

NOTA CIENTÍFICA

CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE *Chondracanthus saundersii* C.W. SCHNEIDER *et* C.E. LANE PARA CUBA.

Rubén Cabrera ¹*, Britton O'Shields ² y Juan M López-Bautista ²

(1) Gabinete de Arqueología. Tacón No. 12, e/ O'Reilly y Empedrado. Habana Vieja, Cuba.

(2) Department of Biological Sciences. The University of Alabama, P.O. Box 870345, 425 Scientific Collections Bldg., Tuscaloosa, AL 35487, USA.

(*) Autor correspondiente: cabrera@arq.patrimonio.ohc.cu

RESUMEN

Utilizando técnicas moleculares, se corrobora la presencia de *Chondracanthus saundersii* C.W. Schneider *et* C. E. Lane en Cuba. El gene *rbcl* fue secuenciado y analizado por métodos filogenéticos. El material cubano es genéticamente idéntico a la secuencia original de Bermudas. Se muestran, por vez primera, detalles morfológicos sobre las estructuras reproductivas tetrasporangiales para la especie.

Palabras clave: análisis filogenético; soros tetrasporangiales; tetrasporangios; *rbcl*; *Chondracanthus saundersii*, ASW, Cuba.

ABSTRACT

The presence of *Chondracanthus saundersii* C. W. Schneider *et* C. E. Lane in Cuba is evidenced through molecular technology. The *rbcl* gene was sequenced and analyzed using phylogenetic methods. Cuban samples are genetically identical to samples from the Bermuda Islands. For the first time, morphological details on tetrasporangia reproductive structures for this species are given.

Key words: phylogenetic analysis; tetrasporangial sori; tetrasporangia; *rbcl*; *Chondracanthus saundersii*, ASW, Cuba.

Chondracanthus Kützing (1843) es uno de los siete géneros reconocidos dentro de la familia Gigartinae; aunque en el Atlántico Occidental Tropical y Subtropical solo se han registrado cuatro especies (Wynne, 2005), es conocido que tanto su diversidad como su distribución geográfica son muy amplias (Hommersand *et al.*, 1993). Hughey y Hommersand (2008) abordan ampliamente la historia taxonómica de este género. Básicamente, este grupo se caracteriza por tener un talo delicado, de naturaleza cartilaginosa y marcadamente bifurcado, lo que le da una apariencia espinescente.

Schneider y Lane (2005) describieron recientemente una nueva especie de *Chondracanthus* para la flora de Bermudas (*C. saundersii* C.W. Schneider & C.E. Lane); en este estudio los citados autores realizaron estudios moleculares utilizando secuencias de la subunidad grande del gene rubisco o *rbcl*, y análisis filogenéticos para los materiales de Bermuda. Esta especie no ha sido registrada en Cuba (Suárez, 2005). Sin embargo, Schneider y Lane (2005) mencionaron la presencia

de *C. saundersii* para Cuba basados en un ejemplar de herbario (MICH) que fue analizado únicamente por su morfología. Los autores no llevaron a cabo una descripción de tetrasporangios y carposporofitos para la nueva especie, debido a la ausencia de estos elementos morfológicos.

En la presente nota se confirma la presencia de *Chondracanthus saundersii* en aguas cubanas utilizando técnicas moleculares, y se demuestra que el material analizado es genéticamente idéntico al de Bermudas. Se presenta además, por primera vez, la descripción morfológica de las estructuras reproductivas tetrasporangiales en este taxón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento para la colecta

Los materiales biológicos correspondientes a la especie *C. saundersii* fueron colectados en la playa El Chivo, N de la Habana, el 24 de abril de 2008. Durante la colecta los materiales fueron separados para su preservación en hojas de herbario para su

estudio morfológico, y en cristales de sílica gel para su estudio molecular.

Análisis anatómico

El material herborizado se rehidrató en una disolución de agua de mar y detergente. Con el auxilio de una navaja de afeitar, se realizaron los cortes al talo. A los fragmentos obtenidos se les añadió azul de anilina al 0,2 %.

La ilustración anatómica de *Chondracanthus saundersii* se realizó con el empleo de una cámara lúcida acoplada al microscopio.

El espécimen *voucher* fue depositado en el herbario del Museo Nacional de Historia Natural de Cuba (MNHN). La siglas para referir el material de herbario se corresponden con las normas propuestas por Holmgren *et al.* (1990).

Extracción de DNA

El material colectado y preservado en sílica gel se mantuvo seco en una bolsa plástica sellada hasta el momento de la extracción del DNA. El talo fue macerado en un mortero y pistilo esterilizados. El DNA se extrajo utilizando el Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra de DNA se almacenó a -20°C. La integridad de la preparación del DNA se determinó por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Amplificación por PCR y secuenciación

El DNA fue amplificado por PCR del gene *rbcL* codificado en el cloroplasto según primers sugeridos por Freshwater y Rueness (1994) y Hommersand *et al.* (1994). La plantilla de DNA fue amplificada en tubos PCR de pared delgada de 0,2 mL, en un volumen total de reacción de 10 microlitros. Cada reacción consistió de 1,25 microlitros de cada uno de los siguientes constituyentes: una mezcla de deoxinucleotidos (que contienen dATP, dTTP, dCTP y dGTP), MgCl₂ (25 mM) y 10X bufer, 0,1 microlitro Taq DNA polimerasa, 0,62 microlitros de cada uno de los primers, 2,5 microlitros Betaine 5M y agua estéril. Los plásticos y químicos (excepto DNAs) fueron esterilizados con luz ultravioleta en una cámara de PCR, por un periodo de 20 minutos, para evitar la contaminación antes de agregar 1 microlitro de la plantilla de DNA. Se incluyeron controles negativos sin la plantilla de DNA. La amplificación se llevó a cabo en un GeneAmp PCR Thermal Cycler 2 700,

con una desnaturalización inicial de 96°C por 10 segundos, seguidos por 40 ciclos de amplificación del gene. Cada ciclo consistió de 1 minuto a 94°C, anillamiento del primer por 1 minuto a 50°C, y una extensión por 1,5 minuto a 72°C. Los productos amplificados en su totalidad, así como un marcador DNA estándar de 100 pares de bases, se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,6%, fueron teñidos con bromuro de etidio y examinados para establecer su longitud correcta, su productividad y su pureza. Se disectaron los productos PCR del gel por medio de una navaja de rasurar esterilizada y se transfirieron a un tubo de centrifugación de 0,5 mililitros. Los productos se concentraron y purificaron utilizando el kit de MinElute Gel Extraction (Qiagen). Los productos fueron evaluados por concentración en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y secuenciados con primers internos utilizando el protocolo del kit de secuenciación de DNA (ABI Prism Big-Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction; Applied BioSystems). Las reacciones de secuenciación se purificaron con columnas finas de Sephadex G-50 y se secuenciaron en un ABI 3 100 secuenciador automático. Las secuencias de DNA fueron visualizadas como texto y como electroferogramas codificados en color.

Alineación de secuencias y análisis filogenéticos

Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando Sequencher 4.5 (Gene Codes Corp.). Las secuencias editadas se ajustaron manualmente utilizando MacClade 4.06 (Maddison y Maddison, 2001). La reconstrucción filogenética estuvo basada en una base de datos del gene *rbcL* utilizando PAUP* 4.0 para Macintosh (Swofford, 2000) y MRBAYES 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Con el objeto de estandarizar los análisis en este estudio, la base de datos de secuencias y los protocolos de análisis filogenético fueron reproducidos según lo especificado por Schneider y Lane (2005). La ilustración del árbol filogenético se obtuvo y editó en Adobe Illustrator CS3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología de los tetrasporangios en *Chondracanthus saundersii*

Morfológicamente, el material examinado no difiere con la descripción original, pero como dato adicional se puede añadir que se observaron papilas o soros tetrasporangiales de 0,4-1,2 mm de

diámetro (Fig. 1 a), y se comprobó que estas papilas emergen del talo.

Los tetrasporangios tienen un diámetro de 36-40 μm , se desarrollan en filamentos corticales ramificados y contienen de 8 a 10 células (Fig. 1 b). En el interior de los soros, los filamentos corticales primarios se ramifican para transformarse en tetrasporangios (Fig. 2 b). Los tetrasporangios son tetraédricos (Fig. 1 c). No se observaron cicatrices en las paredes corticales de los soros tetrasporangiales, por lo que, al parecer, hasta el momento de su colecta no se habían liberado tetrasporas.

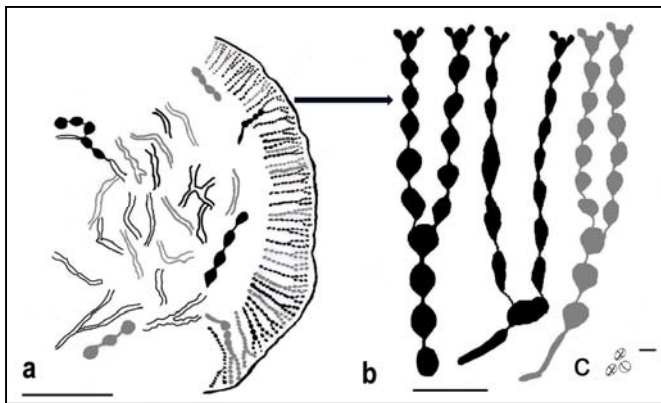


Fig. 1. Presencia de tetrasporofito en *Chondracanthus saundersii*, 3 005 MNHN. a): sección transversal de una papila (soro) tetrasporangial con tetrasporangios en varias etapas de desarrollo y filamentos corticales primarios (escala = 200 μm); b): la sección indica tetrasporangios inmaduros que surgen de los filamentos corticales primarios (escala = 50 μm). c): tetrasporangios tetraédricos (escala = 0.025 mm).

Material examinado: 3 005 MNHN, 24.iv.2008, playa El Chivo, N de la Habana, profundidad: 0,3 m, intermareal rocoso, legit: Cabrera, R.

Análisis filogenéticos

El gene *rbcl* secuenciado a partir de la muestra analizada por su morfología fue utilizado para construir la base de datos, que consistió en 1 347 pares de bases. La secuencia obtenida GeneBank (FJ513458) corresponde a la secuencia depositada anteriormente para *Chondracanthus saundersii* con el número GeneBank (AY698062), en un 100% de identidad genética. Los resultados del análisis filogenético utilizando esta base de datos produjeron un árbol filogenético mostrado en la

Fig. 2. Este árbol filogenético utiliza los taxa correspondientes a otras especies de *Chondracanthus*, incluyendo la especie *C. saundersii* recién descrita para Bermudas (AY698062).

La base de datos se analizó mediante los métodos sistemáticos de parsimonia, distancia, e inferencia de Bayes. El árbol filogenético en la Fig. 1 corresponde al árbol de consenso obtenido por inferencia de Bayes. Ya que la topología de los otros dos árboles filogenéticos (parsimonia y distancia) fueron similares al árbol obtenido por inferencia de Bayes, solamente se muestra un árbol (inferencia Bayes). Sin embargo, los datos obtenidos a partir de los análisis de parsimonia y distancia (valores de bootstrap) fueron agregados al árbol de inferencia de Bayes. De esta manera, cada rama del árbol filogenético muestra los tres valores de soporte filogenético obtenidos a partir de la parsimonia, distancia e inferencia de Bayes (respectivamente).

En general, la topología obtenida en el presente reporte corresponde a la topología del árbol filogenético presentado por Schneider y Lane (2005). Como se puede observar en la Fig. 1, la muestra procedente de Cuba es 100% similar a la muestra de Bermudas (*Chondracanthus saundersii*). La especie *C. saundersii* forma el grupo hermano a la rama que contiene *C. tenellus* y *C. intermedius*. Las relaciones de estas tres especies están sustentadas con altos valores de bootstrap de la parsimonia y distancia, así como de los valores de inferencia de Bayes (por encima de 90 para bootstrap y 1,0 para Bayes). Se puede concluir, a partir de estos análisis moleculares, que la sugerencia de Schneider y Lane (2005) de la presencia en Cuba de *Chondracanthus saundersii* (analizando material de herbario) se confirma por nuestros estudios de sistemática molecular.

Este estudio establece la exitosa correspondencia entre datos moleculares y morfológicos para la flora marina de Cuba. Nuestros esfuerzos continúan utilizando los estudios morfológicos y la taxonomía clásica de las algas marinas como hipótesis de trabajo. Estas hipótesis científicas están siendo examinadas por medio de las técnicas de la filogenia molecular para apoyar, complementar o modificar la sistemática algal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Colegio de Artes y Ciencias (decano Robert F. Olin) así como a la Iniciativa Académica de Cuba - Alabama de las

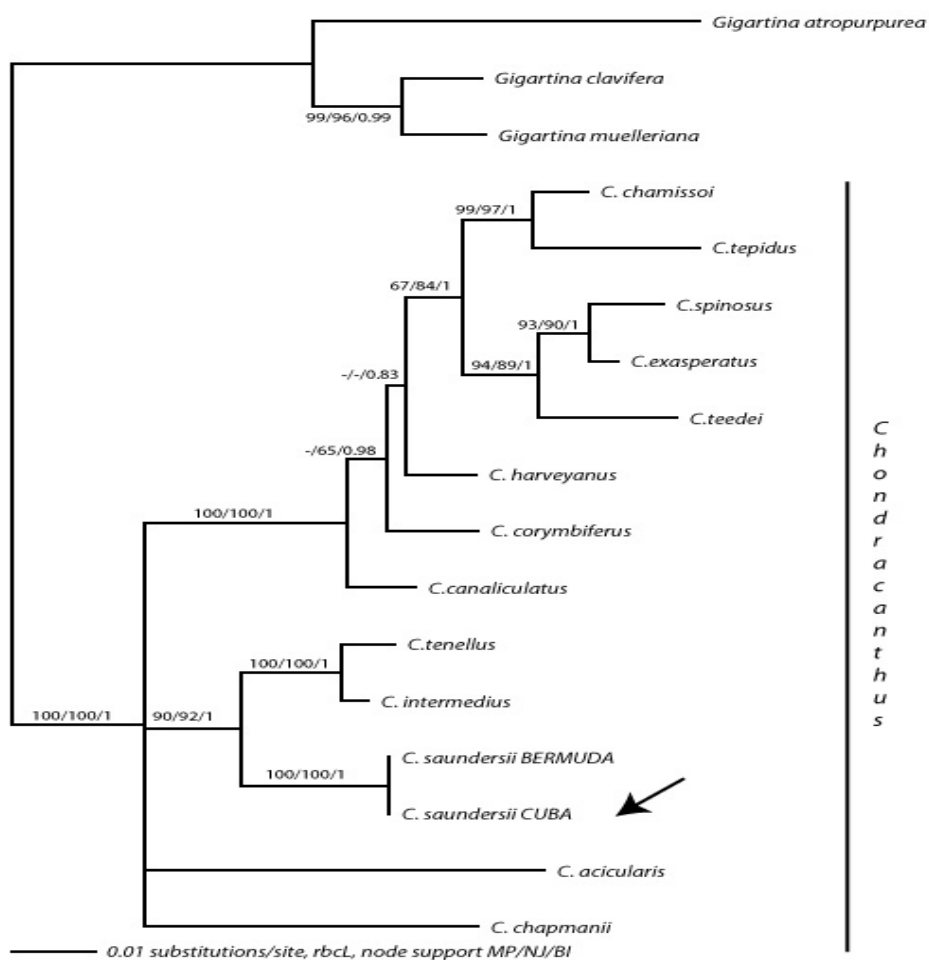


Fig. 2. Árbol de consenso obtenido por inferencia de Bayes del gene *rbcl*; grupo interno el género *Chondracanthus*, grupo externo es el género *Gigartina*; *C. saundersii* de Cuba es genéticamente idéntico al material de Bermuda (topotipo). Los valores de soporte corresponden al bootstrap de la parsimonia, distancia, y probabilidades posteriores de Bayes (respectivamente). La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones de pares de bases por sitio.

universidades de Alabama y de La Habana, por el apoyo logístico y económico para la realización de estas investigaciones científicas.

REFERENCIAS

Freshwater, D.W. and J. Rueness (1994): Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcl* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33:187-194.

Holmgren, P.K., N.H. Holmgren and L.C. Barnett (1990): Index Herbariorum. Part I: the Herbaria of world. *Regnum Vegetabile* 120: 1- 693.

Hommersand, M.H., S. Fredericq and D.W. Freshwater (1994): Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on sequence analysis of *rbcl*. *Botanica Marina* 37:193-2-3.

Hommersand, M.H., M.D. Guiry, S. Fredericq and G.L. Leister (1993): New perspectives in the

- taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 260/261: 105-120.
- Huelsenbeck, J. and F. Ronquist (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hughey, J.R. and M.H. Hommersand (2008): Morphological and molecular systematic study of *Chondracanthus* (Gigartinaceae, Rhodophyta) from Pacific North America. *Phycologia* 47(2): 124-155.
- Kützing, F.T. (1843): *Phycologia generalis*. Brockhaus, Leipzig. 458 pp.
- Maddison, D.R. and W.P. Maddison (2001): MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution, version 4.03. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Schneider, C.W and C. Lane (2005): Notes on the marine algae of the Bermudas. 7. Additions to the flora including *Chondracanthus saundersii* sp. nov. (Rhodophyta, Gigartinaceae) based on *rbcl* sequence analysis. *Phycologia* 44 (1): 72-83.
- Suárez, A.M. (2005): Lista de las macroalgas marinas cubanas. *Rev. Invest. Mar.* 26(2): 93-148.
- Swofford, D.L. (2000): PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wynne, M.J. (2005): A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. *Nova Hedwigia* 129: 1-152.

Aceptado: 4 de enero de 2009