos de investigación diseñaron el método de electroforesis capilar en forma simultánea, método que, posteriormente, sería de gran utilidad en la secuenciación (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Como resultado, el primer genoma totalmente secuenciado fue el de una célula procariota (*Haemophilus influenzae*) en 1995 y seguidamente, se obtuvo el genoma de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Posteriormente, en el año de

1998, se completó la secuenciación del genoma de un animal (*Caenorhabditis elegans*) y al año siguiente se obtuvieron los resultados de la secuenciación del primer cromosoma humano (Cromosoma No. 22). A partir de aquí, se dispuso de equipos de secuenciación automática, lo que facilitó la secuenciación de nuevos genomas de una forma más rápida. De esta manera, en el año 2000, se dispuso del primer genoma de un vegetal (*Arabidopsis thaliana*) y tres años más tarde, se obtuvo la secuenciación del genoma humano completo. Para que este tipo de información estuviese al alcance de todos, fueron desarrollados sistemas de cómputo capaces de almacenar y procesar los datos (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001 y Olson, 1993).

A partir de 2011 fueron generadas varias plataformas para realizar la secuenciación de ADN usando otras tecnologías: Ion Torrent®, Pacific Biosciences®, Illumina MiSeq® (Quail M. A., *et al.* 2012). En 2012, Illumina® lanzó una nueva versión de su secuenciador HiSeq® 2500, esta versión, es un sistema de nueva generación de secuenciadores, cuya característica principal es la rapidez (genera secuencias de genomas en menos de 24 horas), ya que puede generar 120 Gb (gigabases) en 27 horas o 600 Gb por corrida (Quail M., *et al.* 2012).

2.4. Marcadores moleculares en Porifera.

Al inicio de la “era molecular”, las proteínas enzimáticas polimórficas (allozymes) fueron implementadas en el estudio de los Porifera, debido a que resultaron de gran utilidad para evaluar la variabilidad entre poblaciones y la adaptación a condiciones ambientales particulares. Sin embargo, presentaron problemas prácticos importantes, tales como la exigencia tejido fresco, la complejidad en la interpretación de los geles de electroforesis, y la dificultad para comparar los resultados entre estudios (Solé-Cava & Boury-Esnault 1999, Borchiellini *et al.* 2000 y Van Oppen *et al.* 2002). Estos inconvenientes, junto con los nuevos avances tecnológicos, como la reacción en cadena de la PCR, llevaron a muchos de los investigadores en el campo de la ecología molecular a pasar de los análisis de proteínas a los de genes, tendencia que siguió la ecología molecular de esponjas (Uribe M. & Turon X., 2012).

La ecología molecular en esponjas es una disciplina relativamente nueva, la cual resulta de la aplicación de herramientas moleculares tanto a las nuevas cuestiones de ecología como las de ecología tradicional (Uriz M. & Turon X. 2012). En esponjas, tanto el estado de salud como la capacidad de adaptación a cambios ambientales se han estimado mediante un análisis riguroso de descriptores genéticos, tales como la diversidad genética, el flujo de genes, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, la endogamia, los cambios en el tamaño efectivo de la población, entre otros (Grosberg & Cunningham, 2001; Hellberg *et al.* 2002; Pearse & Crandall, 2004 y Charlesworth, 2009). Estos descriptores genéticos, se calculan a partir de datos relacionados con las frecuencias alélicas o mediante las diferencias en sus secuencias y también, a partir de su variación individual y entre poblaciones. Para lograr obtener una evaluación precisa de los descriptores genéticos es necesario contar con marcadores moleculares polimórficos (Uriz M. & Turon X. 2012).

El uso de una secuencia específica de ADN para la identificación de especies se consolidó a partir del 2003, con el proyecto internacional conocido como “Barcode of Life” (Código de Barras Genético, en español), en el que la región propuesta para la caracterización de especies animales consiste en secuenciar 658 pares de bases del gen mitocondrial *citocromo c oxidasa* (COI) (Hebert, *et al.* 2003 y Valentini, *et al.* 2008).

De manera generalizada, los datos de secuencias de varios genes de ADN mitocondrial y nuclear han sido utilizados para temas relacionados con la ecología de invertebrados marinos. El ADN mitocondrial, en particular, ha sido y sigue siendo de gran importancia en filogeografía y genética de poblaciones (Avise, 2000 y Avise, 2009). Aunque en algunos casos, se ha demostrado que este marcador puede mostrar información limitada, principalmente en invertebrados diploblásticos como las esponjas y cnidarios (Erpenbeck, *et al.* 2006).

2.5. Marcadores mitocondriales (ADNmt) y nuclear- ribosomales (ADNr) para estudios en sistemática.

De forma general, el ADNmt de las esponjas ha mostrado un nivel bajo de variabilidad entre especies, lo que limita su aplicación en estudios taxonómicos (Durán, *et al.* 2004a; Wörheide, *et al.* 2005). Aún no es muy claro porqué el ADNmt de los poríferos muestra una baja tasa de evolución (Lavrov, *et al.* 2005). No obstante, hasta ahora sólo se ha analizado un número limitado de loci mitocondriales (principalmente COI), por lo que se requiere investigar otros genes. Una opción podrían ser los Espaciadores Transcritos Internos (ITS) del genoma nuclear ribosomal, que separan regiones conservadas, los cuales han sido utilizados para estudios de nivel filogenético y poblacional (Wörheide, *et al.* 2002 y Durán, *et al.* 2004b). Sin embargo, se ha reconocido que los polimorfismos intra-genómicos (IGP) pueden representar un problema para la aplicación de este marcador en estudios de genética de poblaciones de esponjas, por lo que deben ser evaluados previamente. Los IGP se deben a una falta de homogeneización de las múltiples copias de los grupos de ADNr del genoma (Durán, *et al.* 2004b; Wörheide, *et al.* 2004). Lo anterior apunta a la importancia de desarrollar nuevos marcadores nucleares en esponjas para ser usados en estudios de genética poblacional. Dichos marcadores deberán de desarrollarse preferiblemente a partir de genes de copia única con alta variabilidad (p.ej., intrones) (Wörheide, *et al.* 2005).

2.6. Mitogenomas de esponjas: el género *Aplysina*.

De las 8,847 especies de esponjas consideradas válidas (World Porifera Database, 2017), sólo se han secuenciado 33 mitogenomas, de los cuales sólo 2 (6.0%) pertenecen al Orden Verongiida, *Aplysina fulva* (Lavrov, D. & Wang, X. 2008) y *A. cauliformis* (Sperling, *et al.* 2011). Estos últimos obtenidos mediante el uso de la secuenciación tipo Sanger.

La secuenciación del mito-genoma de *A. cauliformis* brindó información acerca del genoma mitocondrial en su género. Sperling y colaboradores (2011), compararon la región *cox1* de especies de *Aplysina* del Caribe, pero a pesar de que las especies mostraban diferencias morfológicas claras, los resultados moleculares

mostraron que existe poca variabilidad a nivel de ADN. Dichos resultados sugieren que *cox1*, si bien podría ser útil en la resolución de divergencias relativamente antiguas, no es de utilidad para diferenciar especies de esponjas que recientemente divergieron, inclusive cuando se incluye la región 30, la cual es considerada la más variable. Sin embargo, los genes *atp8* y *nad6* son los de más rápida evolución en los genomas mitocondriales de la clase Demospongiae (Wang & Lavrov 2008) y, aunque son pequeños, se podrían utilizar para construir cebadores universales degenerados (Sperling, *et al.* 2011). Además de comparar la región *cox1*, también compararon los mitogenomas de *A. cauliformis* y de *A. fulva*. En dicha comparación observaron sólo seis sustituciones de nucleótidos y otros 11 con sitios de variación potencial, en todo el mitogenoma. De los seis SNPs que asignaron, dos se encuentran en *nad5* y dos en *nad2*. De acuerdo a estudios previos, la expresión del aminoácido de la región *nad2* muestra resultados variantes, por lo que se sugiere la exploración de ese gen como un marcador para la discriminación a nivel de especie puede estar justificada mediante éste aminoácido. Sperling y colaboradores concluyen que se requiere de mayor información para robustecer las comparaciones entre los genomas mitocondriales completos de varios individuos de diferentes especies.

2.7. Microsatélites (SSR o STR) y el estudio ecológico de los Poríferos.

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencias simples (SSR) o repeticiones cortas en tándem (STR), se encuentran entre los loci más variables del genoma (Li, *et al.* 2002). Dada su alta tasa de mutación, posibilitan un análisis preciso de las relaciones genéticas entre poblaciones y, junto con las nuevas herramientas de análisis (Csilléry, *et al.* 2010), el flujo de genes y la clonalidad en las esponjas. Sin embargo, la naturaleza específica de la especie de los microsatélites, hace necesario desarrollarlas de nuevo para cada nueva especie. Para desarrollarlos se requiere de tiempo en la preparación y en la selección a partir de bibliotecas genómicas. Este inconveniente es probablemente responsable del escaso número de especies de esponjas en el que han sido desarrollados los marcadores microsatelitales (Duran, *et al.* 2002) (**Tabla 2**)

Tabla 2. Recopilación del número de microsatélites desarrollados para las diferentes especies de esponjas.

Especie	Número de loci microsatelitales	Autor/Año
<i>Halichondria panicea</i> , Pallas, 1766.	7	Knowlton, <i>et al.</i> 2003.
<i>Crambe crambe</i> , Schmidt, 1862.	6	Duran, <i>et al.</i> 2004.
<i>Scopalina lophyropoda</i> , Schmidt, 1862.	7	Blanquer, <i>et al.</i> 2005.
<i>Hymeniacidon sinapium</i> , Laubenfels, 1930.	8	Hoshino & Fujita 2006.
<i>Spongia lamella</i> (<i>S. agaricina</i>), Schulze, 1879.	8	Noyer, <i>et al.</i> 2009.
<i>Spongia officinalis</i> , Linnaeus, 1759.	10	Dailianis, <i>et al.</i> 2010.
<i>Paraleucilla magna</i> , Klautau, Monteiro y Borojevic, 2004.	9	Guardiola, <i>et al.</i> 2011.
<i>Clathrina aurea</i> , Solé-Cava, Klautau; Boury-Esnault, Borojevic y Thorpe, 1991.	7	Padua, <i>et al.</i> 2013.
<i>Ircinia fasciculata</i> , Pallas, 1766.	14	Riesgo, <i>et al.</i> 2014.
<i>Hemimycale columella</i> , Bowerbank, 1874.	15	González, <i>et al.</i> 2015.
<i>Petrosia ficiformis</i> , Poiret, 1789.	10	Taboada, <i>et al.</i> 2015.
<i>Plenaster craigi</i> Lim & Wiklund, 2017.	14	Taboada, <i>et al.</i> 2017.

Aunque son pocas las especies involucradas, los marcadores microsatélites desarrollados para las esponjas han permitido una serie de estudios recientes a nivel intra e interpoblacional, descubriendo patrones de estructura genética en varias escalas, y permitiendo el estudio de clonalidad y quimerismo (Duran *et al.* 2004c; Calderón *et al.* 2007; Hoshino *et al.* 2008; Blanquer *et al.* 2009, Blanquer & Uriz 2010; Noyer, 2010; Dailianis, *et al.* 2011; Guardiola, *et al.* 2011; y Uriz M. & Turon X. 2012). En los últimos años, la aplicación de microsatélites ha revitalizado el campo de la ecología molecular en esponjas (Uriz M. & Turon X. 2012).

2.8. El sentido de la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación en Poríferos.

Mediante las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se pueden obtener loci que contengan repeticiones en tándem (microsatélites) y optimizarse sus condiciones de amplificación, secuenciando una parte del genoma (Agell & Uriz, 2010 y Jennings, *et al.* 2011). Muchos de los estudios ecológicos de esponjas anteriormente realizados, pueden beneficiarse mediante el uso de métodos moleculares para fortalecer sus conclusiones (Uriz M. & Turon X. 2012).

Particularmente, una de las cuestiones que sobresalen en el campo de la ecología molecular en esponjas es la evaluación de cómo las esponjas pueden responder a los cambios ambientales (Carroll, *et al.* 2007). En estricto sentido, las esponjas son organismos sésiles (organismos inmóviles), viven al fondo del mar en fase adulta y no pueden migrar; por lo que deben responder a las nuevas condiciones fisiológicamente, para adaptar su metabolismo y sobrevivir; esta capacidad de supervivencia en un área dada, está definida por su constitución genética. En contraste, cuando las condiciones resultan desfavorables, la mortalidad selectiva resulta en la evolución de la adaptación genética local, o inclusive pudiesen extinguirse poblaciones localmente. En ambos casos, los marcadores genéticos pueden ayudar a evaluar el impacto de los cambios ambientales sobre las esponjas (Hutchings, *et al.* 2007).

Por otra parte, a partir de la información que sea generada de las nuevas tecnologías de secuenciación, pueden resolverse problemas tanto biológicos como

ecológicos, como la reproducción (McKinnon, *et al.* 2004), el crecimiento, la resistencia y/o vulnerabilidad a perturbaciones, las respuestas a los cambios naturales, interacciones química o físicamente mediadas, la competencia, el comensalismo y la ecología larvaria (Palumbi, *et al.* 2008).

3. Justificación e importancia

Las esponjas del género *Aplysina* son consideradas un recurso potencial de gran interés biológico y químico, debido a la capacidad que tienen de sintetizar compuestos bioactivos. Además de su potencial biotecnológico e interés en la bioingeniería (véase *introducción*). Esto aunado a la dificultad que representa su estudio morfológico (véase antecedentes) y a la baja variabilidad nucleotídica de marcadores moleculares tradicionales (COI, ITS, 18S, 28S), pone de manifiesto la necesidad de desarrollar marcadores con mayor resolución. Para lograrlo, nosotros analizamos a la especie *Aplysina gerardogreeni* mediante la implementación de herramientas de secuenciación de ADN de siguiente generación (NGS). El uso de estas tecnologías nos permitirá identificar loci microsatelitales y seleccionar aquellos que sean candidatos a marcadores moleculares, para finalmente probar su variabilidad y eficiencia en la ecología de las poblaciones. Por otra parte, la disponibilidad de secuencias genómicas permitirá el ensamblaje y anotación del genoma mitocondrial y se podrá comparar con otros mito-genomas de especies afines, con la finalidad de detectar los genes más variables que puedan tener una aplicación en la sistemática del grupo.

4. Hipótesis

Mediante el análisis de las secuencias logradas por secuenciación masiva, se logrará obtener loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares y la secuencia que codifica el ADN mitocondrial de la especie *Aplysina gerardogreeni*.

Preguntas de investigación:

- 1.- ¿Cuántos microsatélites funcionales se pueden obtener de la secuenciación masiva?
- 2.- ¿Qué tan diferente (y qué genes son más variables) es el mitocondrial de *A. gerardogreeni* con respecto a otras especies del género?

5. Objetivos

General

Contribuir al conocimiento biológico, ecológico y evolutivo de esponjas del género *Aplysina*, mediante la secuenciación masiva de la especie *Aplysina gerardogreeni* para el desarrollo de marcadores moleculares.

Objetivos específicos

1. Secuenciar el genoma de la esponja *Aplysina gerardogreeni*.
2. Ensamblar y anotar la secuencia del genoma mitocondrial.
3. Identificar loci microsatelitales y desarrollar cebadores específicos para su amplificación por PCR.
4. Optimizar la amplificación por PCR y evaluar el nivel de polimorfismo de los loci microsatelitales candidatos.

6. Área de estudio

Especies del género *Aplysina* han sido registradas en diversas localidades a lo largo del Pacífico mexicano (Gómez & Bakus 1992 y Cruz-Barraza *et al.* 2012). Para este estudio, el área geográfica considerada corresponde a la isla Pájaros que se encuentra al noroeste de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México (Fig. 1), cuya ubicación geográfica es 23°25'47" al norte, 106°47'67" al oeste, a 10 m de profundidad (<http://mazatlan.gob.mx/turismo/datos-geograficos/localizacion>). El sustrato varía desde rocoso a rocoso con parches arenosos hasta los 5-6 m de profundidad. Debajo de esta profundidad, no se presentan afloramientos rocosos importantes y el ambiente es principalmente sedimentario con pequeños afloramientos rocosos.

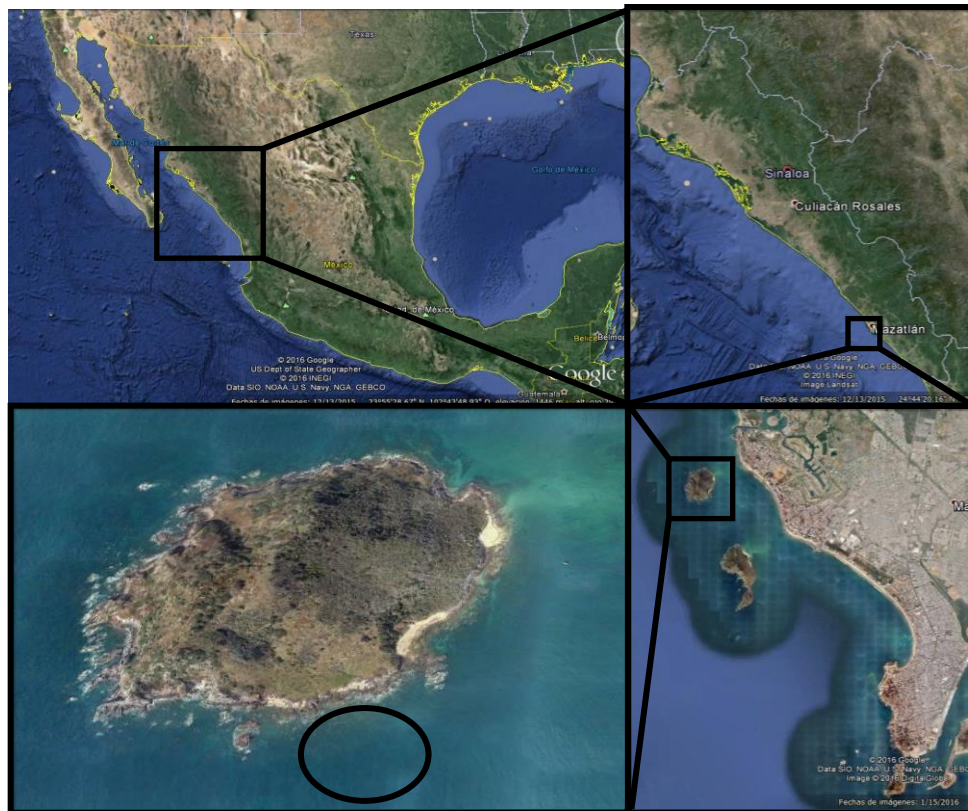


Figura 1. Ubicación del área de estudio, Isla Pájaros Mazatlán, Sinaloa, México (google US Dept of state geographer 2016; INEGI Data SIO, NOAA, US Navy, NGA, GEBCO, 2016).

El clima del área es tropical y subtropical, tipo cálido subhúmedo. El máximo de precipitaciones se presenta durante el mes de septiembre. El periodo de lluvias comienza a mediados de junio con un promedio mensual de 48.8 mm ascendiendo hasta alcanzar su máximo (274.2 mm) a mediados de septiembre (Comisión Nacional del Agua 2002). La zona es afectada por tormentas tropicales y huracanes que provienen del noroeste del Pacífico, que generalmente se presentan de julio a octubre. Los vientos predominantes son del oeste, noroeste y oeste-noroeste, con una velocidad promedio anual de 3.4 m/s, prevaleciendo durante el invierno los vientos del noroeste, denominados “Colas” y vientos variables. Durante el verano los vientos son del sur y sureste, son fuertes, aunque de corta duración (Secretaría de Marina, 1974).

La temperatura media anual del aire es de 24°C, siendo de julio a septiembre los meses más cálidos, con un promedio de 28°C. La humedad relativa media anual es de 76%, siendo el mes de septiembre el que alcanza mayor humedad (79%). El promedio anual de la presión atmosférica es de 1004.7 mb (Comisión Nacional del Agua, 2002).

Los estudios oceanográficos de Roden (1958) en el área del sur del Golfo de California, señalan la presencia de una corriente que entra al Golfo por la costa este (parte continental) y sale por la costa oeste (parte de la península) en un giro contrario al de las manecillas del reloj.

Para el puerto de Mazatlán el régimen de mareas queda comprendido en el intervalo entre 0.25 y 1.5 que corresponde al tipo mixto semidiurno (Pond & Pickard 1983), es decir, generalmente se dan dos pleamares y dos bajamares.

Las olas más frecuentes provienen del noroeste, norte, oeste y suroeste en orden descendente y dentro de esas direcciones, las de mayor energía son las del suroeste y oeste. Las olas provenientes del suroeste ocasionalmente son generadas por tormentas tropicales y son las que causan mayores daños en áreas costeras. Dada la amplia variabilidad de las condiciones de oleaje, son notables los cambios de dirección y magnitud del transporte litoral a través de periodos largos de tiempo (Montaño, 1985).

Los sistemas intermareales rocosos están afectados estacionalmente por la deposición de arena (Littler & Littler 1980). El patrón anual de la afluencia de arena a lo largo del noroeste del Pacífico muestra que se incrementa la deposición de arena en los ambientes intermareales rocosos a través de los meses del verano (Hedgpeth 1957, Markham, 1973 y Shephard, 1973). El transporte litoral de arenas ha sido cuantificado aplicando un modelo de tipo predictivo en dos playas de la costa sur de Sinaloa., ubicadas 30 km al noreste y 25 km al sureste del puerto de Mazatlán. En la playa ubicada al noreste, se determinó un transporte neto de 41.056 m³/año mientras que en la playa del sureste de 179.442 m³/año (Montaño y Peraza, 1986).

En la bahía de Mazatlán se puede diferenciar 3 zonas de sedimentación en relación con la lejanía de la fuente sedimentos a) proximal: arena gruesa y fina. Compuesta por terrígenos finos y fragmentos de roca y concha; b) intermedia: arena media, compuesta por fragmentos de roca de concha; c) distal: arenas de grano fino con concentraciones de ferromagnesianos, así como fragmentos de roca y concha en proporciones similares (Alba *et al.* 1979). Los cambios más significativos en los perfiles de playa ocurren de septiembre a octubre, periodo normalmente caracterizado por condiciones severas de oleaje (Montaño y Gutiérrez 1987).

La temperatura media anual de la superficie del mar es de 24.4°C y la salinidad promedio anual es de 35‰ (Calendario Gráfico de Mareas, 1988).

7. Materiales y métodos

7.1 Muestreos.

Los muestreos se realizaron por recolección directa, mediante buceo autónomo hasta una profundidad de 12 metros en la Isla Pájaros, Mazatlán, Sinaloa (área de estudio). Se procuró tomar individuos distantes para evitar la recolecta de clones. De manera general, se realizaron 2 muestreos, en el primero se colectaron los individuos para la secuenciación masiva (objetivo) y en el segundo, se colectaron los individuos para llevar a cabo las pruebas experimentales de los marcadores moleculares.

Adicionalmente, se incorporaron dos individuos de la especie *A. gerardogreeni*, AGE-IES-12 y 24T, de la Isla Espíritu Santo (Golfo de California) y de la Isla Isabel, respectivamente. Esto, con la finalidad de corroborar la variación genética (alelos) entre la población colectada (Mazatlán) y las de estas dos localidades.

7.2 Tratamiento de los ejemplares en el laboratorio.

Los ejemplares fueron analizados a simple vista y se realizó una descripción de su morfología externa, tomando en cuenta el color, la forma, superficie, consistencia, etc. Posteriormente, fueron llevados al laboratorio y puestos en un acuario con recirculación para un tratamiento de los individuos antes de extraer su ADN. Posteriormente, fueron etiquetados y almacenados.

7.3 Identificación y descripción morfológica de los individuos de *Aplysina gerardogreeni* tomados en la Isla Pájaros de Mazatlán, Sinaloa.

Para el estudio taxonómico y la descripción morfológica, fueron utilizados todos los individuos, tanto los que se usaron para la secuenciación masiva como en las pruebas experimentales, con la finalidad de corroborar que todos los ejemplares correspondían a *Aplysina gerardogreeni*.

Además, se incorporó la estructura sistemática más reciente hasta nivel especie, así también, una breve diagnosis del género *Aplysina* (Erpenbeck *et al.* 2012).

7.4 Separación de las fibras de esponjina.

Se realizó un corte de la esponja (transversal o longitudinal) para obtener las fibras de esponjina. Posteriormente, se introdujo dicho fragmento en un tubo de ensayo,

el cual contenía una solución compuesta por 1/3 de agua destilada, 1/3 de agua oxigenada y 1/3 de hidróxido de amonio. Después de agitarla por varios minutos fue introducida a una estufa con una temperatura de entre 60-70°C durante 2 horas, esto con la finalidad de acelerar la reacción de descomposición o degradación de la materia orgánica. Posteriormente, luego de considerar, si la materia orgánica no había sido del todo eliminada, la operación se repetía hasta lograrlo (Olivella, 1977). Finalmente, mediante el uso de pinzas de punta fina, se tomó la fibra y se realizó un corte, de manera que se lograra obtener la red de fibras más completa. Dicho corte, fue colocado en un portaobjetos y fijado mediante unas gotas de montaje (Entellan) con la finalidad de que se preservasen las fibras de las muestras de estudio.

7.5 Tratamiento previo a la extracción de ADN.

Con la finalidad de reducir la carga microbiana y organismos fotosintéticos, los individuos de esponjas fueron colocados en un estanque bajo sombra y con circulación de agua durante 3 días. En estas condiciones, no se adicionó alimento y se realizaron recambios de agua (agua filtrada) para reducir la entrada de alimento, además de eliminar residuos sólidos (arena, conchas, etc.), micro o macrosimbiontes. Estas condiciones se realizaron con la finalidad de que la misma esponja absorbiera en parte a sus simbioses.

De acuerdo al protocolo de Freeman y colaboradores (2012), para obtener una mayor cantidad y calidad de ADN de la esponja es necesario separar los simbioses y material que afecte en la pureza de ADN. Inicialmente fue cortado un fragmento de un individuo de *A. gerardogreeni* y se trituró hasta obtener una masa homogénea. Posteriormente, mediante el uso de una malla de 20 µm de porosidad, la masa fue filtrada. Cabe mencionar, que la malla de 20 µm permite el paso a las células de la esponja (con un tamaño ~ 20 nm) y retuvo el resto de los residuos (estructuras esqueléticas, células microbianas de mayor tamaño o macrosimbioses, etc.).

Finalmente, fueron separadas células microbianas mediante una centrifugación diferencial. La centrifugación, inició con una fuerza centrífuga de 1,000 g y con un

tiempo de 2 minutos, el producto de esa centrifugación presentó 3 fases, de las cuales se retiraron la fase superior e intermedia, debido a que estas fases contienen aproximadamente el 80% de células microbianas y en la fase inferior se encuentra el pellet celular de la esponja. Posteriormente, el pellet de la esponja (células) fue resuspendido con agua de mar artificial (CMFASW) y nuevamente fue centrifugado a 1,000 g durante 2 minutos, este paso se repite dos veces. Consecutivamente, el pellet de la esponja se resuspendió con 1.5 mL de agua de mar artificial (CMFASW), se transfirió a un tubo de 2.0 mL y fue centrifugado a 1,000 g por 3 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante del producto de la centrifugación y el pellet de la esponja fue almacenado en un ultracongelador a -22°C (Freeman, *et al.* 2012).

7.6 Extracción y análisis del material genómico.

Para la extracción de ADN se empleó el kit promega Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega Corporation), siguiendo las instrucciones del proveedor (*véase anexo 5 “Protocolo para la extracción de ADN”*). Para visualizar y verificar el éxito de las extracciones, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml). Estos se visualizaron en un transiluminador con luz UV. Para corroborar el tamaño de las bandas, se utilizó una escalera de peso molecular (Bioline HyperLadder I). Finalmente, se capturó (mediante una cámara fotográfica) y archivó la imagen del gel para posteriores evaluaciones.

Para corroborar que el producto de la extracción de ADN correspondiente al material utilizado para la secuenciación masiva fuese de la esponja, se tomaron los productos de extracción de dos individuos (Aply-1 y Aply-2) y se amplificó la región COI (fragmento del ADN mitocondrial), utilizando los cebadores Aply-R y Aply-F.

Para la amplificación de la región COI, cuyos productos son de 650 pb, las condiciones químicas constaron de un volumen de 15 µl, que contenía 7.73 µl H₂O destilada (sterile MilliQ), 0.75 µl desoxiribonucleotidos trifosfatados (0.2 mM), 0.90 µl MgCl₂(8 mM), 0.50 µl de cada cebador (10 µM), 3.00 µl de 5× PCR buffer

(Promega), 0.12 μ l de Taq polimerasa de ADN, y 1 μ l de ADN genómico (c. 50–100 ng aprox.). Las condiciones de termociclado constaron de una desnaturalización inicial de 95°C durante 4 min, y 40 ciclos a 94°C durante 30 s, 52°C (para COI) durante 45 s, 72°C durante 1 min, y una extensión final de 72°C durante 4 min. Para corroborar la presencia del fragmento de interés, los productos PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5%. Los resultados positivos fueron purificados usando un kit de purificación (the Wizard purification kit-Promega) y fueron enviados a secuenciar a Macrogen, Korea. La secuenciación consistió en ambos sentidos (forward y reverse) empleando Applied Biosystems 3730xl DNA analysers por Macrogen, Korea.

7.7 Secuenciación masiva.

Se utilizó la plataforma Illumina[®] (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) para la secuenciación genómica por el método de paired-end reads. De acuerdo a la metodología, se prepararon bibliotecas independientes tipo TruSeq nano para el individuo y se agregaron a los fragmentos obtenidos, adaptadores de identificación.

Para realizar una secuenciación masiva se requirió de aproximadamente una cantidad mayor a 50ng / μ l y calidad de A260/A280 mayor a 1.80. Para verificar la cantidad y calidad del ADN obtenido, se empleó un equipo automatizado, Nanodrop. El resultado de la concentración fue mayor a 50ng / μ l y la calidad fue mayor a 1.50.

La corrida de secuenciación se llevó a cabo para el individuo usando 1/12 parte de una línea del equipo HiSeq 2500.

7.8 Análisis de secuencias

Para evaluar la calidad de las secuencias en crudo, fueron empleados dos programas, FastQC v 0.10.1 (Babraham Institute, Cambridge, UK) (Andrews, 2010) y el CLC Genomic Workbench 7.0.3 (CLC Bio, Boston, MA) (Knudsen y Flensburg, 2008).

7.9 Anotación mitocondrial

La búsqueda de la secuencia del genoma mitocondrial se llevó a cabo mediante una búsqueda BLAST (Altschup, *et al.* 1990) de los contigs de mayor longitud y profundidad, será seleccionado aquel en el que se encontraron porcentajes de similitud altos con genomas mitocondriales.

Además, se realizaron análisis de los locus con los ya publicados de *A. cauliformis* y *A. fulva*. En este sentido, buscó comparar nuestros resultados con los existentes para evaluar o estimar SNP's posibles entre los genomas.

7.9.1 Identificación y selección de loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares

La búsqueda de motivos repetitivos microsatelitales se realizó a partir del conjunto de Contigs obtenidos del ensamble *de novo* para la especie usando el programa Msatcommander (Faircloth 2008). El programa Msatcommander permite la búsqueda de loci microsatelitales (motivos repetitivos) a partir de contigs generados. Este programa te permite elegir el tipo de microsatélite de interés y seleccionar el mínimo de repeticiones. Además, se le puede ordenar que diseñe primers para amplificar por PCR los loci microsatelitales encontrados. En este estudio se buscó encontrar loci microsatelitales perfectos con motivos repetitivos de di, tri y tetranucleotidos, y además, que diseñara sus respectivos primers.

Asimismo, se buscó la mejora de algunos primers, en la medida de lo posible, mediante el programa Primer-BLAST.

Pruebas experimentales

7.9.2 Optimización de las condiciones de amplificación de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.

En la primera fase de optimización se buscó adecuar las condiciones químicas para las reacciones de PCR y las condiciones térmicas con lapsos de tiempo ideales para la obtención de los fragmentos de interés. Además, se incorporó un fluorocromo a la cola universal complementaria M13 del cebador Forward, esta extensión o cola universal "M13" consiste en 18 bases que permiten la incorporación de un fluorocromo al fragmento de ADN de interés mediante dos pasos de amplificación en los que intervienen tres cebadores distintos y dos

temperaturas de anillamiento diferentes (la óptima para cada locus y la temperatura de 53°C que es la óptima para la unión de la secuencia de la cola M13), de acuerdo a lo propuesto por Schuelke (2000). Para la segunda fase de optimización, en el presente proyecto, se siguió la metodología anteriormente descrita, a excepción de la adición del fluorocromo inicialmente. De acuerdo a la metodología de Arruda (2009), el fluorocromo con complemento al M13 del cebador forward, se añade para los últimos 10 ciclos de la reacción, esto con la finalidad de asegurar la incorporación del fluorocromo marcado en los productos amplificados por los primers R y F-M13.

Las condiciones químicas para todas las pruebas constaron de un volumen final de 13 µl, el cual incluía 6.1 µl H₂O destilada (sterile MilliQ), 0.75 µl dNTPs (0.2 mM), 1.10 µl MgCl₂ (8 mM), 0.50 µl de cada cebador (10 µM), 3.00 µl de 5× PCR buffer (Promega), 0.1 µl de Taq DNA polimerasa, y 1 µl de ADN genómico (c. 50–100 ng aprox.). Además de estas condiciones, se ajustó el perfil de termociclado de amplificación por PCR (**Tabla 9**).

Tabla 3. Perfil de termociclado de PCR usado para la amplificación de los loci ensayados.

	Tiempo	Temperatura
Pre calentamiento (hot start)	10 min	95°C
Desnaturalización	60 seg	94°C
Anillamiento	30 seg	59°C
Polimerización	120 seg	72°C
Incubación final	30 min	72°C

7.9.3 Caracterización genética

Una vez obtenidos los fragmentos de interés de cada locus, se procedió a la genotipificación, la cual fue realizada en La Universidad de Arizona, Estados Unidos. La genotipificación consiste en realizar un análisis electroforético de los

fragmentos amplificados en un secuenciador de ADN automático ABI 3130xl. Aquí se determina el tamaño de los fragmentos amplificados y marcados con fluorocromos (cola M13 marcada). Los resultados de la genotipificación se visualizaron en el software GeneMarker 2.4.0 con la finalidad de determinar los alelos de cada genotipo y la conversión de estos datos en tamaños alélicos discretos se realizó usando un macro de Excel, FLEXIBIN (Amos *et al.* 2007). La heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E) y el índice de contenido polimórfico (PIC) se estimó usando otro macro de Excel, Mstools (Park, 2001). Finalmente se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus y de desequilibrio en el ligamiento entre cada par de loci con el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier, *et al.* 2005).

8. Resultados

8.1 Taxonomía y descripción de los individuos de *Aplysina gerardogreeni*.

En total se colectaron 11 individuos de *A. gerardogreeni*, cada uno presentó diferentes dimensiones, pero conservaron las características típicas de la especie; como el color amarillo o marrón en la parte superficial; su forma, que va de incrustante a masiva; y lobular a tubulada, con un ósculo apical, además de sus redes de mallas poligonales, observables mediante microscopía (Figura 2 y Tabla 3).

A continuación, se muestran los individuos colectados, antes (números) y después de su preservación en alcohol (letra) (Figura 2), respectivamente.

Subclase **Verongimorpha** Erpenbeck *et al.* 2012

Orden **Verongiida** Bergquist, 1978

Familia **Aplysinidae** Carter, 1875

Género ***Aplysina*** Nardo, 1834

Diagnosis. Aplysinidae se caracteriza por poseer un solo tipo de fibras. Las fibras forman una reticulación regular con mallas poligonales largas y una disposición superficial sin especialización (Bergquist & Cook 2002).

Aplysina gerardogreeni Gómez & Bakus, 1992

Material examinado: Aply-1, Aply-1.1, Aply-2, Aply-2.1, Aply-3, Aply-4, Aply-5, Aply-6, Aply-7, Aply-8 y Aply-9.

Descripción morfológica. La forma común de la especie es incrustante a masiva (de 3 a 6 cm de alto) y va de lobular a tubulada caracterizada por un ósculo apical, aunque dentro de los individuos, se observó que los lóbulos pueden ser un tanto lineales y/o discontinuos (véase figura 2). La esponja cubre superficies de 10 a 18 cm de diámetro máximo, entre los túbulos se observaron “huecos” o “vacíos”, donde el sustrato al que está adherida puede verse. Es finamente conulosa; los cónulos son menores a 1 mm de alto. La consistencia es firme y suave; aun cuando es preservada en alcohol, pero se vuelve dura cuando se seca. La coloración es amarilla o marrón en la parte superior, en el medio natural. En cambio, cuando entra en contacto con el aire adquiere una coloración púrpura oscuro. Las características principales de cada individuo se muestran en la Tabla 3.

Esqueleto. Las fibras son de color ámbar claro, de 24 a 118 μm de diámetro, con una médula que abarca entre el 46 y el 73% de la fibra. El esqueleto presenta la estructura anastomosada típica del género con una luz de malla de 207 a 1621 μm (véase Tabla 4).

Distribución y hábitat. La especie fue originalmente descrita en el Pacífico mexicano (Gómez & Bakus 1992) y se ha encontrado en los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero y Oaxaca (Cruz-Barraza *et al.* 2012) y en Panamá (Caballero-George, *et al.* 2010). Los individuos se encontraban adheridos a sustratos duros como rocas, restos de coral o sustratos artificiales, desde el intermareal hasta 30 m de profundidad (Cruz-Barraza, *et al.* 2012).

Comentarios:

Es de reconocer, que existen ciertas variaciones en los individuos analizados, principalmente en la coloración, la abundancia de lóbulos y/o túbulos y su organización, además también varían en cuanto al tamaño. Por otra parte, no observamos diferencias en cuanto a su consistencia (Tabla 3).

En relación a las fibras, podemos observar una alta variación en lo que respecta al diámetro de la fibra, con un mínimo 24.7 μm (Aply 3) y un máximo de 118.56 μm

(Aply 2). De la misma forma, el dato con la menor diámetro de la médula (12.35 μm -Aply 6) y el máximo (81.51 μm -Aply 2.1). Además, observamos el porcentaje máximo que ocupa la médula sobre la fibra (73.60 μm -Aply 1) y su respectivo mínimo (46.12 μm -Aply 9). Finalmente, la luz de malla, que comprende la longitud máxima de extremo a extremo de las mallas de polígonos irregulares de las redes de reticulaciones, con un máximo (1621 μm -Aply 1) y un mínimo (207 μm -Aply 9).

En general se puede decir que la forma externa de *A. gerardogreni* es relativamente homogénea, estudios recientes han demostrado la alta plasticidad fenotípica que la especie puede presentar (Ley Velarde 2012). Para el caso de este estudio los individuos analizados mostraron la forma típica de la especie (Tabla 3) además, en general no se encontraron diferencias significativas con respecto a las medidas previamente reportadas por Gómez y Bakus (1992).

En cuanto a las medidas de las fibras, considerando las medidas ya registradas y a las obtenidas en el presente estudio, las cuales constaron de una luz de malla de entre 207 y 1621 μm contra 200 y 2000 μm (Gómez & Bakus, 1992), un diámetro de fibra de entre 24 y 118 μm contra 30 y 150 μm (Gómez & Bakus, 1992) y un porcentaje de médula en fibra de entre 46 y 73% contra 33 y 80% (Gómez & Bakus, 1992). Comparando estos resultados, se sugiere que las estructuras esqueléticas resultan ser un carácter muy variable, y al tomar en cuenta este carácter, podrían tenerse problemas en la diagnosis con especies afines e inclusive cercanas.

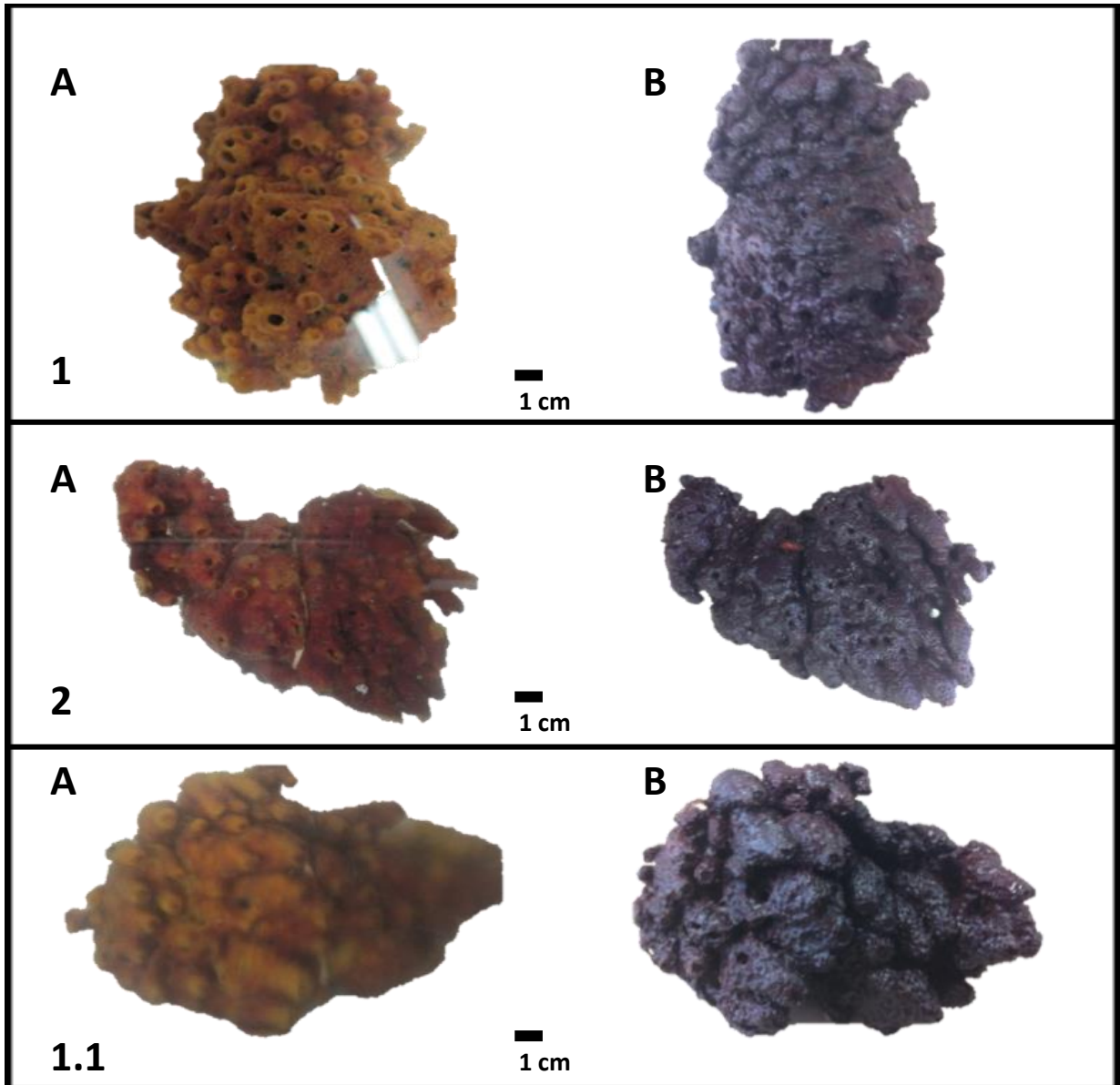


Figura 2. Morfología externa de individuos de *A. gerardogreeni* analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 1; Individuo 2 e Individuo 1.1.

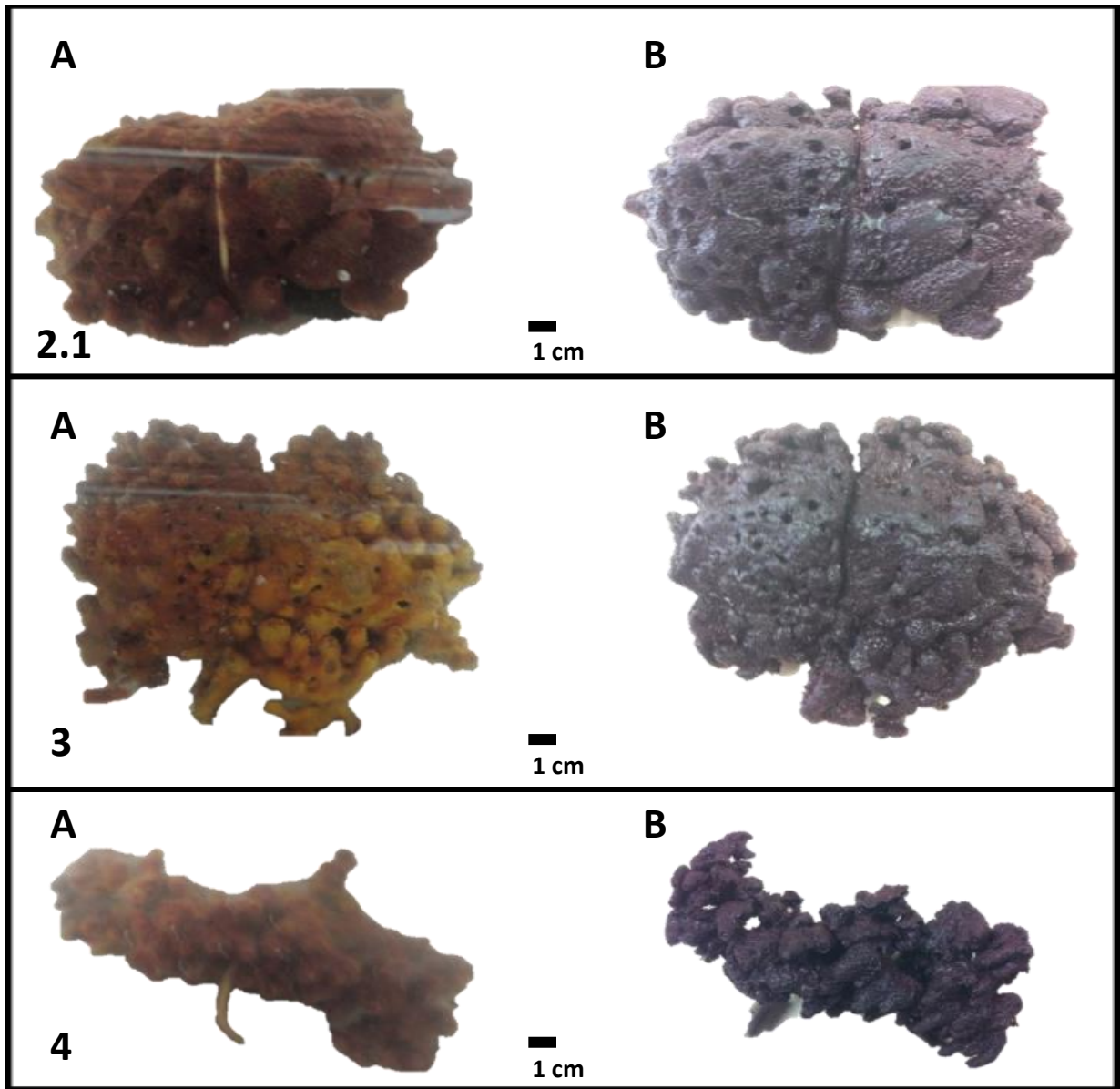


Figura 3. Morfología externa de individuos de *A. gerardogreeni* analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 2.1; Individuo 3 e Individuo 4. Continuación.

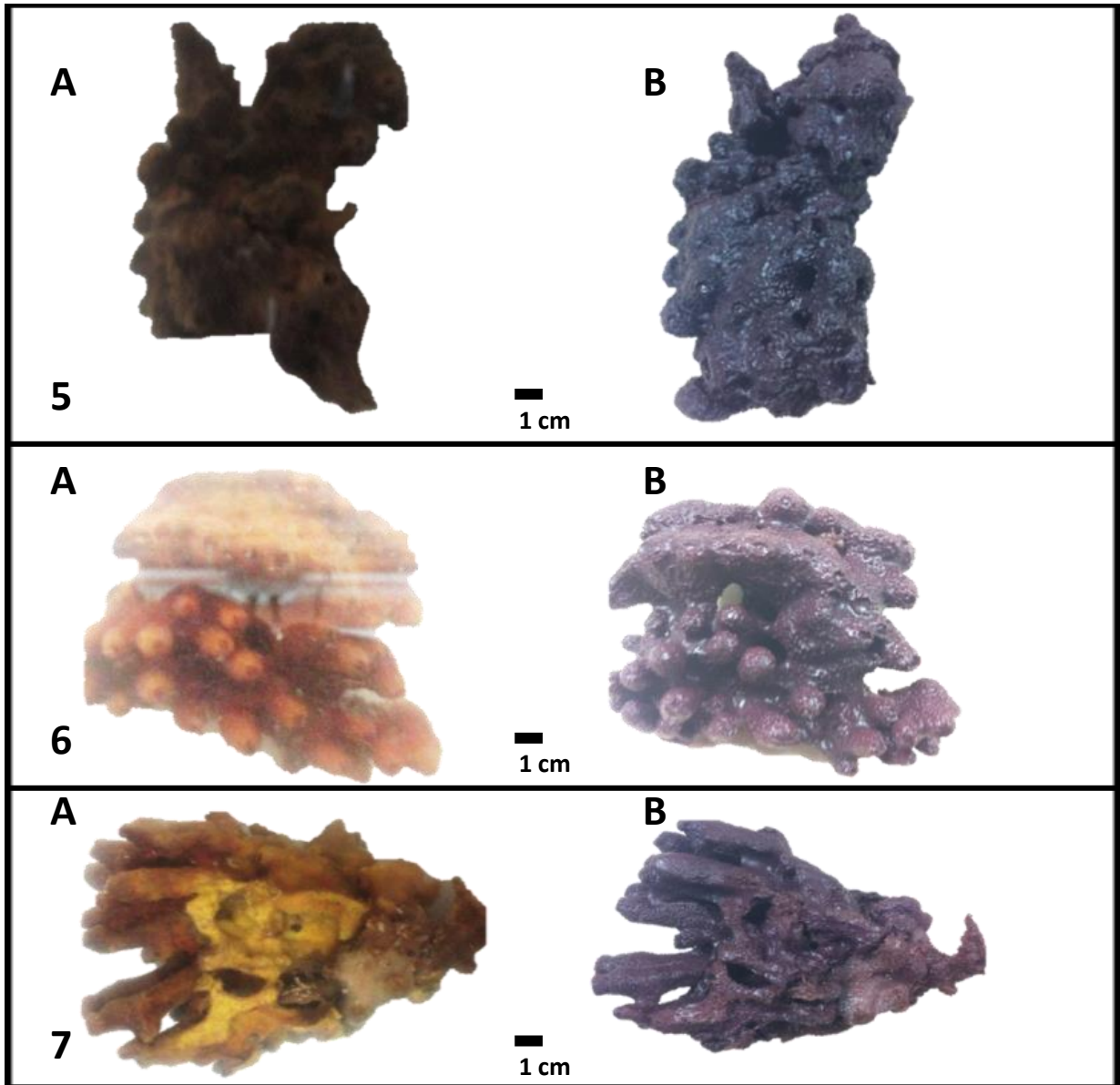


Figura 2. Morfología externa de individuos de *A. gerardogreeni* analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 5; Individuo 6 e Individuo 7. Continuación.

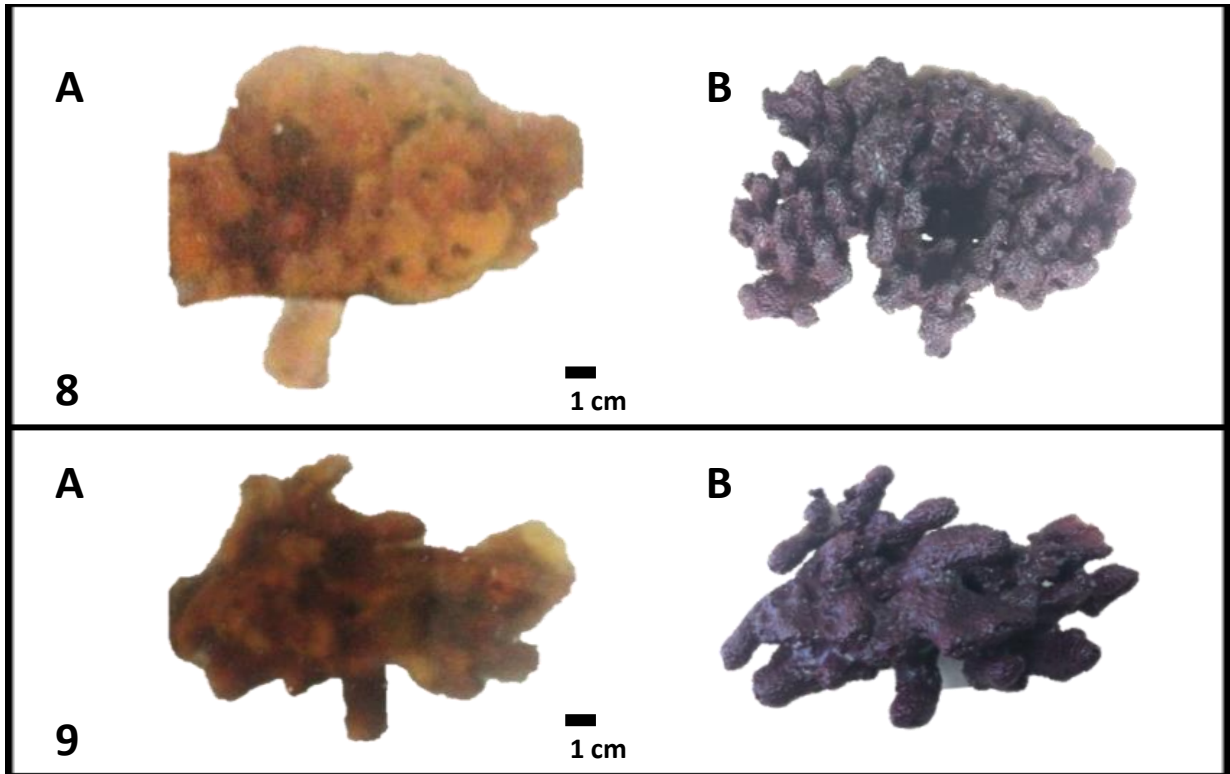


Figura 2. Morfología externa de individuos de *A. gerardogreeni* analizados (A: Vivos; B: Almacenado en etanol al 70%). Individuo 8 e Individuo 9. Continuación.

Tabla 4. Características de los individuos de la especie *A. gerardogreeni*. (L=Largo; A=Ancho; H= Alto; lineales = sentido recto; Discontinuos = aleatorios).

Individuo	L x A x H	Lobular/tubular	Lineales o discontinuos	Color
Aply-1	13.2x6.6x7.3	Mayormente tubulares	Discontinuos	Amarillo-Marrón
Aply-2	12.1x8.4x4.5	Mayormente tubulares	Discontinuos	Marrón-Amarillo
Aply-1.1	10x5.1x8.6	Mayormente tubulares	Discontinuos	Amarillo-Marrón
Aply-2.1	11.7x8.1x4.6	Mayormente lobulares	Mayormente lineales	Marrón
Aply-3	12.9x11.6x5.6	Mayormente tubulares	Lóbulos discontinuos Túbulos discontinuos	Marrón-Amarillo
Aply-4	11.9x4.6x5.8	Completamente Tubular	Lineales	Marrón-Amarillo
Aply-5	9.8x5.3x5.2	Mayormente lobulares	Discontinuos	Marrón
Aply-6	6.6x5x3.9	Lobular/Tubular	Lóbulos lineales-túbulos discontinuos	Marrón
Aply-7	7.1x5.4x9.1	Completamente Tubular	Discontinuos	Amarillo-Marrón
Aply-8	9.5x6.7x4.5	Mayormente Tubulares	Discontinuos	Amarillo-Marrón
Aply-9	8.2x5x4.5	Completamente Tubular	Discontinuos	Amarillo-Marrón

Tabla 5. Características de las fibras de esponjina de cada uno de los individuos recolectados en la Isla Pájaros Mazatlán, Sinaloa (datos en μm).

Individuo	Diámetro de la fibra	Diámetro de la médula	Porcentaje de médula sobre fibra	Luz de malla
Aply-1	27.17-(60.762)-83.98	19.76-(44.954)-69.16	73.6061	306.59-(764.497)-1621.96
Aply-2	64.22-(97.1945)-118.56	27.17-(50.5115)-74.1	52.0424	346.15-(605.7625)-1087.9
Aply-1.1	49.4-(62.3675)-79.04	22.23-(35.1975)-46.93	56.3377	534.06-(843.617)-1295.59
Aply-2.1	46.93-(81.8805)-123.5	29.64-(48.165)-81.51	58.5826	543.95-(777.8485)-1058.23
Aply-3	24.7-(50.0175)-71.63	17.29-(28.899)-41.99	58.1154	365.93-(679.9375)-1087.9
Aply-4	46.93-(80.6455)-116.09	22.23-(42.237)-59.28	52.4604	642.85-(839.1665)-1038.45
Aply-5	27.17-(62.738)-88.92	12.35-(41.6195)-61.75	65.8108	336.26-(796.6395)-1087.9
Aply-6	37.05-(55.6985)-81.51	12.35-(28.7755)-49.4	50.4248	227-(549.884)-1078.01
Aply-7	27.17-(54.9575)-86.45	19.76-(36.309)-69.16	65.5297	385.71-(742.2445)-1216.47
Aply-8	56.81-(71.63)-81.51	41.99-(50.882)-61.75	71.0955	385.71-(679.9375)-1107.68
Aply-9	46.93-(63.6025)-108.68	22.23-(28.5285)-34.58	46.1224	207.69-(546.4225)-949.44

8.2 Análisis del material genómico previo a la secuenciación masiva.

Con la finalidad de corroborar que el producto de la extracción de ADN correspondiente al material utilizado para la secuenciación masiva fuese de la esponja, se tomaron los productos de extracción de dos individuos (Aply-1 y Aply-2) y se amplificó la región COI (fragmento del ADN mitocondrial), utilizando los cebadores Aply-R y Aply-F. El producto de esta región, se comparó mediante la herramienta Blast-n en GenBank, la cual resultó con una máxima similitud con secuencias de *A. gerardogreeni* (100%).

Bioinformática

8.3 Análisis de las secuencias

Del resultado de la secuenciación masiva se obtuvieron un poco más de 6 millones de secuencias para la especie *A. gerardogreeni* secuenciados en la plataforma Illumina con el formato 2x100 (paired-end) (Tabla 5).

Tabla 6. Secuencias y nucleótidos totales obtenidos de la secuenciación masiva de *A. gerardogreeni* (4451-AG-Maz-02).

Muestra	Número de nucleótidos	Número de secuencias
4451-AG-Maz-02	769,238,114	6,128,000

De forma general, las secuencias resultaron de buena calidad con un valor Qpromedio = 37, un valor de contenido en G+C de entre 41-59%, poco contenido de bases ambiguas y menos de un 5% de secuencias sobrerrepresentadas (duplicadas). Durante el proceso de limpieza (trimming) de las secuencias se modificaron menos del 1% y se descartaron menos del 1% (Tabla 6).

Tabla 7. Secuencias modificadas, no modificadas y descartadas después del trimming.

Especie	Secuencias Modificadas	Secuencias no Modificadas	Secuencias Descartadas
<i>A. gerardogreeni</i>	0.08%	99.90%	0.01%

En el ensamblaje de *nov* realizado se obtuvieron 272,707 contigs para *A. gerardogreeni*. En el ensamblaje, el contig de mayor longitud fue de 4,296 pb y el de menor longitud fue de 24pb. Sin embargo, se obtuvo una longitud promedio de contigs alrededor de 150pb (Tabla 7). Se ensamblaron casi 75% de las secuencias, donde las secuencias pareadas ensambladas fueron claramente menores a las no pareadas (Tabla 8). En este sentido, una secuencia pareada se da en el proceso de ensamblaje, cuando dos secuencias se encuentran en el mismo fragmento de ADN (contig) que se secuenció mediante paired-end.

Tabla 8. Ensamblaje. Contigs totales generados a partir de reads con sus respectivos tamaños.

Nº de Contigs	272,707
Tamaño mínimo	24 pb
Tamaño máximo	4,296 pb
Tamaño promedio	150 pb

Tabla 9. Total de secuencias ensambladas pareadas y no pareadas.

74.67%	pareadas	19.76%
	no pareadas	80.23%

8.4 Anotación mitocondrial

Derivado de la secuenciación masiva se obtuvo el genoma parcial de *A. gerardogreeni*, mediante el mapeo de secuencias utilizando como base las secuencias existentes de los genomas mitocondriales de *A. fulva* y *A. cauliformis*. De este trabajo se obtuvo el 65-70% (13,320 pb) de las 19,620 pb reportadas en mito-genomas de *A. fulva* y *A. cauliformis*. La composición de bases nucleotídicas del genoma parcial son: 34.60% A, 31.87%T, 17.88%G y 15.63%C, con un contenido GC del 33.5%.

Generalmente, la secuencia del genoma mitocondrial completa incluye 14 genes que codifican a proteínas, 2 genes de RNA ribosomal y 25 genes de RNA de transferencia. En anexos se muestran los porcentajes cubiertos de cada uno de los loci mitocondriales mapeados a partir de las secuencias de *A. gerardogreeni* en *A. fulva* (Anexo 2, Tabla 13) y *A. cauliformis* (Anexo 2, Tabla 14).

En los resultados comparativos se recopilaron a partir de 19,980 pb, 117 sustituciones nucleotídicas para la relación *A. gerardogreeni* - *A. cauliformis* y 183 para la relación *A. gerardogreeni* - *A. fulva* (véanse las tablas 11 y 12 en anexo 1).

De acuerdo a los resultados, *A. gerardogreeni* comparte todos los genes y codones de inicio y final de ambos genomas. También, comparte secuencias de las diferencias encontradas en los genes *rnl rRNA* y *rns rRNA*, cuyo codón de inicio/final son AGG/TAA y ATT/TAT en *A. fulva* y, TAA/TAA y TTG/CTC en *A. cauliformis*.

Las lecturas mapeadas de *A. gerardogreeni* sugieren sustituciones nucleotídicas en regiones codificantes y no codificantes, por lo que resulta indispensable completar el mito-genoma para evaluar correctamente la predicción de los productos protéicos de los genes estructurales.

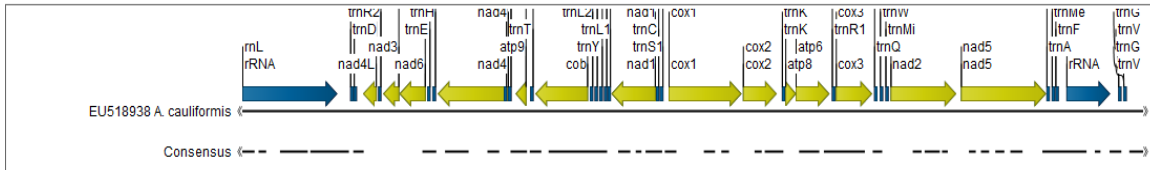


Figura 4. Genoma mitocondrial en su forma lineal de *A. gerardogreeni* (consensus) alineado respecto al de *A. cauliformis*. En este alineamiento se muestran secuencias de *A. gerardogreeni* (consensus) posicionadas en determinadas regiones del genoma mitocondrial de *A. cauliformis*.

Por otra parte, se encontraron algunas diferencias en el mapeo de secuencias de *A. gerardogreeni* versus *A. fulva* y *A. cauliformis* (Figuras 4 y 5).

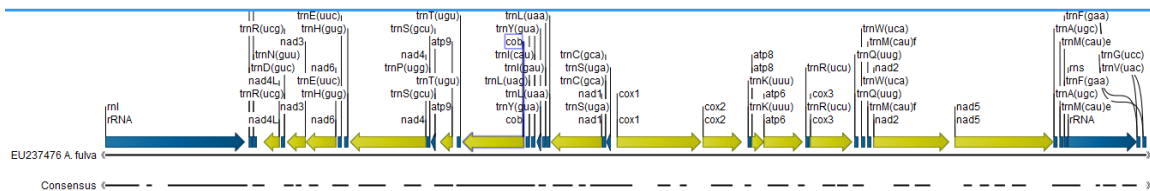


Figura 5. Genoma mitocondrial en su forma lineal de *A. gerardogreeni* (consensus) alineado respecto al de *A. fulva*. En este alineamiento se muestran secuencias de *A. gerardogreeni* (consensus) posicionadas en determinadas regiones del genoma mitocondrial de *A. fulva*, esto se debe a que durante el mapeo, los reads encontrados solo cubren estos sitios de la secuencia base (*A. fulva*).

8.5 Identificación y selección de loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.

La búsqueda de motivos repetitivos microsatelitales se realizó usando el programa Msatcommander (Faircloth, 2008) a partir del conjunto de Contigs obtenidos del ensamble *de novo* para la especie. Asimismo, se mejoró el diseño de algunos primers mediante el programa Primer-BLAST.

Derivado del análisis de las secuencias, se obtuvieron loci microsatelitales de los tres tipos deseados: di-, tri- y tetranucleótidos. Los loci tetranucleótidos fueron los más abundantes, seguidos de los dinucleótidos y los trinucleótidos. El porcentaje de loci identificados a los que se les pudo diseñar cebadores fue menor al 25% en todos los casos. En la Figura 6, representados en barra azul, se muestra un aproximado del total de los loci microsatelitales encontrados por Msatcommander

para cada tipo, y los representados en barra roja, muestran los loci para los que se lograron diseñar cebadores.

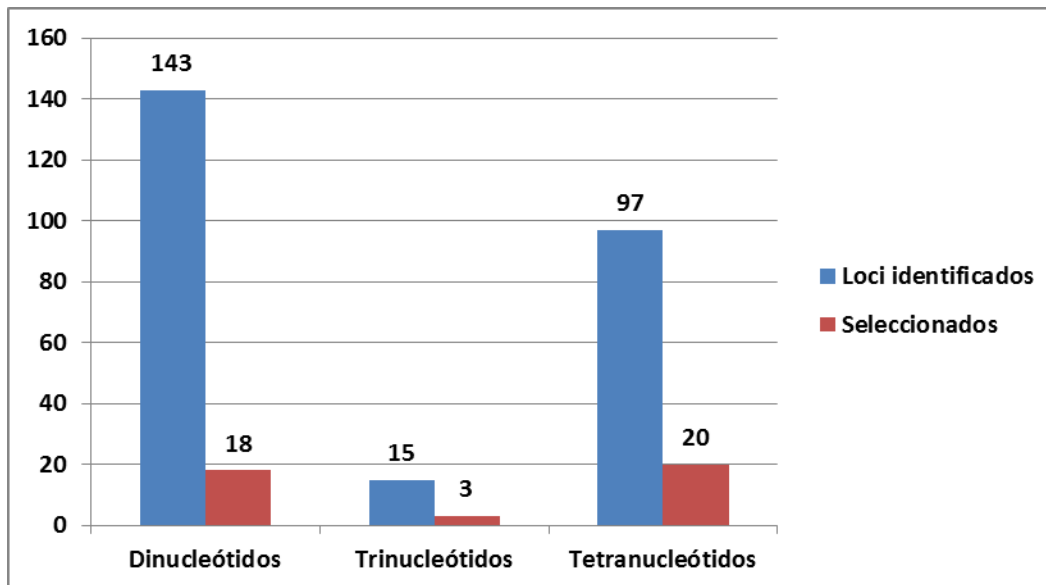


Figura 6. Número de loci microsatelitales identificados por Msatcommander y seleccionados para la fase experimental.

Los 41 loci seleccionados como candidatos a marcadores moleculares para *Aplysina gerardogreeni* fueron 18 di-, 3 tri- y 20 tetranucleotidos.

8.6 Optimización de las condiciones de amplificación de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares.

En la primera fase de optimización se buscó adecuar las condiciones químicas para las reacciones de PCR y las condiciones térmicas con lapsos de tiempo ideales para la obtención de los fragmentos de interés.

Inicialmente se probó con dos gradientes de temperatura, uno para un locus cuyos cebadores requerían temperaturas bajas de anillamiento (53-58 °C) y otro para otro locus que requerían temperaturas altas (59-65 °C). De acuerdo a los resultados, la temperatura óptima de alineamiento para ambos casos fue de 59° C. Esta temperatura y las condiciones químicas probadas, fueron utilizadas para la amplificación del resto de los loci microsatelitales. Los resultados fueron revelados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las mismas condiciones se probaron en los 10 individuos, con la finalidad de confirmar la optimización e identificar los tamaños aproximados de los productos correspondientes a cada microsatélite.

En la primera fase se descartaron 16 loci de los 41 candidatos. Los loci se descartaron debido varios motivos: bandas inespecíficas, amplificación negativa, polimorfismo dudoso (*véase Tabla 16 y 17 en anexo 2*).

En la segunda fase, se buscó amplificar los fragmentos para los 25 loci que pasaron la primera prueba, adicionando la extensión M13, de acuerdo a lo propuesto por Schuelke (2000). Después de los primeros 30 ciclos, se llevó a cabo el perfil de termociclado de Arruda *et al.* (2010), dicho perfil consiste en pausar los ciclos y agregar la cola M13 con el fluorocromo para los últimos 10 ciclos de la PCR. De esta manera, se aseguró la incorporación del fluorocromo marcado en los productos previamente amplificados por los primers R y F-M13. De los 25 loci, se descartaron 5 debido a amplificaciones inespecíficas al añadir la cola M13 con el fluorocromo.

8.7 Caracterización genética

Se evaluó el polimorfismo de los 20 loci en 10 individuos de *A.gerardogreeni* (Tabla 10). De éstos, sólo 13 se consideraron polimórficos de acuerdo al valor PIC (Contenido de Información Polimórfica, en español). En los 13 loci de *A.gerardogreeni* encontramos de 1 a 5 alelos (media de 3 alelos/locus). El locus 37595 presentó mayor valor de heterocigosidad observada ($H_o = 0.556$) y los locus 82588 y 194964 los de menor valor ($H_o = 0.00$). Los loci 44589 y 145552 no se encuentran en equilibrio debido a un déficit de heterocigotos. El análisis de disequilibrio en el ligamiento indicó ligamiento entre los loci 194964 y 82588, así como entre 194964 y 37595, entre 194964 y 180680, entre 37595 y 180650, y entre 734 y 24882. Los valores PIC van de 0 a 0.589 (Tabla 10).

Tabla 10. Características de los 20 loci microsatelitales desarrollados para *A. gerardogreeni* (n=10). También se muestran en negritas los 13 loci considerados polimórficos.

Locus	Motivo	Na	Rango (pb)	Ho	HE	PHWE	PIC
89450	(TC)8	2	126-130	0.0	0.159	0.0436	0.141
57397	(TG)9	4	128-148	0.455	0.610	1.0000	0.533
37595	(AG)10	5	130-134	0.556	0.667	0.5150	0.589
6292	(AC)10	1	121	0.0	0.0	N.A	0.000
15843	(AC)11	4	108-114	0.500	0.605	0.3096	0.523
8089	(ACC)6	4	112-122	0.400	0.537	0.1088	0.452
119133	(ACTC)4	1	132	0.0	0.0	N.A	0.000
180680	(ACAT)4	4	126-134	0.143	0.582	0.1118	0.502
57158	(ACGC)4	4	117-126	0.083	0.569	0.003*	0.466
145552	(ACGC)4	5	119-140	0.083	0.612	0.003*	0.536
44589	(ACGT)4	4	126-146	0.400	0.663	0.000*	0.586
734	(TGTA)4	2	122-140	0.273	0.247	1.0000	0.208
24882	(ACAT)4	2	155-175	0.250	0.228	1.0000	0.195
123455	(TGTA)4	4	132-136	0.083	0.424	0.0521	0.371
194964	(ACAT)4	2	123-127	0.0	0.233	0.0674	0.178
191152	(ACAT)4	4	102-122	0.273	0.333	0.1606	0.302
30904	(GTAT)5	1	125	0.0	0.0	N.A	0.000
182674	(ACGT)5	1	126	0.0	0.0	N.A	0.000
82588	(ACAT)5	2	165-169	0.0	0.173	0.0529	0.152
31049	(ACAG)7	3	179-182	0.200	0.279	0.1529	0.247

n: Tamaño de muestra; Na: nº de alelos; HO: Heterocigosidad observada; HE: Heterocigosidad esperada; PHWE: P valor de la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg, con asterisco los resultados significativos tras el ajuste de Bonferroni (p-valor < 0.005); PIC: contenido de información polimórfica; N.A.: no aplica.

9. Discusiones

Las esponjas del género *Aplysina* han mostrado poseer un importante valor biotecnológico en el campo de la farmacología y bioingeniería de tejidos. A pesar de su importancia, el grupo ha presentado problemas taxonómicos para su correcta clasificación debido a su amplia plasticidad, lo que ha dificultado el establecimiento de los límites entre sus especies. Consecuentemente, el conocimiento que se tiene del grupo, sobre la dinámica poblacional es nulo, y probablemente ignoremos aspectos importantes a nivel ecológico-biológico. Desde el punto de vista biotecnológico y bioquímico, la carencia de esta información limita el conocimiento para determinar qué especies pueden presentar mejores ventajas sobre otras o qué especies en sí, tienen cierta ventaja.

9.1 Morfología de *A. gerardogreeni*

Actualmente las esponjas del género *Aplysina* son diferenciadas con base en la taxonomía clásica, que a su vez está basada en la morfología (Pinheiro, Hajdú y Custódio. 2007). Esto, a pesar del reciente uso de marcadores moleculares, ha mostrado la existencia de cierta plasticidad fenotípica entre los individuos de una misma especie (*A. lacunosa*, *A. cavernícola* y *A. aerophoba*) (Schmitt, *et al.* 2005; Heim, Nickel & Brümmer, 2007). En el caso de este estudio, los ejemplares presentaron un morfología estable y típica de *A. gerardogreeni*, además, los tamaños de fibra y luz de malla fueron relativamente congruentes con la especie, a excepción del diámetro de la fibra (24 μm , el mínimo), cuya medida está por debajo de la reportada por Gómez & Bakus (1992), que puede atribuirse a la plasticidad fenotípica de la especie. Adicionalmente, los marcadores moleculares implementados fueron acordes con esta especie, ya que el Blast-n en Genbank, mostró una similitud del 100% con respecto a la especie de estudio.

9.2 Secuenciación masiva

La búsqueda de marcadores tipo microsatelital en esponjas surgió a partir de la construcción de bibliotecas genómicas enriquecidas con GA y CA. Mediante esta metodología, se logró amplificar y desarrollar eficazmente un promedio de 9 microsatélites por librería de la gran mayoría de las esponjas marinas hasta ahora

reportadas (Knowlton, *et al.* 2003; Duran, *et al.* 2004; Blanquer, *et al.* 2005; Hoshino y Fujita, 2006; Noyer, *et al.* 2009; Dailianis, *et al.* 2010.; Guardiola, *et al.* 2011 y Padua, *et al.* 2013). Aunque solamente el 27.7% (3 especies, *Ircinia fasciculata*, *Hemimycale columella* y *Petrosia ficiformis*) de la información generada de este tipo, se ha aplicado a estudios poblacionales o evolutivos. En el presente trabajo, se han generado nuevos marcadores mediante el uso de las nuevas tecnologías de secuenciación, cuyos resultados son efectivos y comparables a los resultados de publicaciones que optaron por la vía de secuenciación masiva (Ej.: Riesgo, *et al.* 2013; Taboada, *et al.* 2015; González, *et al.* 2015 y Taboada, *et al.* 2017).

Recientemente, con el auge de las tecnologías de secuenciación de siguiente generación, se han desarrollado plataformas de secuenciación más eficientes. Inicialmente se comercializó la plataforma 454 Roche, la cual funciona mediante reacciones de pirosecuenciación, de manera que se llevan a cabo reacciones de polimerización y cada vez que se incorpora un nucleótido la liberación del pirofosfato se manifiesta mediante luz, la cual es captada y traducida por un ordenador dando lugar a la secuencia de ADN (Margulies, *et al.* 2005). Mediante esta plataforma se secuenciaron masivamente las esponjas: *Ircinia fasciculata*, *Hemimycale columella* y *Petrosia ficiformis*, permitiendo el desarrollo de 14, 15 y 10 microsatélites polimórficos, respectivamente (Riesgo, *et al.* 2013; González, *et al.* 2015 y Taboada, *et al.* 2015) y recientemente, Taboada y colaboradores (2017), obtuvieron 14 loci microsatelitales a partir de secuenciación masiva mediante la plataforma Illumina con la metodología 2 × 300 bp paired-end. En comparación a nuestros resultados y metodología, logramos obtener hasta 13 microsatélites polimórficos, con la posibilidad de aumentar este número si se optimiza el resto de los loci candidatos a marcadores microsatelitales.

La elección de la plataforma para realizar la secuenciación masiva es un punto muy importante para los objetivos de la investigación, ya que no todas las plataformas arrojan los mismos resultados. La plataforma 454 de Roche, parecería la indicada, ya que, en efecto, existe una mayor probabilidad de encontrar una región flanqueadora para la síntesis de los cebadores puesto que ofrece

secuencias de mayor longitud en comparación al resto de las plataformas (300-700pb), (Parchman, *et al.* 2010; An & Lee, 2012; Castoe, *et al.* 2012 y González, *et al.* 2015.). Sin embargo, tiene un costo mayor si se compara con otras plataformas de secuenciación y además se encuentra descontinuada. En cuanto a resultados y costos, se ha comparado con 454 y se ha observado que se obtienen resultados similares, pero con diferencia de coste a favor de Illumina. Tal es el caso de Nunziata *et al.* (2012) y O'Bryhim, *et al.* (2012), entre otros, que usaron la opción paired-end de la plataforma Illumina y obtuvieron 42 y 16 marcadores microsatélites polimórficos para sus especies de estudio, respectivamente y la más reciente en esponjas, Taboada y colaboradores (2017), con 14 marcadores microsatelitales. La eficacia de la plataforma Illumina para la búsqueda de loci microsatelitales es similar a 454, ya que Castoe *et al.* (2012), compararon ambas plataformas obteniendo el mismo número de secuencias y un número similar de megabases en una especie de serpiente, *Python molurus bivittatus*. La validez de la plataforma Illumina ya ha sido probada, Lence *et al.* (2013), desarrollaron un estudio donde se buscó obtener marcadores microsatelitales en 32 especies de diferentes taxones, donde además de presentar la cantidad de los loci microsatelitales potencialmente amplificables, probaron la eficacia de los mismos en 13 de estas especies. Los resultados de las amplificaciones fueron variables entre taxones, pero su efectividad iba desde 49% a un 67%, aunque presentaron valores que podrían ser más altos si se empleara más esfuerzo en la optimización de la amplificación de los loci microsatelitales. Aunque existen otras plataformas que podrían ser más efectivas que Illumina y 454, por ejemplo, Ion Torrent (PMG), hasta el momento, la plataforma Illumina es la de mayor rendimiento, abarca el 70% del mercado de las plataformas de NGS y tiene una tasa menor de error en la secuenciación (Bahassi & Stambrook, 2014; Taboada *et al.* 2017). Por esta razón en el presente proyecto se optó por el uso de esta plataforma con la metodología de paired-end, la cual nos permitió generar poco más de 6 millones de secuencias para la especie *A. gerardogreeni*.

9.3 Análisis de las secuencias.

Al llevar a cabo el proceso de ensamblaje se observa que cerca del 25% de las secuencias no son ensambladas, por lo que en este proceso se pierde una parte de la información. En otros estudios se estimó que quedaron sin ensamblar cantidades mayores de secuencias, como un 40% (Parchman *et al.* 2010); y hasta 74% (An y Lee. 2012). Aunque en esponjas no se tiene registro de esta situación, se puede considerar un porcentaje muy cercano debido al bajo número de cebadores diseñados para la amplificación de los marcadores microsatelitales (Ej.: Riesgo, *et al.* 2013; Taboada, *et al.* 2015; González, *et al.* 2015 y Taboada, *et al.* 2017).

9.4 Genoma mitocondrial

Hasta ahora han sido publicadas las secuencias de 33 genomas mitocondriales, de los cuales dos pertenecen a esponjas de género *Aplysina*, *A. fulva* y *A. cauliformis*. Los mito-genomas de estas dos últimas especies son muy similares, con solo 6 SNP's encontrados (11 por confirmar) (Sperling, *et al.* 2010). En cambio, al comparar ambos mitogenomas con el de *A. gerardogreeni*, se encontró un mayor número de sitios polimórficos, 117 variaciones nucleotídicas en la comparación *A. fulva* - *A. gerardogreeni* y 183 variaciones nucleotídicas en la comparación *A. cauliformis* – *A. gerardogreeni*.

A partir de la comparación de los mito-genomas *A. fulva* y *A. cauliformis*, Sperling, *et al.* (2010), representaron en una tabla las únicas sustituciones o variaciones nucleotídicas encontradas (Sperling, *et al.* 2010), a la cual, para este estudio anexamos las variaciones nucleotídicas encontradas en las secuencias mapeadas de *A. gerardogreeni* (tabla 15).

Tabla 15. Resumen de la variación nucleotídica entre las especies *Aplysina cauliformis*, *A. fulva* y *A. gerardogreeni*.

Posición	Locus	Posición del nucleótido <i>cauliformis/fulva(referencia)/gerardogreeni</i>	Silente/substitución
Confirmada			
12147	<i>trnK</i>	A (11789) / G (12147) / G (12149)	N.A.
13996	<i>cox3</i>	T (13638) / A (13996) / A (13996)	Silenciosa
14932	<i>nad2</i>	A (14574) / T (14932) / T (14934)	L/I
14941	<i>nad2</i>	C (14583) / T (14941) / T (14943)	F/L
16133	<i>nad5</i>	C (15775) / T (16133) / N (16135)	Silenciosa
17432	<i>nad5</i>	C (A*) (17074) / A (C*) (17432) / N (17434) *LAS BASES CORRESPONDIENTES	Silenciosa
Bases no resueltas "N" de fulva			
2221	<i>rnL</i>	G (1863) / N (2221) / C (2223)	N.A.
11979	<i>cox2</i>	T (11621) / N (11979) / T (11981)	N.I.
13208	<i>trnR</i>	T (12850) / N (13208) / T (13210)	N.A.
13317	<i>cox3</i>	T (12959) / N (13317) / T (13319)	N.I.
13450	<i>cox3</i>	A (13092) / N (13450) / A (13452)	N.I.
14054	<i>cox3</i>	T (13696) / N (14054) / N (14056)	N.I.
15860	<i>nad2</i>	T (15502) / N (15860) / N (15862)	N.I.
18046	<i>trnMe</i>	T (17688) / N (18046) / T (18048)	N.A.
18608	<i>mS</i>	A (18250) / N (18608) / A (18610)	N.A.
Conflicto/Dudas			
9537	<i>IG</i>	A o G (9179) / A (9537) / A (9539)	N.I.
11443	<i>cox2</i>	A o G (11085) / A (11443) / A (11445)	K/E

N.A., no aplica; N.I., no identificable

Entre los genomas de *Aplysina* existen ligeras variaciones en cuanto a las posiciones numéricas de las bases comparadas y publicadas por Sperling, *et al.* (2000) (tabla 15), por lo que al momento de hacer el contraste con las secuencias del mitogenoma parcial de *A. gerardogreeni*, se ubicaron las posiciones de

acuerdo con el sentido de la secuencia. Nótese los asteriscos (*) con las bases correspondientes y la ubicación entre paréntesis del sentido de la secuencia, con la base encontrada marcada en color rojo. Además, siguiendo el sentido dado por Sperling, *et al.* (2000), se encontró un error en la tabla publicada para la posición 17432 en el gen *nad5*, donde la base correspondiente se encuentra entre paréntesis y con un asterisco.

Por otra parte, se logró observar que existen ciertas regiones que no mutan en *A. gerardogreeni* (en algunos sitios) con respecto a *A. cauliformis* y *A. fulva*. Sin embargo, existen otras sustituciones que no se observan en esta tabla (véase tabla 12 y tabla 11), por lo que es necesario considerar estas últimas sustituciones que podrían generar un cambio a nivel aminoácido y por ende a nivel protéico, lo que posiblemente generará un producto diferente en comparación a las dos especies de *A. fulva* y *A. cauliformis* como los estimados por Sperling, *et al.* 2010.

De manera general, se encontró mayor diferenciación nucleotídica en el gen que codifica al ARN ribosomal 16S (rnl rRNA) con 41 sustituciones, seguida del gen que codifica al ARN ribosomal 12S (rns rRNA) con 36 sustituciones y del gen que codifica la región citocromo c oxidasa subunidad 1 (cox1) con 27 sustituciones, en la comparación *A. gerardogreeni* - *A. fulva*. Por otra parte, se encontró mayor diferenciación nucleotídica en el gen que codifica al ARN ribosomal 12S (rns rRNA) con 43 sustituciones, seguida del gen que codifica al apocitocromo b (cob) con 18 sustituciones y del gen que codifica a la subunidad 2 NADH deshidrogenasa (nad2) con 13 sustituciones, en la comparación *A. gerardogreeni* – *A. cauliformis*. En ambas comparaciones el mínimo de profundidad de secuencias obtenidas fue 3X con un promedio de 9X.

9.5 Selección de los loci microsatelitales candidatos a marcadores moleculares

En el proceso de selección se requiere de un mayor esfuerzo para obtener un mayor número de candidatos a marcadores moleculares de calidad, por lo que el

tiempo es factor para este tipo de trabajos. En el presente estudio se logró obtener loci de tres categorías, di-, tri- y tetranucleótidos. Aunque al inicio se obtuvo un gran número de loci microsatelitales (véase la figura 6), sólo se consiguió desarrollar cebadores para menos del 25% de ellos. Sin embargo, esta fracción es considerada realmente útil como marcadores moleculares o PAL “potentially amplifiable loci” (Castoe, *et al.* 2010). Además, es una cantidad de microsatelites comparable con los publicados en esponjas (véase tabla 2). A pesar de considerar sólo una fracción para el que se desarrollaron cebadores, en otros estudios similares, también se registraron diferencias numéricas entre los loci identificados y los loci con cebadores diseñados (Riesgo, *et al.* 2013; Taboada, *et al.* 2015; González, *et al.* 2015 y Taboada, *et al.* 2017).

9.6 Optimización de las condiciones de PCR de los loci microsatelitales candidatos y la evaluación de su nivel de polimorfismo.

A partir de los más de 1400 loci identificados se lograron diseñar primers mediante Msatcommander para más de 200 loci, de los cuales 40 loci que se probaron experimentalmente, 20 mostraron una amplificación confiable y 13 mostraron cierto grado de polimorfismo en 10 individuos probados. De acuerdo a lo anterior, el rendimiento significativo fue de un 32.5% para la especie usando la plataforma Illumina mediante la metodología de paired-end (véase Figura 7). En uno de los más recientes estudios (Taboada, *et al.* 2017), también con el uso de la plataforma Illumina mediante esta metodología, obtuvieron 14 microsatelites de 20 loci candidatos para la esponja de profundidad *Plenaster craigi*, logrando un rendimiento del 70%. Anteriormente, Taboada y colaboradores en 2015, desarrollaron 10 microsatélites para *Petrosia ficiformis*, de 30 loci que se aprobaron experimentalmente, logrando un rendimiento del 33% empleando la plataforma 454 de Roche. De la misma manera Riesgo *et al.* (2013), desarrollaron para *Ircinia fasciculata*, 14 microsatelites de 36 aprobados experimentalmente, logrando un rendimiento el 38% mediante la plataforma 454 de Roche. Guardiola, *et al.* (2011), desarrollaron para *Paraleucilla magna*, 9 microsatélites de 46 aprobados experimentalmente, logrando un rendimiento de 19% a partir de

librerías genómicas enriquecidas para repeticiones AC₁₅, AG₁₅, CAA₁₀ y GATA₇. Dailianis *et al.* (2010), desarrollaron para *Spongia officialis*, 10 microsatélites de 41 aprobados experimentalmente, logrando un rendimiento de 24% mediante librerías genómicas enriquecidas para repeticiones AC. Es importante mencionar que en el presente estudio se dio prioridad a aquellos loci cuya amplificación fue clara y rápida, a una temperatura considerada como “óptima”, por lo que aún no se descarta la posibilidad de incrementar el número de marcadores microsatelitales.

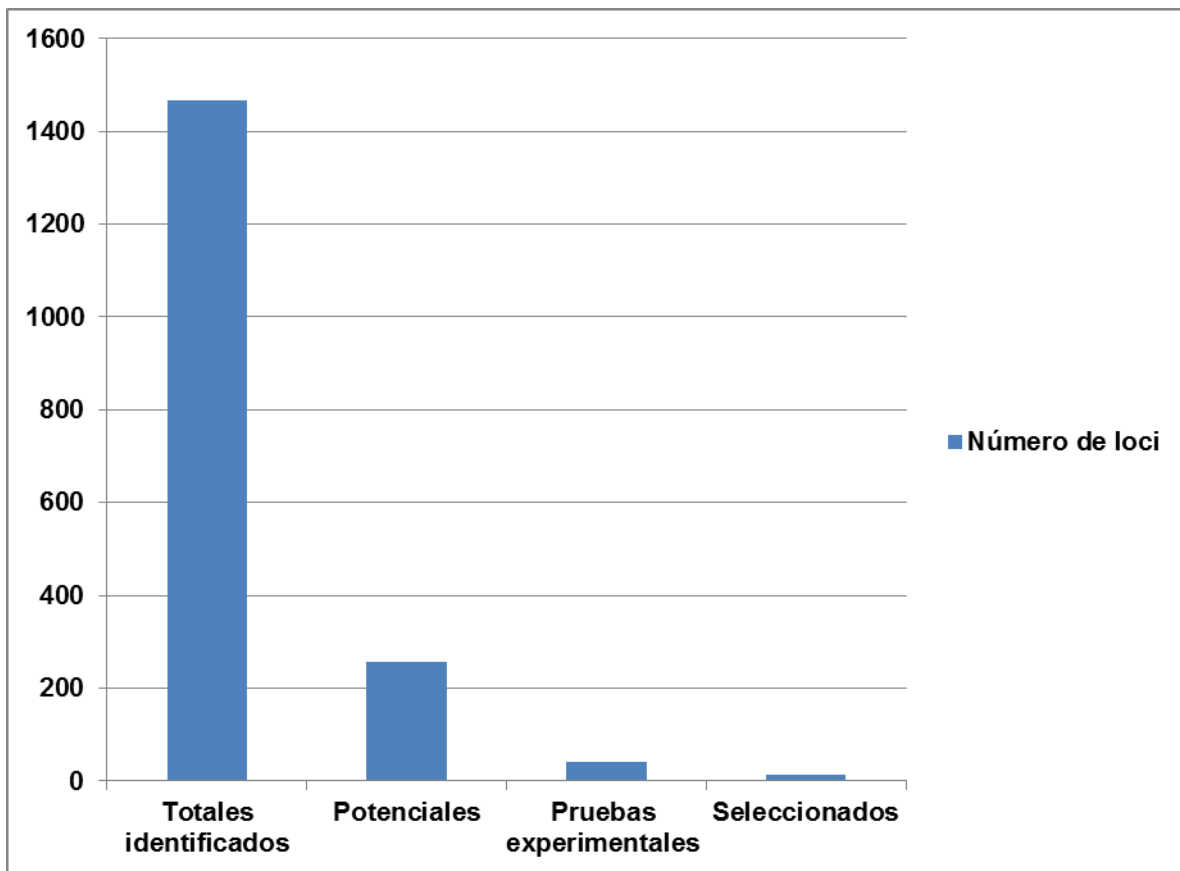


Figura 7. Comparación entre el número de loci totales identificados (Msatcommander), loci potenciales con regiones alternas útiles para diseño de primers, loci experimentales (sujetos a optimización de PCR) y loci seleccionados.

Como se ve en la mayoría de los estudios, una parte de los loci se descartan por problemas de amplificación, por lo que es importante considerar esto al momento de iniciar una investigación. Además, ciertos grupos taxonómicos, entre los que se incluyen las esponjas marinas, son más propensos a problemas de amplificación,

específicamente en esponjas se debe a la gran carga microbiana que tienen adherida a sus cuerpos, de hecho, se sabe que existe una gran densidad microbiana en especies del género *Aplysina* (género de la especie de estudio), *A. fulva* y *A. cauliformis*, por lo que también esta peculiaridad, lo vuelve un tanto complejo (Freeman, *et al.* 2012; Erwin y Thacker, 2008). Aunque en el presente proyecto, se empleó una metodología que involucra centrifugaciones diferenciales para disminuir la carga microbiana de la esponja y así, obtener una mayor concentración de ADN de la esponja (Freeman, *et al.* 2012).

Existen varias complicaciones que pueden impedir la correcta amplificación. Para empezar algunos loci con primers diseñados aparentemente apropiados no amplifican o lo hacen pobremente (Squirrell, *et al.*, 2003). Otra complicación es la presencia de bandas que no corresponden al tamaño esperado, lo que impide la correcta interpretación de los alelos del locus en cuestión (Noyer, *et al.*, 2009). Esto puede ocurrir debido a que los cebadores se anillan en sitios alternos en el genoma, además del sitio para el que fueron diseñados, lo que se conoce como “Mispriming” (McInerney, *et al.*, 2011). Situación que ocurrió en varios de los loci identificados (Ej.: 77000, 24177, 156548, etc.), motivo por el cual fueron descartados en la primera fase.

En este trabajo 21 loci de la especie no pasaron a la 2ª fase experimental por diferentes razones: nunca se obtuvo un producto amplificado o la amplificación fue muy pobre como para considerarse convincente, en otros casos la amplificación fue inespecífica y por último (del resto), varios loci no fueron seleccionados porque no se detectó polimorfismo. De hecho, en el conjunto final de microsatélites genotipados predominan los del tipo tetranucleótido y los dinucleótidos están en menor cantidad.

En la segunda fase experimental se vio reducida la obtención de las amplificaciones de los individuos de cada locus, debido al cambio de perfil de termociclado (ciclos y temperaturas) y a la técnica de PCR para la incorporación del fluoróforo, por lo que varios de los loci no se lograron amplificar efectivamente para genotipificar. Al parecer la adición de la cola M13 tiene un efecto en la

eficiencia del PCR (Knowlton, *et al.* 2003; Blanquer, *et al.* 2005; Noyer, *et al.* 2009; Dailianis, *et al.* 2010; Guardiola, *et al.* 2011; Guichoux *et al.* 2011; Padua, *et al.* 2013; Riesgo, *et al.* 2013 y Taboada, *et al.* 2015), por esta razón, se usan perfiles de termociclado con un mayor número de ciclos (Schuelke, 2000; de Arruda, *et al.* 2010).

Otro filtro ocurrió en el análisis de los genotipos, ya que se detectaron varios fallos, por ejemplo: loci que no incorporaron el fluoróforo, otros con bandas inespecíficas, así como patrones tri o tetra alélicos en un mismo organismo, lo cual resultaría ser algo imposible debido a que la especie es diploide. Estos últimos podrían deberse, al 'mispriming' de los cebadores, pero también posiblemente la causa es la asociación de estos microsatelites a elementos móviles del genoma como transposones que generarán la duplicación de regiones (Fernández-Silva, *et al.* 2013). En este punto, si los cebadores han sido diseñados en regiones duplicadas por el genoma se amplificarán al mismo tiempo varios loci generando patrones multialélicos. Este efecto ya ha sido reportado en otros taxones, incluyendo invertebrados marinos (McInerney, *et al.* 2011).

9.7 Niveles de polimorfismo.

Por otra parte, es importante considerar que la comparación entre los loci genotipados con éxito se hizo en 10 organismos, por lo que posiblemente se esté subestimando el grado de polimorfismo de alguno de los loci. Aun así, en cuanto al número de alelos encontramos el valor más bajo fue 1 y el más alto 5. Los resultados en otras especies son muy variables. Para la especie *Halicondria panicea* se registraron de 5 a 6 alelos (Knowlton, *et al.* 2003), para *Crambe crambe* de 2 a 15 alelos (Duran *et al.* 2004), para *Scopalina lophyropoda* de 3 a 6 alelos (Blanquer, *et al.* 2005), para *Hymeniacidon sinapium* de 2 a 10 alelos (Hoshino y Fujita, 2006), para *Spongia agaricina* de 1 a 7 alelos (Noyer, *et al.* 2009), para *Spongia officinalis* de 7 a 14 alelos (Dailianis, *et al.* 2010), para *Paraleucilla magna* de 2 a 9 alelos (Guardiola, *et al.* 2011), para *Clathrina aurea* de 5 a 18 alelos (Padua, *et al.* 2013), para *Ircinia fasciculata* de 3 a 11 alelos (Riesgo, *et al.* 2014), para *Hemimycale columella* de 2 a 9 alelos (González, *et al.* 2015), para *Petrosia ficiformis* de 4 a 12 alelos (Taboada, *et al.* 2015) y finalmente

con el mayor contenido de alelos por locus hasta ahora registrado, la especie *Plenaster craigi* de 3 a 30 alelos (Taboada, *et al.* 2017). Aunque en el presente estudio, el número de alelos es bajo, dicho número podría incrementarse al aumentar el número de organismos analizados.

Para determinar la calidad de un marcador genético se toma en cuenta su heterocigosidad y su valor PIC (Polimorphic Information Content - Contenido de Información Polimórfica, en español) (Shete, *et al.* 2000). Una diferencia significativa entre la heterocigosidad observada y la esperada para un marcador molecular nos indica un déficit de organismos heterocigotos. El déficit de organismos heterocigotos en estudios de genética poblacional puede deberse a fenómenos como la endogamia, cuello de botella o efecto Wahlund (Duran, *et al.* 2004; Selkoe y Toonen, 2006). Sin embargo, también es posible que la causa provenga de caracteres del mismo marcador. Existen varias causas que conllevan al déficit de heterocigotos, como puede ser la presencia de alelos nulos, deserción del alelo mayor o la homoplasia (González, *et al.* 2015). En el presente estudio, los valores de heterocigosidad observada presentan un amplio rango (0.00-0.556) y sólo en dos de los loci, los valores de heterocigosidad observada son mayores a los valores de heterocigosidad esperada calculados. En los loci en que esta diferencia fue significativa, los loci se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, aunque un locus no se ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg esto no es motivo suficiente para desecharlo (Selkoe y Toonen, 2006). En estudios previos donde se aislaron loci microsatelitales en esponjas, se obtuvieron también marcadores en desequilibrio de Hardy-Weinberg (Knowlton, *et al.* 2003; Duran, *et al.* 2004; Blanquer, *et al.* 2005; Hoshino y Fujita, 2006; Noyer, *et al.* 2009; Dailianis, *et al.* 2010; Guardiola, *et al.* 2011; Padua, *et al.* 2013; Riesgo, *et al.* 2014, Taboada, *et al.* 2015 y Taboada, *et al.* 2017), e inclusive algunos en su mayoría (casi el 90%), los valores de heterocigosidad observada eran superiores a la esperada (Blanquer, *et al.* 2005; Guardiola, *et al.* 2011), y otros incluían loci microsatelitales donde la heterocigosidad observada se igualaba a la heterocigosidad esperada a cero (Noyer, *et al.* 2009). De manera general, en esponjas marinas se observa un déficit de heterocigotos, debido a la endogamia,

cuello de botella o efecto Wahlund (efecto observado en la esponja marina *Crambe crambe*), dada la baja capacidad de dispersión de las larvas (Duran, *et al.* 2004; Dailianis, *et al.* 2010; Riesgo, *et al.* 2013 y Taboada, *et al.* 2017). Cabe mencionar, que un efecto de las especies con altas tasas de endogamia, bajos tamaños de población y cuellos de botella frecuentes o severos suelen tener un polimorfismo y una heterocigosidad de media a baja y, en promedio, unos loci microsatelitales más cortos (DeWoody & Avise, 2000 y Neff & Gross, 2001). Por esta razón, también consideramos que los loci microsatelitales desarrollados en este proyecto podrían ayudar a comprender la ecología de las poblaciones de *Aplysina gerardogreeni*.

De acuerdo a la literatura, el valor de PIC depende tanto del número de alelos, así como de la frecuencia de los mismos en la población (Botstein, *et al.* 1980). Los valores de PIC obtenidos de los 13 loci microsatelitales nos indican que la mayoría de los loci son informativos, es decir, que son eficaces para detectar polimorfismo en una población (véase tabla 10-1).

De acuerdo a Selkoe y Toonen (2006), es muy importante que los marcadores moleculares que se usen en un estudio sean independientes, ya que de lo contrario se crea pseudo-replicación de loci en los análisis. En este caso, si el test de desequilibrio de ligamiento es significativo entre dos loci, uno de ellos debería ser descartado (Selkoe & Toonen, 2006). Los resultados del test de desequilibrio de ligamiento en nuestros loci microsatelitales indican que dos loci se segregan conjuntamente (194964 y 37595), por lo que habrá de considerarse, para su uso en estudios posteriores, la selección de alguno de ellos.

En definitiva, en este estudio se generan nuevos marcadores microsatelitales polimórficos, así como se reportan otros que podrían llegar a serlo, además de la gran cantidad de loci con cebadores diseñados que han sido identificados. Además, se cuenta con un número de marcadores moleculares para la especie que servirán para estudiar los patrones de conectividad entre poblaciones, estimar el tamaño poblacional efectivo y así, entre otros estudios más, con la finalidad de explotar este recurso de importancia farmacológica y biotecnológica.

10. Resultados significativos y Conclusiones

>Luego de una revisión bibliográfica sobre las especies del pacífico mexicano y de analizar las características morfológicas y moleculares de nuestros individuos, concluimos que la especie objeto de estudio corresponde a *A. gerardogreni*. Esto considerando las tallas reportadas de Gómez y Bakus (1992) y considerando la plasticidad de la especie.

> A partir de secuenciación de siguiente generación (plataforma Illumina), se generaron más de 6 millones de secuencias de buena calidad, con una longitud media de 120 pb para la especie *Aplysina gerardogreeni*. Las secuencias se ensamblaron en más de 272,000 contigs con un tamaño promedio de 150 pb.

>De los 20 loci amplificadores, 13 produjeron una amplificación confiable y polimorfismo detectable de acuerdo a las pruebas aplicadas, con un promedio de 2,5 alelos por locus (rango: 1-5). De acuerdo a los análisis realizados, estos loci microsatelitales son adecuados para implementarse en futuros estudios de conectividad molecular para estimar la baja o alta vulnerabilidad de la especie en una o varias poblaciones y/o para estimar patrones filogeográficos.

>Se encontraron 1106, 59 y 303 loci microsatelitales, del tipo di, tri y tetranucleótido, respectivamente en los contigs ensamblados. Sin embargo, sólo se pudieron generar primers para 143 del tipo dinucleótido, 15 del tipo trinucleótido y 97 del tipo tetranucleótido. Esto podría considerarse como un bajo número de loci, pero se debe considerar que en este estudio se limitó el análisis a los mejores 40 loci microsatelitales, por lo que si se incrementa el esfuerzo se podría incrementar el número de loci microsatelitales reportados aquí para la especie *A. gerardogreeni*.

>Se obtuvo el genoma mitocondrial parcial (65-70%) de la especie *A. gerardogreeni* con un contenido G-C del 33.5%. A pesar de que no se logró obtener el 100% del genoma mitocondrial, actualmente es posible completar la información a partir de otros mitogenomas del género *Aplysina*, para el diseño de primers en regiones alternas a las faltantes, para su amplificación y secuenciación.

>Al comparar el mito-genoma de *A. gerardogreeni* con los ya publicados de *A. fulva* y *A. cauliformis*, se observó una organización similar a la de estos últimos, pero con un tamaño mayor de la especie de estudio, de aproximadamente 19,984 pb contra 19,620 de *A. fulva* y *A. cauliformis*.

>Las variaciones nucleotídicas encontradas en la comparación de los mitogenomas, podrían sugerir una sustitución a nivel aminoácido en algún producto proteico, por lo que resultaría interesante profundizar en el tema.

11. Referencias bibliográficas

Alba, V. M., González J., Herrera, C., Ledesma, J., Machado, A., Rico, R., Rosales, E. & Vera, A. (1979). Estudio sedimentológico de la bahía de Puerto Viejo, Mazatlán Sinaloa. *Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología*, Universidad Nacional Autónoma de México, 6(1), 97-120.

Avice, J. C. (2000). "Phylogeography. The history and formation of species". Harvard University Press, Cambridge.

Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3-15.

Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 79, 341-353.

Blanquer, A., Uriz, M. J. & Pascual, M. (2005). Polymorphic microsatellite loci isolated from the marine sponge *Scopalina lophyropoda* (Demospongiae: Halichondrida) *Molecular Ecology Notes*, 5, 466-468.

Blanquer A., & Uriz MJ. (2010). Population genetics at three spatial scales of a rare sponge living in fragmented habitats. *BMC Evolutionary Biology* 10, 13.

Bergquist, P. R. (1978). *Sponges*. (Hutchinson: London) & (University of California Press: Berkeley & Los Angeles), 1-268.

Bergquist, P. R. (1980). A revision of the supraspecific classification of the orders Dictyoceratida, Dendroceratida and Verongida (class Demospongiae). *New Zealand Journal of Zoology*, 7, 443-503.

Bergquist, P. R. & Cook, S. C. (2002). Order Verongida Bergquist, 1978. In: Hooper, J.N.A., Soest, R.W.M. Van (Eds.). *Systema Porifera. A guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, NY, Vol. (1), 1081-1085.

Bergquist, P. R. & Hartman, W. D. (1969). Free amino acid patterns and the classification of the Demospongiae. *Marine Biology*, 3(3), 247-268.

Betancourt-Lozano M., Gonzales-Farias F., Ganzales-Acosta B., Garcia-Gasca A. & Bastida-Zavala J. R. (1998). Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *Journal Exp Marine Biology Ecology*, 223, 1-18.

Borchiellini, C., Chombard, C., Lafay, B. & Boury-Esnault, N. (2000). Molecular systematics of sponges (Porifera). *Hydrobiology*, 420, 15-27.

Borchiellini, C., Chombard, C., Maldonado, M., Aylon, E. & Vacelet, J. (2004). Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular Phylogeny Evolution*, 32, 823-837.

Boury-Esnault N. (1971) Spongiaires de la zone rocheuse littorale de Banyuls-sur-mer. I. - Écologie et répartition. *Vie Milieu*, 22, 159-192.

Boury-Esnault, N.; Lopes, M. T. (1985). Les Démosponges littorales de l'Archipel des Açores. *Annales de l'Institut océanographique*, 61(2), 149-225.

Boury-Esnault, N., Klautau, M., Bezac, C., Wulff, J. & Solé-Cava, A. M. (1999). Comparative study of putative conspecific sponge populations from both sides of the Isthmus of Panama. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79, 39-50.

Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (2003). Invertebrates. 2^a Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 450.

Calderón, I., Ortega, N., Duran, S., Becerro, M. A., Pascual, M., & Turon, X. (2007). Finding the relevant scale: clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). *Molecular Ecology*, 16, 1799-1810.

Caballero-George, C., Bolaños, J., Ochoa, E., Carballo, J. L., Cruz, J. A. & Elizabeth Arnold, A. (2010). Protocol to isolate sponge-associated fungi from tropical waters and an examination of their cardioprotective potential *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4 (4), pp. 881-899.

Carballo JL (1994) Taxonomía, zoogeografía y autoecología de los Poríferos del Estrecho de Gibraltar. Unpublished D. Phil. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España, 316 pp.

Carballo, J. L. (2002). Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. Perspectiva actual. In: Laborda, A.J. (Ed.). *El mar como fuente de moléculas bioactivas*. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales, Universidad de León. León, España, 83-115.

Carney J. R., & Rinehart K. L. (1995). Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *Journal of Natural Products*, 58(7), 971-985

Carroll, S. P., Hendry, A. P., Reznick, D. N., & Fox, C. W. (2007). Evolution on Ecological Time-Scales *Functional Ecology*, 21, 387-393.

Carter, H. J. (1875). Notes introductory to the study and classification of the Spongida. Part II. Proposed classification of the Spongida. *Annals and Magazine of Natural History*, 4(16), 126-145.

Carter, H. J. (1885). Descriptions of Sponges from the Neighbourhood of Port Phillip Heads, South Australia. *Annals and Magazine of Natural History*, 15(87), 196-222.

Charlesworth, B. (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, 10, 205.

Charlotte Noyer, Gemma Agell, Marta Pascual & Mikel A. Becerro. (2009). "Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge *Spongia agaricina* (Demospongiae: Dictyoceratida)". *Conservation Genetic*, 10, 1895–1898.

Church G. M., Deamer D. W., Branton D., Baldarelli R. & Kasianowicz J. (1998). Characterization of individual polymer molecules based on monomer- interface interaction. United States Patent. Patent number 5795782. US005795782.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R. & Yasumoto, T. (1997). Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea. *Toxicon*, 35, 177-183.

Comisión Nacional del Agua. (2002). Servicio Meteorológico Nacional 2002. Datos estadísticos climáticos del observatorio meteorológico de Mazatlán, Sinaloa, México.

Cruz-Barraza J. A., Vega C. & Carballo J. L. (2014). Taxonomy of family Plakinidae (Porifera: Homoscleromorpha) from Eastern Pacific Coral Reefs: molecular systematics through *cox1* and *cob* mtDNA data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171(2), 254-276.

Cruz-Barraza, J. A., Carballo, J. L., Rocha-Olivares, A., Ehrlich, H. & Hoh, M. (2012). Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina*

(Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific PLoS ONE 7(8): e42049. doi:10.1371/journal.pone.0042049.

Csilléry K., Blum M., G. B., Gaggiotti O. & François, O. (2010). Approximate Bayesian Computation (ABC) in practice. Trends in Ecology and Evolution, 25, 410-418.

Dailianis, T., Tsigenopoulos, C. S., Dounas, C. & Voultziadou, E. (2011). Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: Patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation Molecular Ecology, 20 (18), 3757-3772. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05222.x.

Dickinson M. (1945) Sponges of Gulf of California. University of Southern California Press, Los Angeles, California. pp. 249.

De Necochea Campion R. & Canul Tec J. C. (2004). Métodos Físicoquímicos en Biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Consultado en: <http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf>

Dennis, L., Xiujuan W & Michelle K. (2008). Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. Molecular Phylogenetics and Evolution 49 111–124.

Díaz, M. C. & Rützler, K. (2001). Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. Bulletin of Marine Science, 69(2), 535-546.

Díaz, M. C.; van Soest, R. W. M.; Rützler, K. & Guzmán, H. M. (2005). *Aplysina chiriquiensis*, a new pedunculate sponge from the Gulf of Chiriqui, Eastern Pacific (Aplysinidae, Verongida). *Zootaxa*, 1012: 1-12.

Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., & Turon, X. (2002). Polymorphic microsatellite loci in the sponge *Crambe crambe* (Porifera: Poecilosclerida) and their variation in two distant populations. *Molecular Ecology Notes*, 2, 478-480.

Duran, S., Pascual, M., & Turon, X. (2004a). Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology*, 144, 31-35.

Duran, S., Giribet, G., & Turon, X. (2004b). Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 13, 109-122.

Duran, S., Pascual, M., Estoup, A., and Turon, X. (2004c). Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 13, 511-522.

Ehrlich, H., Deutzmann, R., Brunner, E., Cappellini, E., Koon, H., *et al.* (2010). "Three-Dimensional Chitin-Based Scaffolds from Verongida Sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and Identification of Chitin." *International Journal of Biological Macromolecules*, 47.2, 132-40.

Encarnación-Dimayuga, R., Ramírez, M. R. & Luna-Herrera, J. (2003). Aerothionin, a Bromotyrosine Derivative with Antimycobacterial Activity from the Marine Sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharmaceutical Biology*, 41(5), 384-387.

Erwin, P. M. and Thacker, R. W. (2007). Phylogenetic analysis of marine sponges within the order Verongida: a comparison of morphological and molecular data. *Invertebrate Biology*, 126, 220-234.

Erpenbeck, D., Hooper, J. N. A. & Wörheide, G. (2006). CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' are we sequencing a suboptimal partition?. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 550-553.

Erpenbeck, D., Sutcliffe P., Cook, S. C., Dietzel, A., Maldonado, M., Soest, R. W. M. van, Hooper J. N. A. & Wörheide, G. (2012). Horny sponges and their affairs: On the phylogenetic relationships of keratose sponges. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 809-816.

Faircloth, B. C. (2008). Msatcommander: Detection of Microsatellite Repeat Arrays & Automated, Locus-Specific Primer Design. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 92–94.

Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A. & Uni, S., *et al.* (2009). Integrated Taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6, 1-12.

Fieseler, L.; Horn, M.; Wagner, M. & Hentschel, U. (2004). Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol*, 70, 3724–3732.

Giles E. C., Saenz-Agudelo P., Berumen M. L. & Ravaso T. (2013). Novel polymorphic microsatellite markers developed for a common reef sponge *Stylissa carteri*. *Marine Biodiversity*, 43: 237-241.

Gómez, P. (2002). Esponjas marinas del golfo de México y el Caribe. AGT Editores, México, 131.

Grant, R. E. (1861). Tabular view of the primary divisions of the Animal Kingdom, intended to serve as an outline of an elementary course of recent Zoology, etc. (London): i-vi, 1-91.

Grosberg, R., & Cunningham, C. W. (2001). Genetic structure in the sea. From populations to communities. *Marine Community Ecology* (M. D. Bertness, S. D. Gaines, and M. E. Hay eds.), 61-84. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.

Guardiola, M., Frotscher, J. & Uriz, M. J. (2011). Genetic structure and differentiation at a short-time scale of the introduced calcareous sponge *Paraleucilla magna* to the western Mediterranean. *Hydrobiology*, DOI 10.1007/s10750-011-0948-1.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (2003), S96-S99.

Hedgpeth, J. W. (1957). Sandy beaches. In: Hedgpeth J. W. (ed.) *Treatise on marine ecology and paleoecology*, Vol. I. Ecology. The Geological Society of America, Boulder, Colorado (Mem. Geological Society of America, 67, 587-608).

Heim I., Nickel M, & Brümmer F. (2007). Molecular markers for species discrimination in poriferans: a case study on species of the genus *Aplysina*. In editors: Custódio M R, Lobo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G,. *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28, Museu Nacional, 361–371.

Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E. & Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70, 273-290.

Hillis D. M. & J. J. Wiens. (2000). Molecules versus morphology in systematics. In: J. J. Wiens (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington. 1-19.

Hoshino, S., & Fujita, T. (2006). Isolation of polymorphic microsatellite markers from *Hymeniacidon sinapium* (Porifera: Demospongiae:Halichondrida). *Molecular Ecology Notes*, 6, 829–831.

Hoshino, S., Saito, D. S., & Fujita, T. (2008). Contrasting genetic structure of two Pacific *Hymeniacidon* species. *Hydrobiology*, 603, 313-326.

Hyatt, A. (1875). Revision of the North American Poriferae; with Remarks upon Foreign Species. Part I. *Memoirs of the Boston Society of Natural History* 2, 399-408, pl. XIII.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409, 860-921.

González-Ramos, J., Agell, G. & Uriz, M. J. (2015). Microsatellites from sponge genomes: The number necessary for detecting genetic structure in *Hemimycale columella* populations. *Aquatic Biology*, 24 (1), 25-34. doi: 10.3354/ab00630.

Kayal, E. & Lavrov, D. V. (2008). The mitochondrial genome of *Hydra oligactis* (Cnidaria, Hydrozoa) sheds new light on animal mtDNA evolution and cnidarian phylogeny *Gene*, 410 (1), pp. 177-186. doi: 10.1016/j.gene.2007.12.002

Knudsen, T. B. & Flensburg, M. (2008). CLC Genomics Workbench, 4.0.

Knowlton, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annual review of Ecology and Systematics*, 24, 189-216.

Knowlton, A. L., Pierson, B. J., Talbott, S. L., & Highsmith, R. C. (2003). Isolation and characterization of microsatellite loci in the intertidal sponge *Halichondria panicea*. *Molecular Ecology Notes*, 3, 560-562.

Kreuter, M. H., Robitzki, A., Chang, S., Steffen, R., Michaelis, M., Kljajic, Z., Bachmann M., Schröder H.C. & Müller W. E. G. (1992). Production of the cytostatic agent aerophysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in in vitro culture. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 101 (1), 183-187. doi: 10.1016/0742-8413(92)90217-U.

Gigliarelli, L., Lucentini, L., Palomba, A., Sgaravizzi, G., Lancioni, H., Lanfaloni, L., Willenz, P. & Panara, F. (2008). Applications of PCR-RFLPs for differentiating two freshwater sponges: *Ephydatia fluviatilis* and *Ephydatia mülleri*. *Hydrobiology*, 605 (1), 265-269. doi: 10.1007/s10750-008-9327-y.

Laubenfels, M. W. De. (1930). The Sponges of California. (Abstracts of dissertations for the degree of doctor of philosophy. *Stanford University Bulletin*, 5(98), 24-29.

Laubenfels, M.W. De. (1932). The marine and fresh-water sponges of California. *Proceedings of the United States National Museum*, 81(2927), 1-140.

Laubenfels M. W. De. (1936). A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular and West Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. *Carnegie Institute of Washington, Papers from the Tortugas Laboratory*, 30, 1-225.

Lavrov, D. V., Forget, L., Kelly, M. & Lang, B. F. (2005). Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1231–1239.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465.

Lim, S.-C.; Wiklund, H.; Glover, A. G.; Dahlgren, T. G. & Tana, K.-S. (2017). New genus and species of abyssal sponge commonly encrusting polymetallic nodules in the Clarion-Clipperton Zone, East Pacific Ocean. *Systematics and Biodiversity*, 15(6): 507–519.

Littler, M. M. & Littler, D. S. (1980). Mainland rocky intertidal aerial survey from Point Arguello to Point Loma, California. Bureau of Land Management, U. S. Department of the Interior, Washington, D. C.

Liu, Z. J. & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238 (1-4), 1-37. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.05.027

Maldonado, M. (2009). Embryonic development of verongid demosponges supports the independent acquisition of spongin skeletons as an alternative to the siliceous skeleton of sponges. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97, 427–447.

Ley-Velarde, M. (2013). Estudio de la plasticidad fenotípica de esponjas del género *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) integrando caracteres morfológicos y marcadores moleculares. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, 58 pp.

Markham, J. W. (1973). Observation on the ecology of *Laminaria sinclairii* on three northern Oregon beaches. *Journal of Phycology*, 9, 336-341.

Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.

Mayr, E. (1982). *The growth of Biological Thought: Diversity, evolution, and inheritance*. Harvard University Press. 681-726.

Montaño, Y. & Gutierrez, M. (1987). Control de perfiles de playa en el área de Mazatlán, Sinaloa, México. *Canales de Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 14 (1), 1-12.

Montaño Y. & Peraza R. (1986). Aplicación de un modelo de tipo predictivo para cuantificar el transporte litoral de arenas en dos playas de la costa sur de Sinaloa. *Canales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 13 (1), 305-314.

Morrow, C. & Cárdenas, P. (2015). Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). *Frontiers in Zoology*, 12 (1), art. no. 7. doi: 10.1186/s12983-015-0099-8.

Morrow, C. C., Picton, B. E., Erpenbeck, D., Boury-Esnault, N., Maggsa, C. A. & Allcock, A. L. (2012). Congruence between nuclear and mitochondrial genes in Demospongia: A new hypothesis for relationships within the G4 clade (Porifera: Demospongia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 174-190.

Montaño, Y. (1985). Estudio del transporte litoral de arenas en Isla de la Piedra, Mazatlán, Sinaloa, usando trazadores fluorescentes. *Anales del instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 12(1), 15-32.

Montaño, Y. & Peraza, R. (1986). Aplicación de un modelo de tipo predictivo para cuantificar el transporte litoral de arenas en dos playas de la costa sur de Sinaloa. *Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 13(1), 305-314.

Mullis K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. H., Lill, R. E. & Li, S., *et al.* (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70, 15-25.

Narsinh, T. & Müller, E. G. (2004). Biotechnological potential of marine sponges. *Curr. Sci.*, 86(11), 1506-1512.

Nichols, S. A. & Barnes, P.A.G. (2005). A molecular phylogeny and historical biogeography of the marine sponge genus *Placospongia* (Phylum Porifera) indicate low dispersal capabilities and widespread crypsis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323, 1-15.

Noyer, C., Agell, G., Pascual, M. & Becerro, M. A. (2009). Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge *Spongia agaricina* (Demospongiae: Dictyoceratida) *Conservation Genetics*, 10 (6), pp. 1895-1898. doi: 10.1007/s10592-009-9848-6

Olson, M. (1993). The human genome project. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(10), 4338-4344.

Padua, A., Cavalcanti, F. F., Cunha, H. & Klautau, M. (2013). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Clathrina aurea* (Porifera,

Calcarea) Marine Biodiversity, 43 (4), pp. 489-492. doi: 10.1007/s12526-013-0167-2.

Palumbi, S. R., Cipriano, F., & Hare, M. P. (2001). Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: The three-times rule. *Evolution* 55, 859–868.

Pearse, D. E., & Crandall, K. A. (2004). Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5, 585-602.

Pile, A. J., Patterson, M. R., Savarese, M., Chernikh, V. I. & Fialkov, V. A. (1997). Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2 Sponge abundance, 56 diet, feeding efficiency, and carbon flux. *Limnology and Oceanography*, 42 (1), 178-184.

Pfenninger, M., Staubach, S., Albrecht, C., Streit, B. & Schwenk, K. (2003). Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O. F. Müller, 1774). *Molecular Ecology*, 12, 2731-2745.

Pinheiro U. S. & Hajdu E. (2001) Shallow-water *Aplysina* Nardo (Aplysinidae, Verongida, Demospongiae) from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical southwestern Atlantic), with description of a new species and a literature review of other Brazilian records of the genus. *Rev Bras Zool* 18(1), 143-160.

Pinheiro, U. S., Hajdu, E. & Custódio, M. R. (2007). *Aplysina nardo* (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. *Zootaxa*, 1609, 1–51.

Pires, A. & Marinoni, L. (2010). DNA Barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropical*, 10(2). 339-346.

Pond, S. & Pickard G. L. (1983). Introductory dynamical oceanography. Second Edition. Pergamon Press, Oxford, 329 pp.

Puyana, M., Fenical, W. & Pawlik, J.R. (2003). Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean? *Marine Ecology Progress Series*, 246, 127-135.

Quail M. A., Smith M., Coupland P., Otto T. D., Harris S. R., Connor T. R., Bertoni A., Swerdlo H. P. & Gu Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 13(1), 341-353. doi:10.1186/1471-2164-13-341.

Redmond, N. E., Morrow, C. C., Thacker, R. W., Diaz, M. C., Boury-Esnault, N., Cárdenas, P., Hajdu, E. & Collins, A. G. (2013). Phylogeny and systematics of demospongiae in light of new small-subunit ribosomal DNA (18S) sequences *Integrative and Comparative Biology*, 53 (3), pp. 388-415. doi: 10.1093/icb/ict078.

Riesgo, A., Blasco, G., Erwin, P. M., Pérez-Portela, R. & López-Legentil, S. (2014). Optimization of 14 microsatellite loci in a Mediterranean demosponge subjected to population decimation, *Ircinia fasciculata*. *Conservation Genetics Resources*, 6 (2), pp.301-303. doi: 10.1007/s12686-013-0137-9.

Rinehart, K. H. (2000). Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Review*, 20(1): 1-27.

Roden, G. L. (1958). Oceanographic and meteorological aspects of the Gulf of California. *Pacific Science*, 12(1), 21-45.

Saeki B. M., Granato A. C., Berlinck R. G. S., Magalhaes A., Schefer A. B., Ferreira A. G., Pinheiro U. S. & Hajdu E. (2002) Two unprecedented 371

dibromotyrosine-derived alkaloids from the Brazilian endemic marine sponge *Aplysina caissara*. *Journal of Natural Products*, 65, 796-799.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5463-5467.

Schlenk F. (1988). Early nucleic acid chemistry. *Trends in Biochemical Sciences*, 13(2), 67-69.

Schmitt, S., Hentschel, U., Zea, S., Dandekar, T. & Wolf, M. (2005). Erratum: ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of aplysinidae (verongida, demospongiae) (*journal of molecular evolution* (2005) 60 (327-336)). *Journal of Molecular Evolution*, 61(1), 148-150. doi:10.1007/s00239-005-6111-8

Shepard, F. P. (1973). *Submarine geology*. Third edition. Scripps Institution of Oceanography, 517 pp.

Secretaría de Marina. (1974). *Estudio geográfico de la región de Mazatlán, Sinaloa*. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. México, D. F.

Simpson J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60.73-76.

Smith, L. J. Sandler, R. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. Connell, C. Heiner, S. Kent, & L. Hood (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321, 64-69

Soest, R.W.M. van, Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M. & Erpenbeck, D., *et al.* (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). PLoS ONE, 7(4): e35105. doi:10.1371/journal.pone.0035105.

Solé-Cava, A. M. & Boury-Esnault, N. (1999). Patterns of intra- and interspecific divergence in marine sponges. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44, 591–602.

Sperling, E. A., Rosengarten, R. D., Moreno, M. A. & Dellaporta, S. L. (2012). The complete mitochondrial genome of the verongid sponge *Aplysina cauliformis*: Implications for DNA barcoding in demosponges. *Hydrobiology*, 687 (1), 61-69. doi: 10.1007/s10750-011-0879-x

Taboada, S., Riesgo, A., Blasco, G., Solà J., R. Xavier & López-Legentil, S. (2015). Development of 10 microsatellite markers for the Atlanto-Mediterranean sponge *Petrosia ficiformis*. *Conservation Genetics Resources*, 7:895–897. DOI 10.1007/s12686-015-0496-5.

Taboada, S., Kenny, N. J., Riesgo, A., Wiklund, H., Paterson, G. L. J., Dahlgren, G. T. & Glover, G. A. (2017). Mitochondrial genome and polymorphic microsatellite markers from the abyssal sponge *Plenaster craigi* Lim & Wiklund, 2017: tools for understanding the impact of deep-sea mining. *Marine Biodiversity*, DOI 10.1007/s12526-017-0786-0.

Topsent, E. (1928). Spongiaires de l'Atlantique et de la Méditerranée provenant des croisières du Prince Albert Ier de Monaco. *Résultats des campagnes scientifiques accomplies par le Prince Albert I. Monaco*, 74:1-376, pls I-XI.

Uriz M. J. & Turon X. (2012). "Sponge ecology in the molecular era". Departamento de Ecología Marina, Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB-CSIC), Blanes, Girona, España. doi: 10.1016/B978-0-12-387787-1.00006-4.

Van Oppen, M, J. H., Wörheide, G. & Takabayashi, M. (2002). Nuclear markers in evolutionary and population genetic studies of scleractinian corals and sponges. Proceedings 9th International Coral Reef Symposium, 1, 23-27.

Van Soest, R. W. M; Boury-Esnault, N.; Hooper, J. N. A.; Rützler, K.; de Voogd, N. J.; Alvarez de Glasby, B.; Hajdu, E.; Pisera, A. B.; Manconi, R.; Schoenberg, C.; Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L. & Rios Lopez, P. (2017). World Porifera database: < <http://www.marinespecies.org/porifera/> >.

Venter J. C., Adams M.D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., & Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. Science, 291(5507),1304-1351.

Wang, X. & D. V. Lavrov, (2008). Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae. PloS One, 3: e2723.

Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature, 171, 737–738. doi:10.1038/171737a0.

Wörheide, G., Hooper, J. N. A. & Degnan, B. M. (2002). Phylogeography of western Pacific *Leucetta chagonensis* (Porifera: from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). Molecular Ecology, 11, 1753-1768.

Wörheide, G., Fromont, J. & Solé-Cava, A. (2004). Population genetics and phylogeography of sponges - A workshop synthesis. Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell Università di Genova, 68, 683-688.

Wörheide G., Solé-Cava, A. M. & Hooper, J. N. A. (2005). Biodiversity, molecular ecology and phylogeography of marine sponges: patterns, implications and outlooks. *BioOne*, DOI: 10.1093/icb/45.2.377.

Wulff, J. L. (2001). Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how? *Bulletin of Marine Science*, 69, 831-846.

Yahel, G., Sharp, J. H. Marie, D., Häse, C. & Genin, A. (2003). In Situ Feeding and element Removal in the Symbiont- Bearing Sponge *Theonella swinhoei*: Bulk DOC Is the Major Source for Carbon. *Limnology and Oceanography*, 48(1,Par. 1), 141-149.

Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584.

Anexo 1:

Tabla 11. Sustituciones encontradas en el mitogenoma de *Aplysina gerardogreeni* con respecto a *A. fulva*. (Posición (número), Base encontrada (*A. gerardogreeni*)- Base del consenso (*A. fulva*)).

Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen
42	G-T	<i>rnl rRNA</i>	2193	A-G	<i>rnl rRNA</i>	3662	C-A	<i>nad3</i>	6895	A-G	<i>cob</i>
431	C-A	<i>rnl rRNA</i>	2209	G-A	<i>rnl rRNA</i>	3665	A-G	<i>nad3</i>	7197	G-A	<i>cob</i>
438	G-C	<i>rnl rRNA</i>	2210	C-A	<i>rnl rRNA</i>	3686	G-T	<i>nad3</i>	7320	C-T	<i>cob</i>
442	C-A	<i>rnl rRNA</i>	2212	C-G	<i>rnl rRNA</i>	3690	G-T	<i>nad3</i>	7574	A-T	<i>cob</i>
450	A-G	<i>rnl rRNA</i>	2213	G-A	<i>rnl rRNA</i>	3961	G-T	<i>nad6</i>	7593	T-G	<i>cob</i>
488	G-T	<i>rnl rRNA</i>	2214	G-T	<i>rnl rRNA</i>	3902	T-C	<i>nad6</i>	7615	A-C	<i>cob</i>
489	C-T	<i>rnl rRNA</i>	2220	G-C	<i>rnl rRNA</i>	3950	A-C	<i>nad6</i>	7617	A-T	<i>cob</i>
784	C-G	<i>rnl rRNA</i>	2221	C-N	<i>rnl rRNA</i>	3965	T-C	<i>nad6</i>	7619	A-G	<i>cob</i>
821	G-A	<i>rnl rRNA</i>	2232	C-T	<i>rnl rRNA</i>	4513	A-G	<i>trnH(gug)</i>	7622	A-G	<i>cob</i>
1369	"-"-"	<i>rnl rRNA</i>	2234	G-A	<i>rnl rRNA</i>	4529	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7631	A-G	<i>cob</i>
1854	"-"-T	<i>rnl rRNA</i>	2235	C-A	<i>rnl rRNA</i>	4535	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7640	A-T	<i>cob</i>
2162	G-T	<i>rnl rRNA</i>	2237	C-T	<i>rnl rRNA</i>	4538	G-"-"	<i>trnH(gug)</i>	7643	T-C	<i>cob</i>
2166	G-C	<i>rnl rRNA</i>	2238	A-G	<i>rnl rRNA</i>	4540	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7650	A-T	<i>cob</i>
2167	C-A	<i>rnl rRNA</i>	2240	C-G	<i>rnl rRNA</i>	4554	C-G	<i>trnH(gug)</i>	7893	C-T	<i>cob</i>
2168	C-T	<i>rnl rRNA</i>	2242	C-T	<i>rnl rRNA</i>	4559	C-A	<i>trnH(gug)</i>	7916	T-C	<i>cob</i>
2180	G-C	<i>rnl rRNA</i>	2255	G-C	<i>rnl rRNA</i>	4564	G-T	<i>trnH(gug)</i>	7918	G-T	<i>cob</i>
2181	C-G	<i>rnl rRNA</i>	2262	T-C	<i>rnl rRNA</i>	4566	G-A	<i>trnH(gug)</i>	8474	A-G	<i>nad1</i>
2183	G-A	<i>rnl rRNA</i>	2946	T-C	<i>trnN(guu)</i>	4572	C-T	<i>trnH(gug)</i>	8490	G-C	<i>nad1</i>
2186	C-A	<i>rnl rRNA</i>	2959	A-"-"	<i>trnN(guu)</i>	4574	C-T	<i>trnH(gug)</i>	8507	T-C	<i>nad1</i>
2187	C-T	<i>rnl rRNA</i>	2979	A-G	<i>trnN(guu)</i>	4576	C-A	<i>trnH(gug)</i>	8510	G-A	<i>nad1</i>
2188	G-C	<i>rnl rRNA</i>	3604	C-A	<i>nad3</i>	4579	T-C	<i>trnH(gug)</i>	8518	G-C	<i>nad1</i>
2190	G-T	<i>rnl rRNA</i>	3631	C-A:	<i>nad3</i>	6702	C-T	<i>trnT(ugu)</i>	8534	T-C	<i>nad1</i>
2191	C-T	<i>rnl rRNA</i>	3642	A-G	<i>nad3</i>	6865	T-C	<i>cob</i>	8752	A-G	<i>nad1</i>

Tabla 11 (Continuación). Sustituciones encontradas en los reads de *Aplysina gerardogreeni* con respecto a *A. fulva*. (Posición (número), Base encontrada (*A. gerardogreeni*)- Base del consenso (*A. fulva*)).

Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen
9277	T-C	<i>nad1</i>	9908	T-G	<i>cox1</i>	15262	G-A	<i>nad2</i>	18730	C-T	<i>rns Rrna</i>
9478	A-G	<i>trnS(uga)</i>	9910	C-A	<i>cox1</i>	15390	"-"-A	<i>nad2</i>	18741	C-A	<i>rns Rrna</i>
9814	T-A	<i>cox1</i>	9913	T-A	<i>cox1</i>	15391	"-"-T	<i>nad2</i>	19040	A-T	<i>rns Rrna</i>
9817	G-A	<i>cox1</i>	9916	C-T	<i>cox1</i>	15537	G-A	<i>nad2</i>	19167	C-T	<i>rns Rrna</i>
9823	G-A	<i>cox1</i>	9922	G-T	<i>cox1</i>	16180	T-A	<i>nad 5</i>	19176	T-G	<i>rns Rrna</i>
9826	C-T	<i>cox1</i>	9928	C-T	<i>cox1</i>	17963	T-A	<i>trnA(ugc)</i>	19177	G-A	<i>rns Rrna</i>
9834	A-T	<i>cox1</i>	10495	A-G	<i>cox1</i>	17965	G-A	<i>trnA(ugc)</i>	19185	A-T	<i>rns Rrna</i>
9835	C-T	<i>cox1</i>	11529	G-A	<i>cox2</i>	18038	N-G	<i>trnM(cau)e</i>	19196	A-T	<i>rns Rrna</i>
9841	"-"-A	<i>cox1</i>	12088	A-G	<i>cox2</i>	18046	T-N	<i>trnM(cau)e</i>	19197	A-C	<i>rns Rrna</i>
9844	T-C	<i>cox1</i>	9814	T-A	<i>atp8</i>	18358	A-G	<i>rns Rrna</i>	19199	T-A	<i>rns Rrna</i>
9862	G-T	<i>cox1</i>	9817	G-A	<i>atp8</i>	18364	C-G	<i>rns Rrna</i>	19212	C-T	<i>rns Rrna</i>
9868	T-A	<i>cox1</i>	13627	A-C	<i>cox3</i>	18367	A-T	<i>rns Rrna</i>	19221	A-T	<i>rns Rrna</i>
9871	T-G	<i>cox1</i>	13917	A-G	<i>cox3</i>	18371	G-C	<i>rns Rrna</i>	19223	N-T	<i>rns Rrna</i>
9874	G-T	<i>cox1</i>	13929	G-T	<i>cox3</i>	18667.5	C-"-"	<i>rns Rrna</i>	19231	T-G	<i>rns Rrna</i>
9880	C-T	<i>cox1</i>	13931	G-T	<i>cox3</i>	18674	G-A	<i>rns Rrna</i>	19236	T-C	<i>rns Rrna</i>
9886	G-A	<i>cox1</i>	13932	G-T	<i>cox3</i>	18680	G-A	<i>rns Rrna</i>	19246	T-G	<i>rns Rrna</i>
9889	T-A	<i>cox1</i>	13934	A-G	<i>cox3</i>	18682	T-A	<i>rns Rrna</i>	19262	G-T	<i>rns Rrna</i>
9892	A-T	<i>cox1</i>	13947	A-G	<i>cox3</i>	18690	G-A	<i>rns Rrna</i>	19263	C-A	<i>rns Rrna</i>
9895	C-A	<i>cox1</i>	13957	C-T	<i>cox3</i>	18699	A-T	<i>rns Rrna</i>	19272	A-G	<i>rns Rrna</i>
9900	C-A	<i>cox1</i>	13971	A-G	<i>cox3</i>	18702	C-T	<i>rns Rrna</i>	19274	C-T	<i>rns Rrna</i>
9901	G-T	<i>cox1</i>	13976	A-C	<i>cox3</i>	18718	G-A	<i>rns Rrna</i>	19287	C-A	<i>rns Rrna</i>
9904	A-T	<i>cox1</i>	13990	A-T	<i>cox3</i>	18721	A-C	<i>rns Rrna</i>	19375	G-T	<i>rns Rrna</i>
9907	G-A	<i>cox1</i>	13991	A-G	<i>cox3</i>	18727	C-T	<i>rns Rrna</i>			

Se encontraron 183 sustituciones en *A.fulva*.

Tabla 12. Sustituciones encontradas en los reads de *Aplysina gerardogreeni* con respecto a *A. cauliformis*. (Posición (número)-Base encontrada (*A. gerardogreeni*)- Base del consenso (*A. cauliformis*)).

Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen	Posición	Sustitución	Gen
361	C-G	<i>rnl rRNA</i>	7261	A-G	<i>cob</i>	9120	A-G	<i>trnS(uga)</i>	17607	G-A	<i>trnA(ugc)</i>
384	T-C	<i>rnl rRNA</i>	7264	A-G	<i>cob</i>	10137	A-G	<i>cox1</i>	17737	A-G	<i>trnF(gaa)</i>
392	T-G	<i>rnl rRNA</i>	7173	A-G	<i>cob</i>	11171	G-A	<i>cox2</i>	17901	G-T	<i>trnF(gaa)</i>
426	C-G	<i>rnl rRNA</i>	7276	A-T	<i>cob</i>	11513	T-C	<i>cox2</i>	17905	A-C	<i>trnF(gaa)</i>
463	G-A	<i>rnl rRNA</i>	7282	A-T	<i>cob</i>	11730	A-G	<i>cox2</i>	17927	A-T	<i>trnF(gaa)</i>
1496	"-"-T	<i>rnl rRNA</i>	7285	T-C	<i>cob</i>	13269	A-C	<i>cox3</i>	17959	A-G	<i>rns rRNA</i>
1533	A-C	<i>rnl rRNA</i>	7292	A-T	<i>cob</i>	13803	A-G	<i>trnQ(uug)</i>	17973	G-T	<i>rns rRNA</i>
4167.5	C-"-"	<i>trnH(gug)</i>	7535	C-T	<i>cob</i>	13836	A-T	<i>trnQ(uug)</i>	17978	A-G	<i>rns rRNA</i>
4171	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7558	T-C	<i>cob</i>	13859	G-A	<i>trnQ(uug)</i>	17980	A-G	<i>rns rRNA</i>
4182	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7560	G-T	<i>cob</i>	14609	A-C	<i>nad2</i>	17984	A-T	<i>rns rRNA</i>
4187	A-C	<i>trnH(gug)</i>	7686	A-C	<i>trnl(cau)</i>	14622	A-G	<i>nad2</i>	17992	C-T	<i>rns rRNA</i>
4216	C-T	<i>trnH(gug)</i>	7705	T-G	<i>trnl(cau)</i>	14624	A-T	<i>nad2</i>	17996	G-T	<i>rns rRNA</i>
4218	C-A	<i>trnH(gug)</i>	7749	A-T	<i>trnl(cau)</i>	14626	A-G	<i>nad2</i>	17998	C-"-"	<i>rns rRNA</i>
4221	T-C	<i>trnH(gug)</i>	7753	A-G	<i>trnl(cau)</i>	14628	A-G	<i>nad2</i>	18000	A-G	<i>rns rRNA</i>
6344	C-T	<i>trnT(ugu)</i>	7759	A-T	<i>trnl(cau)</i>	14635	A-T	<i>nad2</i>	18227	G-A	<i>rns rRNA</i>
6839	G-A	<i>cob</i>	7762	A-G	<i>trnl(cau)</i>	14640	A-G	<i>nad2</i>	18296	A-G	<i>rns rRNA</i>
6962	C-T	<i>cob</i>	7765	A-T	<i>trnl(cau)</i>	14644	A-T	<i>nad2</i>	18316	G-A	<i>rns rRNA</i>
7174	T-A	<i>cob</i>	7768	A-T	<i>trnl(cau)</i>	14650	A-G	<i>nad2</i>	18322	G-A	<i>rns rRNA</i>
7213	A-T	<i>cob</i>	7771	A-T	<i>trnY(gua)</i>	14882	C-T	<i>nad2</i>	18324	T-A	<i>rns rRNA</i>
7244	A-C	<i>cob</i>	7774	A-G	<i>trnY(gua)</i>	14904	G-A	<i>nad2</i>	18332	G-A	<i>rns rRNA</i>
7248	A-T	<i>cob</i>	7785	T-G	<i>trnY(gua)</i>	14919	T-G	<i>nad2</i>	18341	A-T	<i>rns rRNA</i>
7257	A-C	<i>cob</i>	8394	A-G	<i>nad1</i>	15179	G-A	<i>nad2</i>	18344	C-T	<i>rns rRNA</i>
7259	A-T	<i>cob</i>	8919	T-C	<i>nad1</i>	17605	T-A	<i>trnA(ugc)</i>	18360	G-A	<i>rns rRNA</i>

Tabla 12. Aquí se muestran las sustituciones encontradas en los reads de *Aplysina gerardogreeni* con respecto a *A. cauliformis*. (Posición (número)-Base encontrada (*A. gerardogreeni*)- Base del consenso (*A. cauliformis*). Continuación.

Posición	Sustitución	Gen
18363	A-C	<i>rns rRNA</i>
18369	C-T	<i>rns rRNA</i>
18372	C-T	<i>rns rRNA</i>
18383	C-A	<i>rns rRNA</i>
18682	A-T	<i>rns rRNA</i>
18907	G-T	<i>rns rRNA</i>
18917	A-C	<i>rns rRNA</i>
18924	A-T	<i>rns rRNA</i>
18937	G-T	<i>rns rRNA</i>
18941	A-C	<i>rns rRNA</i>
18947	A-G	<i>rns rRNA</i>
18950	A-C	<i>rns rRNA</i>
18962	G-T	<i>rns rRNA</i>
18967	A-T	<i>rns rRNA</i>
18970	A-C	<i>rns rRNA</i>
18975	A-C	<i>rns rRNA</i>
18977	A-T	<i>rns rRNA</i>
18978	A-G	<i>rns rRNA</i>
18979	C-G	<i>rns rRNA</i>
18983	A-G	<i>rns rRNA</i>
18990	A-T	<i>rns rRNA</i>
18992	C-T	<i>rns rRNA</i>
19002	A-T	<i>rns rRNA</i>
19003	A-T	<i>rns rRNA</i>
19008	A-T	<i>rns rRNA</i>

Se encontraron 117 sustituciones para *A. cauliformis*.

Anexo 2

Tabla 13. Porcentaje mapeado de secuencias de *A. gerardogreeni* en *A. fulva*.

Gen	Codon de Inicio/Final	Pares de bases totales	Pares de bases mapeados	Porcentaje mapeado
<i>rnl rRNA</i>	AGG/TAA	2629	2122	80.72
<i>trnD(guc)</i>	GGG/CCG	72	3	4.17
<i>trnN(guu)</i>	TCT/GAA	71	71	100.00
<i>nad4</i>	TAC/ATC	299	13	4.35
<i>trnR (ucg)</i>	TAC/TAA	71	19	26.76
<i>nad3</i>	TAC/ATT	353	230	65.16
<i>nad6</i>	CAC/ATT	572	249	43.53
<i>trnE(uuc)</i>	CGA/CAT	71	71	100.00
<i>trnH(gug)</i>	CCA/GGG	73	73	100.00
<i>nad4</i>	TAC/ATT	1427	828	58.02
<i>trnP(ugg)</i>	GTC/ACT	72	0	0.00
<i>trnS(gcu)</i>	CTA/AGT	83	25	30.12
<i>atp9</i>	TAC/ATT	236	236	100.00
<i>trnT(ugu)</i>	CGT/CAA	72	72	100.00
<i>cob</i>	TAC/ATT	1145	1134	99.04
<i>trnL(uag)</i>	AAC/AAT	72	72	100.00
<i>trnI(cau)</i>	TCC/GAT	72	70	97.22
<i>trnY(gua)</i>	TTA/AAT	80	45	56.25
<i>trnI(gau)</i>	GCC/GCT	72	69	95.83
<i>trnL(uaa)</i>	CGG/CAT	73	0	0.00
<i>nad1</i>	TAC/ATT	965	703	72.85
<i>trnC(gca)</i>	CCG/GTA	72	72	100.00
<i>trnS(uga)</i>	CCT/GGA	84	84	100.00
<i>cox1</i>	ATG/TAA	1586	664	41.87
<i>cox2</i>	ATG/TAA	734	381	51.91
<i>trnK(uuu)</i>	TGG/CAT	72	66	91.67
<i>atp8</i>	ATG/TAG	226	0	0.00
<i>atp6</i>	ATG/TAA	734	480	65.40
<i>trnR(ucu)</i>	AAA/TGA	72	0	0.00
<i>cox3</i>	ATG/TAA	788	446	56.60
<i>trnQ(uug)</i>	TAG/TAT	70	70	100.00
<i>trnW(uca)</i>	AGA/CTG	71	50	70.42
<i>trnM(cau)f</i>	TGT/CTT	71	0	0.00
<i>nad2</i>	ATG/TAA	1428	588	41.18
<i>nad 5</i>	ATG/TAA	1857	781	42.06
<i>trnA(ugc)</i>	GGG/CCA	72	72	100.00
<i>trnM(cau)e</i>	GGT/CCT	72	72	100.00
<i>trnF(gaa)</i>	GCG/GCA	73	73	100.00
<i>rns rRNA</i>	ATT/TAT	1295	810	62.55
<i>trnG(ucc)</i>	GTA/GCA	72	0	0.00
<i>trnV(auc)</i>	AGG/CTA	73	5	6.85

Tabla 14. Porcentaje mapeado de secuencias de *A. gerardogreeni* en *A. cauliformis*. Además se incluyen codones de inicio/final.

Gen	Inicio/Final	Pares de bases totales	Pares de bases mapeados	Porcentaje mapeado
<i>rnl rRNA</i>	TAA/TAA	2068	1678	81.14
<i>trnD(guc)</i>	GGG/CCG	72	3	4.17
<i>trnN(guu)</i>	TCT/GAA	71	71	100.00
<i>nad4</i>	TAC/ATC	299	13	4.35
<i>trnR (ucg)</i>	TAC/TAA	71	19	26.76
<i>nad3</i>	TAC/ATT	353	0	0.00
<i>nad6</i>	CAC/ATT	572	72	12.59
<i>trnE(uuc)</i>	CGA/CAT	71	71	100.00
<i>trnH(gug)</i>	CAC/GGG	72	72	100.00
<i>nad4</i>	TAC/ATT	1541	763	49.51
<i>trnP(ugg)</i>	GTC/ACT	72	0	0.00
<i>trnS(gcu)</i>	CTA/AGT	83	25	30.12
<i>atp9</i>	TAC/ATT	236	236	100.00
<i>trnT(ugu)</i>	CGT/CAA	72	72	100.00
<i>cob</i>	TAC/ATT	1145	974	85.07
<i>trnL(uag)</i>	AAC/AAT	72	72	100.00
<i>trnI(cau)</i>	TCC/GAT	72	70	97.22
<i>trnY(gua)</i>	TTA/AAT	80	80	100.00
<i>trnI1 (gau)</i>	GCC/GCT	72	69	95.83
<i>trnL 1(uaa)</i>	CGG/CAT	73	0	0.00
<i>nad1</i>	TAC/ATT	965	603	62.49
<i>trnC(gca)</i>	CCG/GTA	72	72	100.00
<i>trnS(uga)</i>	CCT/GGA	84	56	66.67
<i>cox1</i>	ATG/TAA	1586	582	36.70
<i>cox2</i>	ATG/TAA	734	406	55.31
<i>trnK(uuu)</i>	TGG/CAT	72	34	47.22
<i>atp8</i>	ATG/TAG	233	0	0.00
<i>atp6</i>	ATG/TAA	734	560	76.29
<i>trnR(ucu)</i>	AAA/TGA	72	72	100.00
<i>cox3</i>	ATG/TAA	788	599	76.02
<i>trnQ</i>	TAG/TAT	70	70	100.00
<i>trnW</i>	AGA/CTG	71	50	70.42
<i>trnMi</i>	TGT/CTT	71	0	0.00
<i>nad2</i>	ATG/TAA	1428	636	44.54
<i>nad 5</i>	ATG/TAA	1857	855	46.04
<i>trnA(ugc)</i>	GGG/CCA	72	72	100.00
<i>trnM(cau)e</i>	GGT/CCT	72	72	100.00
<i>trnF(gaa)</i>	GCG/GCA	73	73	100.00
<i>rns rRNA</i>	TTG/CTC	952	544	57.14
<i>trnG(ucc)</i>	GTA/GCA	72	68	94.44
<i>trnV(auc)</i>	AGG/CTA	73	0	0.00

Anexo 3

Tabla 16. Descripción de los cebadores de los loci descartados y causa del descarte en *A. gerardogreeni*.

Cebadores	Secuencia	Contig	Resultado experimental
Aply-350-F	TGTAA*****	350	Sin amplificación
Aply-350-R	CTCTC*****		
Aply-79935-F	TGTAA*****	79935	Inespecífico
Aply-79935-R	CTTGT*****		
Aply-151856-F	TGTAAA*****	151856	Polimorfismo dudoso
Aply-151856-R	GGAGG*****		
Aply-10788-F	TGTAAA*****	10788	Polimorfismo dudoso
Aply-10788-R	CACAAA*****		
Aply-29593-F	TGTAAA*****	29593	Inespecífico
Aply-29593-R	AGTGAG*****		
Aply-40638-F	TGTAAAA*****	40638	Inespecífico
Aply-40638-R	CCGTGT*****		
Aply-258961-F	TGTAAA*****	258961	Inespecífico
Aply-258961-R	TTCAGC*****		
Aply-25970-F	TGTAAA*****	25970	Inespecífico
Aply-25970-R	CTACAC*****		
Aply-31177-F	TGTAAA*****	31177	Amplificación débil
Aply-31177-R	ATAATG*****		
Aply-197424-F	TGTAAA*****	197424	Inespecífico
Aply-197424-R	CGCATG*****		
Aply-24177-F	TGTAAA*****	24177	Polimorfismo dudoso
Aply-24177-R	GAGTTG*****		
Aply-29314-F	TGTAAA*****	29314	Polimorfismo dudoso
Aply-29314-R	CGACCA*****		
Aply-156548-F	TGTAAA*****	156548	Polimorfismo dudoso
Aply-156548-R	ACCTCG*****		
Aply-40461-F	TGTAAA*****	40461	Pendiente (Aduana)
Aply-40461-R	CACCCT*****		
Aply-238132-F	TGTAAA*****	238132	Polimorfismo dudoso
Aply-238132-R	CGTTGG*****		
Aply-161933-F	TGTAAA*****	161933	Polimorfismo dudoso
Aply-161933-R	ACCCAC*****		

Tabla 17. Descripción de los cebadores de los loci que pasaron a la segunda fase experimental de *A. gerardogreeni* y sus respectivos resultados.

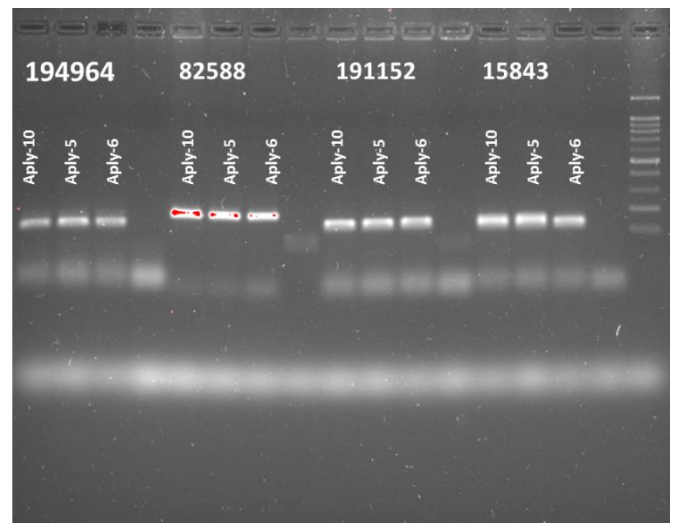
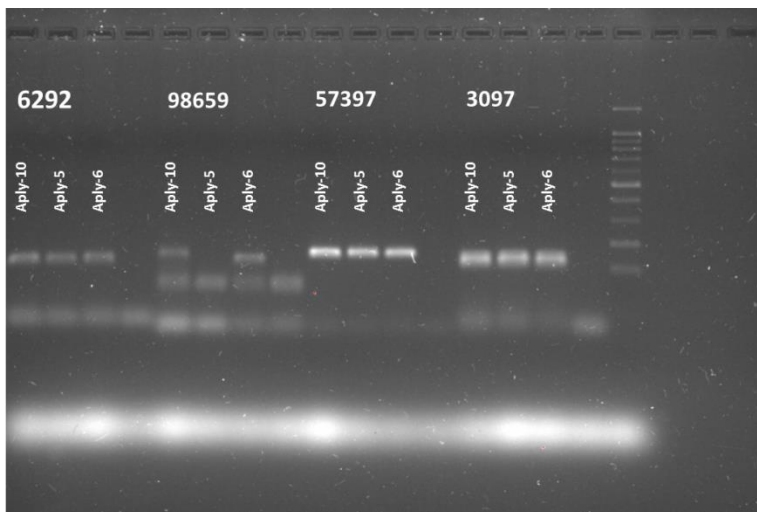
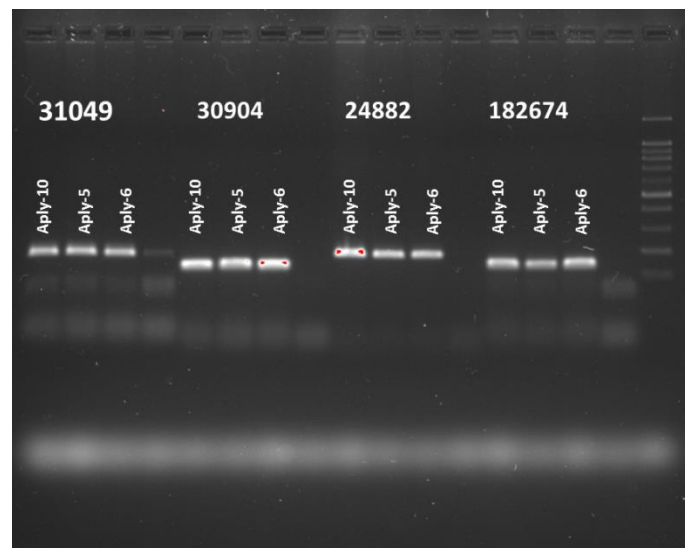
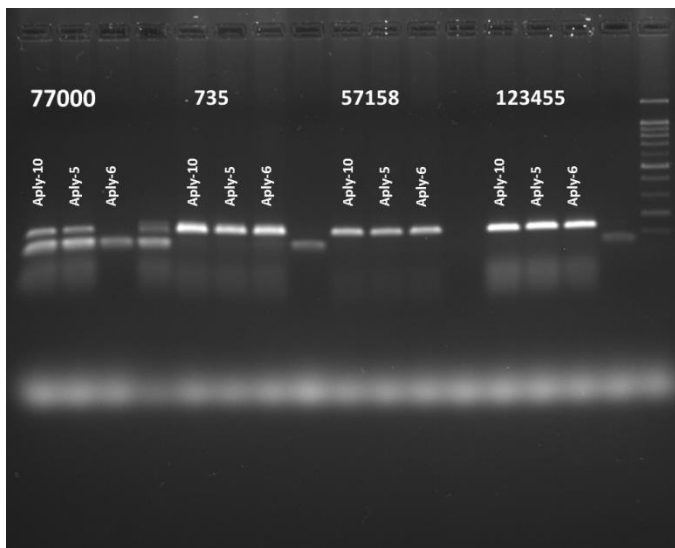
Cebadores	Secuencia	Contig	Ta °C	Tamaño producto	Resultado experimental
Aply-31049-F	TGTAAA*****	31049	59	160	10 individuos genotipados
Aply-31049-R	GTCCCG*****				
Aply-57158-F	TGTAAA*****	57158	59	106	10 individuos genotipados
Aply-57158-R	AGGAGC*****				
Aply-123455-F	TGTAAA*****	123455	59	119	10 individuos genotipados
Aply-123455-R	TCGTGC*****				
Aply-734-F	TGTAAA*****	734	59	106	10 individuos genotipados
Aply-734-R	AACAGA*****				
Aply-30904-F	TGTAAA*****	30904	59	109	10 individuos genotipados
Aply-30904-R	CTTGCA*****				
Aply-24882-F	TGTAAA*****	24882	59	158	10 individuos genotipados
Aply-24882-R	GAAGTA*****				
Aply-182674-F	TGTAAA*****	182674	59	111	10 individuos genotipados
Aply-182674-R	CAGTAG*****				
Aply-194964-F	TGTAAA*****	194964	59	104	10 individuos genotipados
Aply-194964-R	TCTGTC*****				
Aply-77000-F	TGTAAA*****	77000	59	100	Inespecífico
Aply-77000-R	GGTCTG*****				
Aply-82588-F	TGTAAA*****	82588	59	150	10 individuos genotipados
Aply-82588-R	TATCCG*****				
Aply-191152-F	TGTAAA*****	191152	59	104	10 individuos genotipados
Aply-191152-R	TGGTGG*****				
Aply-15843-F	TGTAAA*****	15843	59	100	10 individuos genotipados
Aply-15843-R	TGGTTA*****				
Aply-8089-F	TGTAAA*****	8089	59	105	10 individuos genotipados
Aply-8089-R	AAGTGC*****				
Aply-119133-F	TGTAAA*****	119133	59	117	10 individuos genotipados
Aply-119133-R	GGGAGA*****				
Aply-156568-F	TGTAAA*****	156568	59	116	Interpretación dudosa
Aply-156568-R	CAGCAC*****				
Aply-37595-F	TGTAAA*****	37595	59	115	10 individuos genotipados
Aply-37595-R	TTGACA*****				
Aply-6292-F	TGTAAA*****	6292	59	100	10 individuos genotipados
Aply-6292-R	GCGCAG*****				
Aply-98659-F	TGTAAA*****	98659	59	115	Inespecífico
Aply-98659-R	AGACCT*****				
Aply-57397-F	TGTAAA*****	57397	59	128	10 individuos genotipados
Aply-57397-R	TGAGTT*****				
Aply-3097-F	TGTAAA*****	3097	59	100	10 individuos genotipados
Aply-3097-R	ATGTGA*****				
Aply-89450-F	TGTAAA*****		59	113	10 individuos

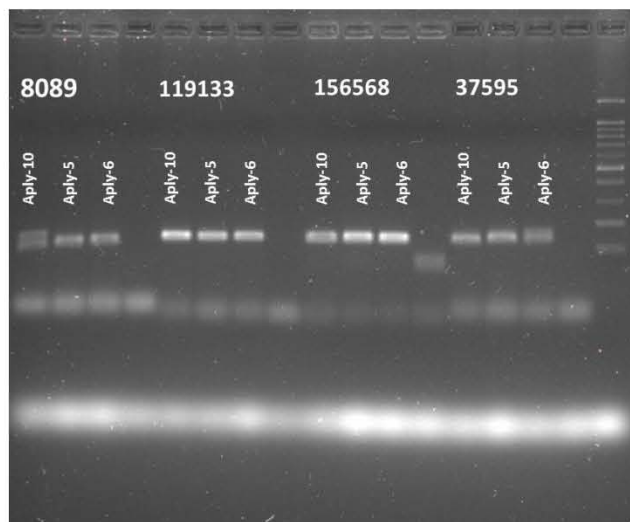
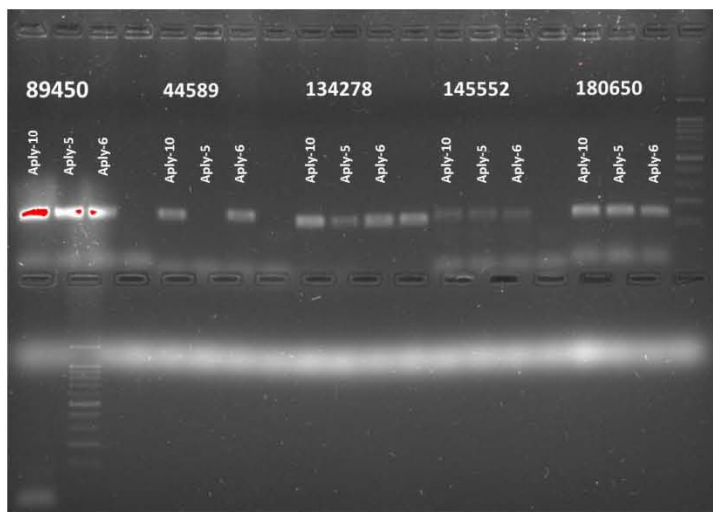
Aply-89450-R	AGTAGG*****	89450			genotipados
Aply-44589-F	TGTAAA*****	44589	59	114	10 individuos genotipados
Aply-44589-R	CTGAAG*****				
Aply-134278-F	TGTAAA*****	134278	59	102	Inespecifico
Aply-134278-R	CGACGA*****				
Aply-145552-F	TGTAAA*****	145552	59	129	10 individuos genotipados
Aply-145552-R	ATGTGA*****				
Aply-180650-F	TGTAAA*****	180680	59	114	10 individuos genotipados
Aply-180650-R	TCGTTC*****				

Anexo 4

La foto-documentación de geles de electroforesis se anexó con la finalidad de que se observen cada uno de los productos amplificados. Tomando de ejemplo los individuos Aply-10, Aply-5 y Aply-6.

Cada una de las imágenes incorpora los números de los contigs, el cual corresponde al locus y a los cebadores reverse y forward probados. Además se indica arriba de la banda el código identificador del individuo probado (Aply-nn).





Anexo 5

Metodología para la separación celular de los simbioses que se albergan en esponjas.

1.- Cortar una parte de la esponja y triturarla hasta tener una masa homogénea (conteniendo las células microbianas y la esponja disociada).

2.- Centrifugar a 730 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 2 minutos

3.- Retirar el sobrenadante (aproximadamente el 80% del sobrenadante resultante contiene células microbianas). Se retira el sobrenadante superior e intermedio dejando el pellet de la esponja.

4.- Re-suspender el pellet de esponja en 10 ml de agua de mar artificial (CMFASW).

5.- Centrifugar a 730 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 2 minutos.

6.- Retirar el sobrenadante.

7.- Re-suspender el pellet de esponja en 10 ml de agua de mar artificial (CMFASW).

8.- Centrifugar a 730 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 2 minutos.

9.- Retirar el sobrenadante.

10.- Re-suspender el pellet de esponja en 1.5 ml de agua de mar artificial (CMFASW) y añadirlo a un tubo de centrífuga de 1.5 ml.

11.- Centrifugar a 239 RCF (fuerza centrífuga relativa) durante 3 minutos usando un rotor Eppendorf FA-45-30-11.

12.- Retirar el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta y mantener en congelado el pellet de esponja.

Protocolo para la extracción de ADN:

1.- Cortar entre 0.5 a 1.2 cm del tejido de la esponja, triturar hasta formar una masa e introducirla en un tubo de 1.5 ml.

2.- Agregar al tubo 275 µl de solución de digestión al tubo, dicha solución está compuesta por: Solución de lisis nucleica (200 µl), EDTA 0.5 M (50 µl), Proteinasa K (20 µl) y Solución A RNasa (5 µl).

3.- Incubar la muestra a 55 °C durante 18 horas (Baño María).

4.- Agregar 250 µl de Buffer Lysis Wizard SV a la muestra. Dar Vortex.

5.- Transferir la muestra del tubo a una minicolumna Wizard SV.

6.- Centrifugar a 13,000 g durante 3 minutos.

7.- Remover la minicolumna y descartar el producto de la centrifugación. Y colocar un tubo nuevo en la minicolumna.

8.- Agregar 650 µl de Solución de lavado de columna a la muestra y centrifugar por 1 minuto. Descartar el producto de la centrifugación. Este paso se repite 2 veces.

9.- Centrifugar por 2 minutos para separar residuos de la solución de lavado que se encuentren en la membrana. Descartar el producto.

10.- Colocar un tubo nuevo a la minicolumna y agregar 25 μ l de agua libre de nucleasa e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos

11.- Centrifugar a 13,000 g durante 1 minuto. No se descarta el producto de la centrifugación.

12.- Agregar 25 μ l de agua libre de nucleasa e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugar a 13,000 g durante 2 minutos.

13. Remover la minicolumna del tubo de 1.5 ml y almacenar el producto de ADN purificado a -22 °C.