

**EVIDENCIA PRELIMINAR
DE UNA DUPLICACION DEL GEN
EN LA EVOLUCION DE LA CLASE
ECHINOIDEA**

H. A. LESSIOS

Instituto "Smithsonian" de Investigación Tropical
Apartado 2072, Balboa, Rep. de Panamá

Reimpreso de la Academia Panameña de Medicina y Cirugía 6 (1): 46-55, Enero, 1981

LITHO-IMPRESORA PANAMA, S. A.

EVIDENCIA PRELIMINAR DE UNA DUPLICACION DEL GEN EN LA EVOLUCION DE LA CLASE ECHINOIDEA.

La fosfoglucomutasa del músculo de la mandíbula de dos especies del erizo de mar *Eucidaris* (orden Cidaroida) exhibe zimogramas consistentes con la hipótesis de una enzima monomérica con un sólo locus; en dos especies del erizo negro de mar *Diadema* (orden Diadematoida) y en tres especies del erizo oval *Echinometra* (orden Echinoida); esta enzima presenta zimogramas que indican la existencia de un segundo locus, con mayor velocidad de migración anodal. Los miembros del Cidaroida constituyen el único orden sobreviviente de la subclase Perisoechinoidea, que en la era Mesozoica dió origen a todos los otros órdenes sobrevivientes del erizo de mar. Debido a que otras clases de Echinodermata parecen poseer únicamente un locus para la fosfoglucomutasa, el patrón de un locus adicional en los órdenes más avanzados de la Echinodea puede ser el resultado de una duplicación en su ancestro común más bien que el producto de una omisión en los cidaroides sobrevivientes. Tal duplicación debió haber ocurrido no más tarde del

período Triásico, hace aproximadamente unos 150 millones de años, de acuerdo con los esquemas actualmente aceptados sobre la filogenia del erizo de mar. Se requieren más datos para establecer inequívocamente que el locus extra es en realidad el resultado de una duplicación y para dilucidar su historia evolutiva.

Las duplicaciones del material genético, que proporciona el código para las proteínas enzimáticas, pueden realizar un papel importante en la evolución (1). El efecto inmediato de una duplicación es la dotación de los organismos que lo poseen de copias múltiples de un gen y, en consecuencia, de la capacidad para la producción de grandes cantidades de enzimas en cortos períodos. Por ejemplo, ejemplares de la mosca *Dacus oleae*, del fruto del olivo, que heredan un gen duplicado en el locus que codifica para la acetilcolinesterasa, son capaces de producir más de esta enzima y consecuentemente muestran una resistencia más alta a los pesticidas de fosfatos orgáni-

cos (2). La segunda, y más importante consecuencia de las duplicaciones, es que ellas permiten la evolución de enzimas con funciones mejoradas o completamente nuevas. Debido a que una copia del gen permanece presente y produce la enzima "normal", el segundo es capaz de acumular mutaciones "prohibidas" y difieren en función. Se piensa que la estructura tetramérica de la hemoglobina de los vertebrados superiores tuvo su origen a través de tales duplicaciones (3).

No es siempre fácil detectar una duplicación a través de la electroforesis. Una evidencia inequívoca de que una duplicación ha ocurrido consistiría en que la secuencia de aminoácidos mostrara una gran similitud entre los polipéptidos (4, 5, 6) o que estudios genéticos y citológicos indicaran enlaces estrechos entre un gen y su supuesto duplicado. Sin embargo, cuando una forma primitiva de un linaje muestra un locus encargado de la codificación de cierta enzima, mientras que sus descendientes muestran dos de estos loci, y cuando se puede demostrar que la condición ancestral es la de un sólo locus, es razonable concluir que la duplicación ha ocurrido durante la evolución del linaje (7).

En el curso de una comparación electroforética entre erizos de las costas Atlántica y Pacífica de Panamá descubrí evidencia

preliminar de que una duplicación pudo haber ocurrido, en el material genético que regula la codificación de la fosfoglucomutasa (FGM = PGM) del músculo de la mandíbula, durante la evolución de la clase Echinoidea. La evidencia está lejos de ser inequívoca, pero es suficiente para justificar el inicio de estudios que investiguen este asunto.

La clase Echinoidea contiene dieciséis órdenes. De éstos, el Cidaroida es el más primitivo y los otros quince se derivan de él (Fig. No. 1). El tiempo de la bifurcación del árbol filogenético está en tela de duda; Durham y Melville (8) creen que ocurrió después de que se había cruzado la frontera Permo-Triásico, mientras que Durham (9) lo ha colocado en el período Pensilvánico. Existen otros puntos de vista acerca del tiempo de la división pero todos están de acuerdo en que los echinoides existentes se derivaron del Cidaroida. Una diferencia entre este orden y el Euechinoidea (ver Fig. No. 1 para la jerarquía y nombres de taxa) es que en el primero falta una faja perignática; únicamente pueden mover sus mandíbulas a lo largo de un eje vertical, mientras que estos miembros del Euechinoidea que poseen una linterna de Aristóteles pueden dirigirlas oblicuamente. Esta diferencia puede ser relevante en la discusión de las enzimas presentes

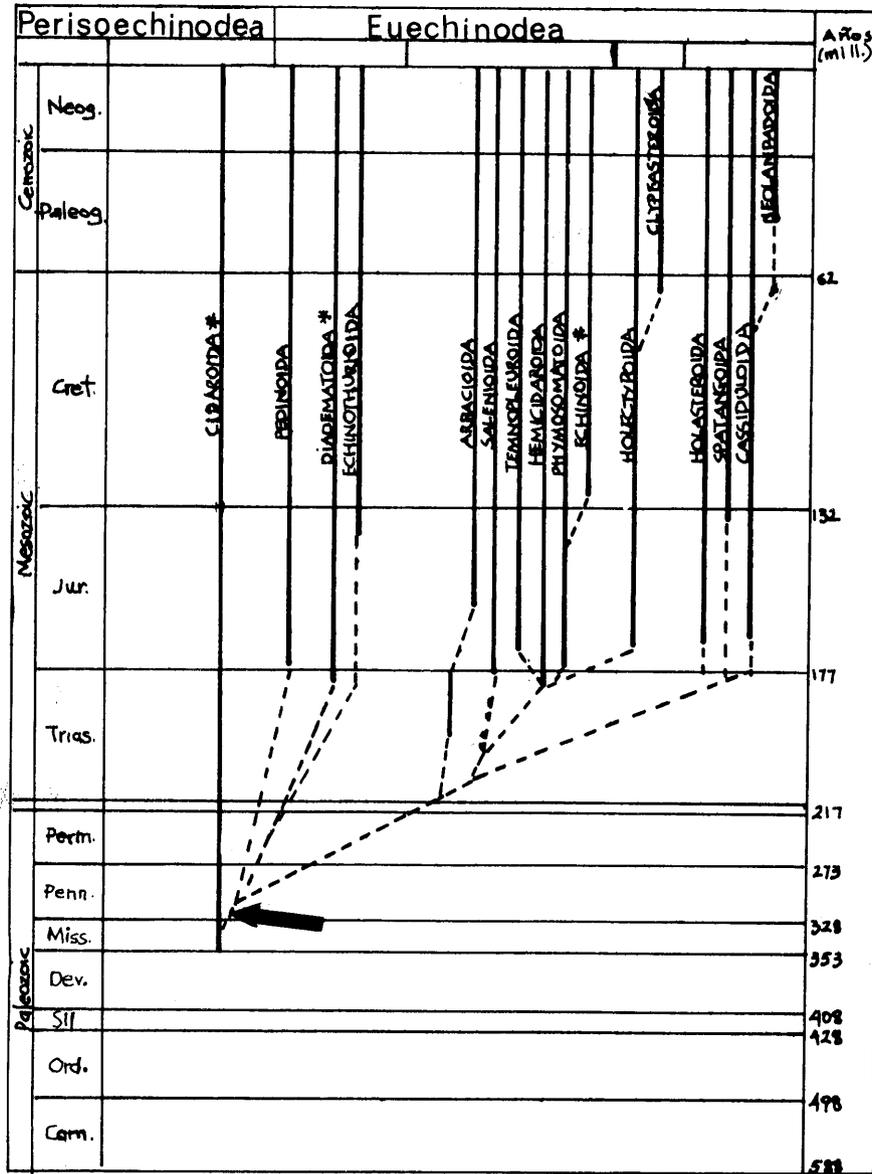


Fig. No. 1

Filogenia de los órdenes existentes de la clase Echinoidea (erizo de mar, "sand dollar", "heart urchin") según Durham (1966). Los órdenes marcados con un asterisco son aquellos que se tomaron como muestra para este estudio. La flecha señala el tiempo en que probablemente ocurrió la duplicación de la PGM, si las suposiciones hechas en este estudio son correctas.

en los músculos mandibulares de estos erizos de mar.

La enzima que discutiré, la fosfoglucomutasa, cataliza la reacción reversible del 1-fosfato de glucosa a 6-fosfato de glucosa en presencia del 1,6-difosfato de glucosa.

Materiales y Métodos

Cidaroida, el único orden sobreviviente de la subclase Perisoechinoidea, está representado en este estudio por dos especies, *Eucidaris thouarsi* de la costa oriental del Pacífico y *E. tribu-*

loides del Caribe. Euechinodea está representado por *Diadema antillarum* y *D. mexicanum* (orden Diadematoidea) y *Echinometra lucunter*, *E. viridis* y *E. vanbrunti* (orden Echinoidea*). La Fig. No. 1 muestra la posición de los tres órdenes en el esquema filogenético de Durham (9) y la Tabla No. 1 presenta las dimensiones de la muestra para cada especie.

La electroforesis se llevó a cabo sobre planchas de 18 x 14 x 1 cm de un polímero que contenía 11% de almidón (Otto Hiller

TABLA No. 1

NUMERO DE INDIVIDUOS TOMADOS COMO MUESTRA (N) Y NUMERO DE PRESUNTOS ALELOS DETECTADOS POR LOCUS EN CADA ESPECIE. PGM-2 DENOTA EL LOCUS QUE EMIGRA CON MAYOR VELOCIDAD HACIA EL ANODO

ESPECIE	N	PGM-1	PGM-2
<u>EUCIDARIS THOUARSI</u>	48	5	-
<u>EUCIDARIS TRIBULOIDES</u>	108	4	-
<u>DIADEMA MEXICANUM</u>	88	5	3
<u>DIADEMA ANTILLARUM</u>	66	4	3
<u>ECHINOMETRA VANBRUNTI</u>	63	7	3
<u>ECHINOMETRA LUCUNTER</u>	73	7	3
<u>ECHINOMETRA VIRIDIS</u>	77	7	3

* El orden Echinoidea no debe ser confundido con la clase Echinoidea.

Electrostarch Co., Lote 307). Como amortiguador del gel se empleó una solución 9 mM con relación al Tris, 3 mM al ácido cítrico y 1.2 mM de EDTA, de pH 7.0; el amortiguador del electrodo fue de 135 mM Tris, 45mM ácido cítrico, 1.2 mM EDTA, a pH 7.0. Los geles se mantuvieron en neveras para conservarlas en frío. Se calibraron el uno contra el otro y para ello se volvieron a comprobar algunas de las muestras corridas en cada uno de los geles, en un gel nuevo.

PGM se comprobó rebanando cada gel horizontalmente e incubando una tira central en: 150 mg de 1-fosfato- Na_2 de glucosa, 5 mg de NADP, ca 0.2 mg de 1.6-difosfato de glucosa (sal de tetraciclohexylamonio), 40 unidades de la dehidrogenasa de 6-fosfato de glucosa, 10 mg de azul de nitro tetrazolio, 6 ml de una solución 0.1 M de MgCl_2 , 5 ml de amortiguador Tris-HCl,

pH 8.0 y H_2O para completar 50 ml. Cada gel fue incubado a 37°C por una hora y luego se le agregaron 2 mg de metosulfato de fenazina. Poco después, las zonas de actividad aparecieron como bandas púrpuras.

Resultados

La PGM es altamente polimórfica en erizos de mar. Bandas de 5 diferentes movilidades se obtuvieron para *Eucidaris*, ocho para *Diadema* y 10 para *Echinometra* (Tabla No. 1). Ni un sólo individuo de *Eucidaris* tuvo más de dos bandas, mientras que los ejemplares individuales de *Diadema* y de *Echinometra* exhibieron un máximo de cuatro bandas. Los zimogramas de varios individuos (Figs. Nos. 2 a 6) concuerdan con las expectativas de una hipótesis de enzima monomérica con un locus (PGM-1) en *Eucidaris* y dos loci en *Diadema* y *Echinometra*. El locus que falta en *Eucidaris* es el que pasa más rápi-

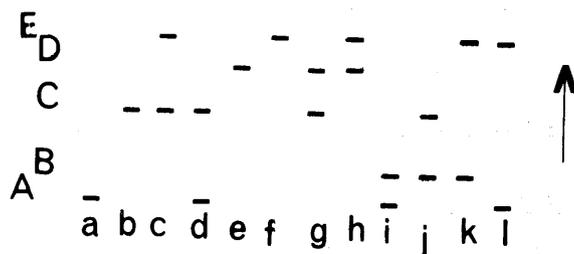


Fig. No. 2

Zimogramas de los genotipos observados en *Eucidaris* (PGM-1). *E. tribuloides*: a(AA), b(CC), c(CE), d(AC), e(DD), f(EE), g(CD). *E. thouarsi*: patrones a, b, c, d, e, además de h(DE), i(AB), j(BC), k(BE), l(AE).

damente hacia el ánodo. El número de los supuestos alelos en cada uno de los loci de cada especie se muestra en la Tabla No. 1. No es sorprendente que las especies más divergentes dentro de un género, son (sobre la base de 18 loci) tan similares entre sí como las especies hermanas en la *Drosophila*.

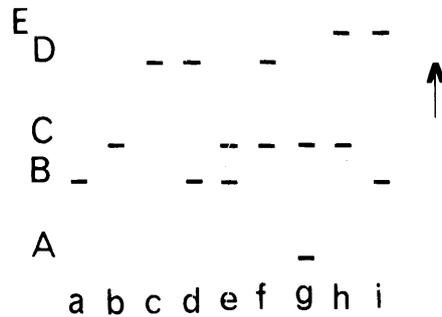


Fig. No. 3
Zimogramas de los genotipos observados del locus para PGM-1 de *Diadema*. *D. antillarum*: a(BB), b(CC), d(BD), e(BC), f(CD), g(AC). *D. mexicanum*: patrones a, b, c, d, e, f, g, más h(CE), i(BE).

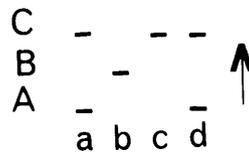


Fig. No. 4
Zimogramas de los genotipos observados de locus PGM-2 en *Diadema*. En *D. antillarum* y en *D. mexicanum*: a(AC), b(BB), c(CC), d(AC).

las especies dentro de cada género comparten la mayor parte de los alelos porque ellos están íntimamente relacionados (11). *Diadema*, en particular, muestra muy poca divergencia electroforética entre las especies en 18 loci tomados como muestras en un examen de mayores dimensiones (11, 12, 13); *Echinometra vanbrunti* y *E. viridis*,

Comentarios

El hecho de que los representantes de los órdenes examinados de Euechinoidea exhiben un locus adicional, mientras que los más primitivos de Perisoechinoidea muestran sólo uno, puede significar una de estas dos cosas:

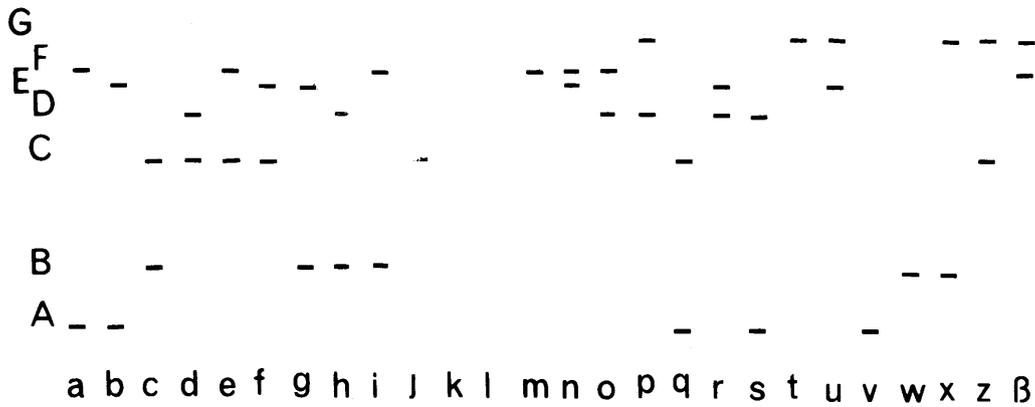


Figura No. 5

Zimogramas de los genotipos observados del locus PGM-1 en *Echinometra*. *E. lucunter*: a(AF), b(AE), c(BC), d(CD), e(CF), f(CE), g(BE), h(BD), i(BF), j(CC), k(DD), l(EE), m(FF), n(EF), o(DF), p(DG), q(AC), r(DE), s(AD), t(GG), u(EG). *E. viridis*: patrones b, c, e, f, h, j, k, l, n, o, p, r, más v(AA), w(BB), x(BG), z(CG). *Echinometra vanbrunti*: patrones a, d, e, f, h, j, k, l, m, n, o, r, t, u, más beta (FG).

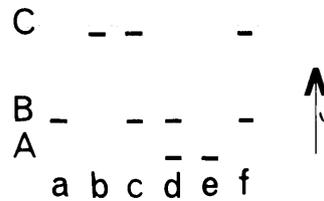


Fig. No. 6

Zimogramas de los genotipos observados del locus PGM-2 en *Echinometra*. *E. lucunter*: a(BB), b(CC), c(BC), d(AB). *E. viridis*: patrones a, b, c, d, más e(AA). *E. vanbrunti*: moldes a, b, c, d, más f(BC).

a. La PGM ancestral echinoide fue codificada por un sistema de dos loci; los Cidaroides modernos perdieron uno de estos loci mientras que los otros órdenes lo retuvieron.

b. La condición ancestral fue la de un sólo locus, tal como se observa en los Cidaroides exis-

tentes; en algún momento de la historia evolutiva de los echinoi- des se originó al menos una du- plicación, sea en un miembro de la Perisoechinoidea o durante la transición de la Perisoechinoidea a la Euechinoidea.

De las dos posibilidades, la se- gunda es más probable porque la

PGM-2 parece estar ausente en otras clases de la Echinodermata. Ayala y Valentine (14) informaron haber contado únicamente un locus para PGM en el ofiuroido *Ophiomusium lymani*. Ayala y col. (15) marcaron sólo un locus en los asteroides *Nearchaster aciulosus*, *Pteraster jordani*, *Diplopteraster multipes* y *Myxoderma sacculatum*. No es probable que el segundo locus de PGM se perdiera independientemente en tres diferentes clases de echinodermos; esta pequeña evidencia, por lo tanto, es una razón en favor de una duplicación, por lo menos, dentro de la Echinoidea.

Considerando que estamos tratando con una duplicación, observada en dos órdenes diferentes y relacionados distintamente, debemos preguntarnos si ellos lo heredaron de un ancestro común o si apareció independientemente en cada uno de ellos. Para contestar esta pregunta necesitamos datos de las especies que pertenecen a los otros trece órdenes de la Echinoidea; pero mi predicción es que la perspectiva más probable es la de una sólo duplicación antigua. Las duplicaciones son casos raros en la evolución animal (16) y hay pocas probabilidades de que tales casos ocurran en la misma enzima de dos órdenes y en la misma subclase. Marcus (17) informó haber marcado sólo un locus en *Arbacia punctulata* (orden Arbacioida), pero ella usó minúsculos geles de acrilami-

da y no notó la posibilidad de un locus adicional. Considerando que el locus adicional es el que se desplaza a mayor velocidad, no debe resultar inverosímil que ella lo hubiese perdido hacia el puente del ánodo.

Si la posibilidad del caso de una sólo duplicación es viable, podemos establecer fechas probables en que sucedió, ya que no pudo haber pasado más tarde que la unión de las ramas que conducen al Echinoida y al Diadematoida. Por consiguiente, de acuerdo al esquema filogenético de Durham (9), la fecha más reciente de su aparición sería el período Pensilvánico, hace unos 300 millones de años. El árbol filogenético de Durham y Melville (8) sería compatible con una fecha de hace aproximadamente 150 millones de años.

Es posible que la duplicación apareciera en la rama de Cidaroida, que dió origen a la Euechinoidea; y, de ser así, es más antigua que cualquiera de estas dos fechas. Si este fuera el caso, también debería estar presente en algunas familias del Cidaroida, y queda abierta la posibilidad de que podamos elucidar la filogenia de este orden antiguo, observando las moléculas de sus representantes sobrevivientes. Sin embargo, antes de intentar tal reconstrucción es indispensable obtener evidencia adicional, a través de estudios estructurales y citogenéticos, que aclaren si los dos loci

de PGM en los órdenes más evolucionados de Echinoidea son en realidad el resultado de una duplicación del DNA. Los estudios de la función de los productos del gen de cada locus (determinación de las constantes de Michaelis para cada isozima, localización de cada locus en el tejido, etc.) produciría evidencia en cuanto a si las isozimas de cada locus difieren en cualquier otra cosa que no sea la carga neta. Los estudios hechos por Avise y Kitto (7) y de Gottlieb (18, 19), son ejemplos en este aspecto.

SUMMARY

Jaw muscle phosphoglucosylase of two species of the pencil sea urchin *Eucidaris* (order Cidaroida) displays zymograms consistent with a hypothesis of a monomeric enzyme with a single locus; in two species of the black sea urchin *Diadema* (order Diadematoida) and in three spe-

cies of the oval sea urchin *Echinometra* (order Echinoida) this enzyme exhibits zymograms that indicate the existence of a second, anodally faster migrating locus. The Cidaroida are the only surviving order of the subclass Perisoechinoidea, which gave rise in the Mesozoic to all the other surviving sea urchin orders. Since other classes of Echinodermata appear to possess only one phosphoglucosylase locus, the pattern of an additional locus in the advanced orders of the Echinoidea may be the result of a duplication in their common ancestor, rather than the product of a deletion in the surviving cidaroids. Such a duplication would have to have occurred no later than the Triassic, about 150 million years ago according to the currently accepted schemes of sea urchin phylogeny. More data are needed to establish unequivocally that the extra locus is indeed the result of a duplication and to elucidate its evolutionary history.

BIBLIOGRAFIA

1. Ohno S: *Evolution by gene duplication*, Berlín, Springer-Verlag, 1970
2. Tsakas SC: Genetics of *Dacus oleae* VIII. Selection for the amount of acetylcholinesterase after organophosphate treatment. *Evolution* 31: 901-904, 1977
3. Zuckerkandl E, Pauling L: Evolutionary divergence and convergence in proteins, en *Evolving Genes and Proteins*, ed por Bryson V, Vogel HJ, New York, Academic Press, 1965, pp 97-166
4. Ingram VM: Gene evolution and the hemoglobins. *Nature* 189: 704, 1961
5. Smithies O: Chromosomal rearrangements and the evolution of the haptoglobin genes. *Nature* 196: 232-236, 1962
6. Hill R, Brew K, Vanaman TC, Trayer IP, Mattock P: The structure, function and evolution of α_2 -lactalbumin, Brookhaven Symp 21 139-152, 1968
7. Avise JC, Kitto GB: Phosphoglucose isomerase gene duplication in bony fishes. *Biochem Genet* 8: 113-132, 1973
8. Durham JW, Melville RV: A classification of echinoids. *J Paleontol* 10: 224-272, 1936

9. Durham JW: Classification, en *Treatise on Invertebrate Paleontology*, ed por Moore RC, Parte U, v. 3, Lawrence, The University of Kansas Press, 1966, pp 270-295
10. Chesher RH: The status of knowledge of Panamanian echinoids, 1971, with comments on other echinoderms. *Bull Biol Soc Wash* (2): 139-158, 1972
11. Lessios HA: Use of Panamanian sea urchins to test the molecular clock. *Nature* 280: 599-601, 1979a
12. Lessios HA: Molecular, Morphological and Ecological Divergence of Shallow Water Sea Urchins Separated by the Isthmus of Panama, Ph. D. thesis, Yale University, 1979b
13. Lessios HA: Divergence in allopatry: Molecular and Morphological differentiation between sea urchins separated by the Isthmus of Panama, *Evolution*, en prensa
14. Ayala FJ, Valentine JW: Genetic variability in the cosmopolitan deep-water ophiuran *Ophiomusium lymani*. *Mar Biol* 27: 51-57, 1974
15. Ayala FJ, Valentine JW, Hedgecock D, Barr LG: Deepsea asteroids: high genetic variability in a stable environment. *Evolution* 29: 203-212, 1975
16. Davidson EH, Britten RJ: Organization, transcription and regulation in the animal genome. *Quart Rev Biol* 48: 565-613, 1973
17. Marcus NH: Genetic variation within and between geographically separated populations of the sea urchin *Arbacia punctulata*, *Biol Bull* 153: 560-576, 1977
18. Gottlieb LD: Gene duplication and fixed heterozygosity for alcohol dehydrogenase on the diploid plant *Clarkia franciscana*. *Proc Natl Acad Sci, USA* 71: 1816-1818, 1974
19. Gottlieb LD: Evidence for duplication and divergence of the structural gene for phosphoglucosomerase in diploid species of *Clarkia*. *Genetics* 86: 289-307, 1977